وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة- قسم علوم الحياة

تأثير بعض المكونات الغذائيه على الفعاليه الانزيميه لبعض عزلات فطريات الرشاشيات

رسالة مقدمة إلى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة/نبات

من قبل
سراب فاضل حسين العامري
بكالوريوس علوم حياة / جامعة كربلاء
2002

بإشراف

أ.د. بازطه محمد

١٤٣٥هـ ٢٠١٤م

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على خاتم الأنبياء والمرسلين محمد وعلى اله الطيبين الطاهرين وصحبه الميامين.

يسرني وأنا أضع اللمسات الأخيرة لرسالتي ان أتقدم بالشكر والعرفان والامتنان إلى أستاذَتي الفاضلةالدكتورة بان طه محمد لمتابعتها وأرائها القيمة واقتراحها موضوع البحث وإخراج هذه الرسالة بالشكل الأفضل .

كما يسرني ان أتقدم بالشكر والتقدير الى رئاسة جامعة كربلاء وعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحتهم الفرصة لي لإكمال دراستي

كما لا يفوتني ان أتقدم بوافر الشكر والامتنان للدكتور على عبد الكاظم لمساعدته لي وشكري الى كافة منتسبي قسم علوم الحياة أساتذة وموظفين ...

كما لا يفوتني ان اشكر عائلتي العزيزة وخاصة والدي واخي وأخواتي وشكري الخاص الى زوجي العزيز الذي تحمل الأعباء أثناء مدة الدراسة والعمل وأطفالي (زهرات حياتي) مصطفى وملاك .. والى كل من مد يد العون وساعدني في أتمام هذا البحث مع التقدير .

سراب العامري

(رَ بِّي أَوْزِعْنى أن أشْكر نِعْمَتَكَ الَّتي
أَنعَمْتَ عليَّ و عَلى والدي وأن أعمل
صالحاً ترضاه وأدخلني برحمتك في
عبادك الصالحين)

النمل ﴿١٩﴾

الإهداء

الى من ترك فراغا" في نفوسنا ,قره أعيننا أخي ...وكل الدماء التي سقطت وتسقط غدرأ...رحمهم الله

الى عزي وفخري في الدنيا .. ينبوع الحب والحنان الذي وفقني ربي ببركة دعائه .... والدي

الى ملاذ الأمان الذي يلفنا بطمأنينة كل حين .. الى ينبوع الحنان الصافي ونهر العطاء الذي لاينضب .... والدتي الغالية اطال الله عمرها

الى ذخري في الحياة....

أخي وأخواتي

الى نبراس حياتي ورفيق دربي .. طريقي نحو المستقبل ... زوجي العزيز

الى بلسم روحي وزهرات عمري الصافية ....ولدي

مصطفى ملاك

سراب العامري

إقرار المشرف على الرسالة

أشهد بان إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / النبات.

التوقيع:

الاسم : بان طه محمد

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية التربيه للعلوم الصرفه/جامعه كربلاء

التاريخ : / / ٢٠١٤

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذ المشرف ، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع:

الاسم : نصير مرزة حمزة

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / ٢٠١٤

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (**تأثير بعض المكونات الغذائيه على الفعاليه الانزيميه لبعض عزلات فطريات الرشاشيات**) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم : م.د.مهند طارق

المرتبة العلمية: المدرس الدكتور

الكلية والجامعة: قسم اللغة العربية ، كلية التربية للعلوم الإنسانية_ جامعة كربلاء

التأريخ: / /2014

إقرار المقوم العلمي

أقر بأني قومت رسالة الماجستير الموسومة بـ (تأثير بعض المكونات الغذائيه على الفعاليه الانزيميه لبعض عزلات فطريات الرشاشيات) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة تقويماً علمياً .

التوقيع:

الاسم :أ.م.د. زهير حميد عبود

المرتبة العلمية:الأستاذ المساعد الدكتور

الكلية والجامعة:كلية العلوم – جامعة كربلاء

التأريخ: / /2014

الخلاصة

تم تشجيع نمو الفطريات على المواد الغذائية التي تم الحصول عليها من الاسواق المحلية ووضعها في اكياس من النايلون وحفظها في جو المختبر لحين ظهور اثار الفطريات عليها. وتم اختيار أنواع من الجنس.*Aspergillus ssp* عزلت وشخصت وأجري عليها الاختبار النوعي للكشف عن كفاءة تلك العزلات على أفراز انزيمي البروتيز والأميليز. انتخبت أفضل عزلة فطرية باستخدام طريقة الاوساط الصلبة الحاوية على الكازئين والببتون كل على حدة ، حققت خمسة عزلات قدرتها على افراز انزيم البروتييز وثلاثة عزلات اكثرها كفاءة في افراز انزيم الاميليز, وكان قطر الهالة الشفافة حول المستعمرات الفطرية اكبر من ١٥ ملم اما للفطر *Aspergillus niger* فقد حقق أعلى فعالية في افرازه لأنزيم البروتييزوكانت ١٨,٩٧ وحدة/مل ،وتركيز البروتين وكان مقداره ٠,٤٦٠ ملغم/مل ،أذ انتخبت كأفضل عزلة فطرية لأجراء سلسلة من التجارب لقياس وتحسين انتاجيتها وايجاد الظروف المثلى لنمو العزلة وانتاجها لانزيم البروتييز باستخدام الاوساط السائلة، كما استخدمت العناصر المعدنية ومصادرمختلفة من الكاربون والنيتروجين وتراكيزهما المختلفة لبيان قدرتها على النمو وافراز انزيم البروتييز، ووجد ان استخدام العناصر المعدنية لها تأثير منشط على فعالية الأنزيم وافضل مصدر كاربون كان الكلوكوز بتركيز ١,٥٪ وأفضل مصدر نتروجين كان الكازئين بتركيز ١٪ أذ حققت أفضل نمو واعلى فعالية لأنزيم البروتيز المنتج للفطر.كذلك حقق *Aspergillus oryzea*اعلى فعالية لأنزيم الأميليز ١٦,٣٥وحدة/مل وتركيز البروتين ٠,٤٨١ملغم/مل ,كما درس تأثير بعض العوامل على فعالية الأنزيم ,حيث كان تأثير العناصر المعدنية منشط للأنزيم وافضل مصدر كاربون كان الكلوكوز وتركيز ٣٪,وأفضل مصدر نيتروجين كان الببتون وتركيز ٣٪ .

قائمة المحتويات

الرقم	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة	II
الفصل الاول	المقدمة	١,٢,٣
الفصل الثاني	أستعراض المراجع	
٢-١	جنس *Aspergillus ssp.*	٤
٢-١-١	الخصائص التصنيفية	٤
٢-٢	المخلفات العضوية واثرها في البيئة وقابلية الاستفادة منها	٦
٢-٣	انزيم البروتيز والعوامل المؤثرة في انتاجه	٧
٢-٤	انزيم الأميليز	١١
٢-٤-١	والعوامل المؤثرة في انتاجه	١٣
الفصل الثالث	المواد وطرائق العمل	
٣-١	المواد والاجهزة المستخدمة	١٧
٣-٢	الاوساط الزرعية المستخدمة	٢٠
٣-٣	المحاليل والكواشف المستخدمة	٢١
٣-٤	طريقة Somogyi لتقدير السكريات المختزلة	٢٣
٣-٥	طريقة Bradford لتقدير تركيز البروتين	٢٤
٣-٦	عزل وتشخيص الفطريات	٢٦
٣-٧	الكشف عن الفطريات المحللة	٢٧
٣-٨	تقدير كفاءة الانواع الفطرية المنتخبة على تحلل الكازين	٢٧
٣-٩	تحديد الظروف المثلى للفطر *Aspergillius niger* لانتاج انزيم البروتيز	٢٨
٣-١٠	تقدير كفاءة الانواع الفطرية المنتخبة على تحلل النشأ	٢٩
٣-١١	تحديد الظروف المثلى للفطر *Aspergillius oryzae* لانتاج انزيم الأميليز	٣٠

الفصل الرابع	النتائج	
٤-١	عزل الفطريات المرافقة للمواد الغذائية المحلية	٣١
٤-٢	النسبة المئوية للتردد Frequency %	٣٢
٤-٣	الكشف عن الفطريات المحللة	٣٢
٤-٣-١	البروتين	٣٢
٤-٣-٢	الاميليز	٣٤
٤-٤	تقدير كفاءة الانواع الفطرية المنتخبة على تحليل الكازئين	٣٥
٤-٥	تحديد الظروف المثلى للفطر *Aspergillus niger* لإنتاج أنزيم تحلل البروتين	٣٦
٤-٦	تقدير كفاءة الانواع الفطرية المنتخبة على تحليل النشأ	٤١
٤-٧	تحديد الظروف المثلى للفطر *A.oryzae* لانتاج أنزيم تحلل النشأ	٤١
	الاستنتاجات	٤٦
	التوصيات	٤٧
	المصادر	٤٨

قائمة الجداول

رقم الجدول	الموضوع	رقم الصفحة
١	المواد الكيميائية المستخدمة	17
٢	الاجهزه المستخدمة	19
٣	تحضير تراكيز من (محلول B)	٢٣
٤	تحضير تراكيز متدرجة من محلول البومين المصل البقري	٢٤
٥	النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة من بعض المواد الغذائية	٣٢
٦	نسبة التردد (%) للفطريات المعزولة من بعض المواد الغذائية	٣٢
٧	تحلل النشا بفعل الاميليز المنتج من الفطريات على وسط النشأ عند درجة حرارة ٢٨ مْ لمدة حضن ٣ أيام	34
٨	، الفعالية الانزيمية لأنزيم البروتييز وتركيز البروتين الذائب على الوسط عند درجة حرارة ٣٠°م وبأس هيدروجيني٦ ولمدة ٣ ايام حضانة	36
٩	الفعالية الانزيمية لانزيم الأمليز وتركيز البروتين الذائب على وسط الانتاج عند درجة حرارة٣٠مْ وبأس هيدروجيني٤,٥ ولمدة ٣ ايام حضانة	41

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
١	المنحنى القياسي لتقدير الكلوكوز	٢٥
٢	المنحنى القياسي لتقدير البروتين	٢٥
٣	فعالية الفطريات في تحليل البروتين على وسط أكار الحليب المقشود عند درجة حرارة ٢٨م بعد ثلاثة ايام من الحضن.	33
٤	الفطريات الشديدة الفعالية في انتاج انزيم الاميليز على وسط اكار النشأ النقي عند درجة حرارة ٢٨م وحضن لمدة ٣ أيام.	٣٥
٥	تأثير العناصر المعدنية على فعالية انزيم البروتيز وحدة/ملغم بروتين	٣٧
6	تأثير مصادر مختلفة من الكاربون على فعالية انزيم البروتيز وحدة/ملغم بروتين	٣٨
7	تأثير تراكيز مختلفة من الكلوكوز على فعالية انزيم البروتيز وحدة/ملغم بروتين	٣٩
8	تأثير مصادر مختلفة من النتروجين على فعالية انزيم البروتيز وحدة/ملغم بروتين	٤٠
9	تأثير تراكيز مختلفة من الكازين على فعالية انزيم البروتيز وحدة/ملغم بروتين	٤٠
10	تأثير العناصر المعدنية على فعالية انزيم الأميليز وحدة/ملغم بروتين	٤٢
١١	تأثير مصادر مختلفة من الكاربون على فعالية انزيم الأميليز وحدة/ملغم بروتين	٤٣
١٢	تأثير تراكيز مختلفة من الكلوكوز على فعالية انزيم الأميليز وحدة/ملغم بروتين	٤٣
١٣	تأثير مصادر مختلفة من النتروجين على فعالية انزيم الأميليز وحدة/ملغم بروتين	٤٤
١٤	تأثير تراكيز مختلفة من الببتون على فعالية انزيم الأميليز وحدة/ملغم بروتين	٤٥

المقدمة

Introduction

المقدمة Introduction

تلعب الفطريات دوراً مهما في الطبيعة اذ تحطم الكربوهيدرات والبروتينات المعقدة في الأجسام الميتة لصالح تغذيتها ونموها وتكاثرها (Nester et.al,1998),كما تم الاستفادة من خاصية افراز الانزيمات من قبل بعض الانواع الفطرية في إنتاج الإنزيمات والأحماض العضوية التي تدخل في الصناعات الغذائية مثل أنزيم الأميليز وحامض الستريك ، كذلك استخدمت الفطريات في إنتاج بعض أنواع الاجبان(Stanley,1998) . وتعد الفطريات المجموعة الثانية من الأحياء المجهرية التي تنتشر في الأغذية بعد البكتريا . ولقد اكتشفت منها حتى الآن اكثر ١,٥-٥ مليون نوعاً منتشراً في بيئات مختلفة كالماء والتربة والهواء وعلى سطوح الأجسام ومنها الإنسان والحيوان والنبات (Doyle et.al,1997) . وللعديد من أنواعها الرمية والطفيلية الاختيارية فائدة للإنسان بسبب ما تنتجه من مشتقات أيضية مثل الأحماض العضوية والمضادات الحيوية والكحولات والإنزيمات والهرمونات ويستفاد كذلك من بعض الأنواع للحصول على الدهون والبروتينات ومنها ما يدخل في الصناعات الغذائية كالخبز وفي صناعة الأجبان والأغذية المتخمر (Anke,1997; Hamlyn,1997) . وبمرور الزمن ازدادت الحاجة الى منظفات للبيئة نتيجة الطلب المتزايد على الغذاء والطاقة لجميع الكائنات الحية، والأحياء المجهرية تعد مصدرا حيويا لا ينضب يمكن الاستفادة منه لكلا المجالين(Olsson,2004).تلعب الأحياء المجهرية دوراً كبيراً في تحليل المخلفات العضوية ,ومن خلال تنمية أنواع معينة من تلك الإحياء (الفطريات الخيطية والبكتريا والخمائر) على المخلفات وتحت ظروف معينة.يمكن تحويل المخلفات إلى مواد بسيطة قابلة للهضم ، وإنتاج مواد غذائية ذات قيمة عالية كبروتينات الخلية الواحدة تستخدم في أغذية الإنسان والحيوان ، وعن طريق التحطيم الإنزيمي للمواد المعقدة بفعل انزيمات خاصة تفرزها الأحياء المجهرية لغرض ديمومة حياتها ونموها(Chang &Thayer ,1975).

تفرز الأحياء المجهرية أنواعا عديدة من الإنزيمات الهاضمة وقد سجلت هذه الأحياء المجهرية قابلية هضم عالية للأغذية المخمرة من خلال تغيرات تحصل بمستويات البروتين والدهون والكربوهيدرات ،وتحلل هذه المواد يأتي من خلال إفراز الإنزيمات الخارج خلوية مما يجعل المواد الغذائية المخمرة سهلة الهضم والامتصاص وعملية التحلل هذه ناتجة من خلال كفاءة النشاط الإنزيمي لهذه الأحياء ،ونتيجة هذا التحلل يكون ارجاع المواد الاولية للتربة بحيث تستطيع النباتات امتصاصها من جديد واهم هذه العناصر الكربون والنيتروجين والفسفور. ولولا هذه العملية لتراكمت كميات كبيرة من الفضلات على سطح الارض دون الاستفادة منها ولسببت حتما انقطاعا في الدورة الحياتية لجميع الكائنات الحية.

تمثل البروتييزات خليط من الإنزيمات المحللة للمواد البروتينية توجد في جميع الكائنات الحية تقريباً وتشمل الحيوانات والنباتات والأحياء المجهرية ، و هذه الإنزيمات تشغل موقعاً حيوياً بالغ الأهمية و تلعب أدواراً فسيولوجية ،بالإضافة إلى التطبيقات التجارية والطبية فهي تؤدي وظيفتي التحلل والبناء(Mala et.al,1998)،وتعد البروتييزات من الإنزيمات التي لها دورا مهما لنمو وتكاثر الأحياء المجهرية وينتمي أنزيم البروتييزالى أنزيمات التحلل المائي والذي يعمل على تحلل الأصرة الببتيدية(Qadar,2009; Ayaz&Muhammad,2010) يمكن استخدام الأحياء المجهرية على أوساط ذات كلفة واطئة لسد الحاجة من البروتين للاستهلاك البشري والحيواني مثل المخلفات الصناعية ومخلفات وأغلفة الحبوب ومخلفات المجازر،لرخص ثمنها وسهولة استخلاصها إضافة إلى الكفاءة العالية لبعض السلالات في إنتاج الإنزيم ، عوضا عن كلفة الاستخلاص العالية للبروتييزات الحيوانية .

قدر الانتاج السنوي من بروتييزات الاعفان بعشرة أطنان وحوالي خمسين طناً من بروتييزات البكتريا (Dunil,1980) وتمثل مبيعات البروتييزات الميكروبية حوالي 40 %من مبيعات الأنزيمات في العالم (West & Godfrey,1996). و بالرغم من إمكانية الحصول على البروتييزات من مصادر متنوعة مثل النبات والحيوان لكن الأحياء المجهرية تعد مصدراً لايضاهى لإنتاج البروتييزات فضلا عن امكانية معالجتها وراثياً (Chakrabarti,2005& Stotey).

كما وان للاحياء المجهرية قدرة عالية على إنتاج انزيمات تحلل أخرى,مثل الإنزيمات المحللة للنشأ (الاميليز) لإعطاء انتاج متنوع من الدكسترين والبوليمرات الأصغرالمتكونه من وحدات الكلوكوز. تضم مجموعة الفا أمليز مجموعة من الانزيمات مع مجموعة خاصة مختلفة تعمل على نوع واحد من بقايا الكلوكوز تتكون من خلال أواصر كلايكوسيدية (α-1,6;α-1,4;α-1,1) (Gupta et.al,2003).هذه الانزيمات توجد في الانسان والحيوانات والنباتات والاحياء المجهرية (Pandey et.al,2000)، واستخدم الاميليز الفطري على نحو واسع في الصناعة اكثر من المنتج من البكتريا لكونها اكثر استقرارا، وقد بذلت محاولات كثيرة لتحسين مزارع وسلالات مناسبة للفطريات لتستوفي معايير الانتاج التجاري (Reddy et.al,2003:Abu et.al,2005). كما ان عملية تحويل النشاء الى سكريات بسيطة او ما يعرف بصناعة النشاء (Starch industry) تعتمد كليا على الأميليز . وكذلك يستخدم الفا اميليز في المجالات الطبية والزراعية الممرضة للنبات,وفي صناعة العصائر والاختمار وصناعة الورق.وفي صناعة النسيج(Textile industry) يستخدم الاميليزلإزالة عجينة النشاء المضافة في مراحل التصنيع الاولى لتقوية خيوط النسيج كما تضاف هذه الانزيمات في صناعة

المنظفات وتحضير الاعلاف الحيوانية(Novo,2004; Ashie,2003; ALseoha,2002).كما وان النفايات النباتية يمكن ان تستعمل كمصدر جيد لنشاط الاميليز(karthick ,2011 & Nirmala).

يعتبر *Aspergillus niger* من الفطريات ذات القدرة العالية على انتاج كميات كبيرة من الاميليز ويستخدم لإنتاج إنزيم الفا اميليز الذي له اهمية اقتصادية (sidkey ,وأخرون ٢٠١٠).

هدفت الدراسه الى:

١- الاستفادة من الفعالية الانزيمية لبعض انواع فطر .*Aspergillus ssp* المعزولة من مواد غذائية مختلفة في تحليل المركبات العضوية.

٢- تأثير بعض العناصر الغذائية في الفعالية الانزيمية للفطريات المدروسة.

وذلك من خلال المحاور التالية :

١- تشجيع نمو الفطريات على عدد من المواد الغذائية من الاسواق المحلية.
٢- عزل وتشخيص بعض الانواع التابعه للـ *Aspergillus*
٣- اجراء تجارب أولية على وسط أكارالحليب المقشود ووسط أكارالنشأ لمعرفة قدرتها على انتاج انزيمي البروتييز والأميليز.
٤- تلقيح وسط انتاج الأنزيم وتقدير الفعالية الأنزيمية لمعرفة الأكثر فعالية منها في انتاج الأنزيم واجراء الظروف البيئية المختلفة عليها.
٥- دراسة تأثير العناصر المعدنية على الفعالية الأنزيمية.
٦- دراسة أفضل مصدر كاربوني وأفضل تركيز على الفعالية الأنزيمية.
٧- دراسة أفضل مصدر نتروجيني وأفضل تركيز على الفعالية الأنزيمية.

أستعراض المراجع
Literature Review

الفصل الثاني

استعراض المراجع Literatures review

٢-١ الفطـــــر *Aspergillus ssp.* (الرشاشيات)

2-١-١ الخصائص التصنيفية

صنف (Fennell & Raper,1965) جنس*Aspergillus ssp.* ضمن العائلة Moniliaceae التابعة الى رتبة Moniliales وتسمى أيضاً Plectoscales , وتتكاثر معظم هذه الفطريات لاجنسياً , وهناك بعض الأنواع تتكاثر جنسيا إذ انها تسلك سلوك الفطريات الكيسية , بتكوين ابواغا كيسية (Ascospores) منتظمة داخل أكياس (Asci) وتكون الأخيرة مطمورة ضمن جسم ثمري كروي الشكل (Cleistothecium) (Bennett &Kown-Chung,1992؛ Hocking& Pitt,1997) . إنَّ مستعمرات*Aspergillus ssp.* ذات ألوان مختلفة تختلف بحسب لون الأبواغ منها: الأبيض والأصفر والبني والرصاصي والأخضر والوردي والأزرق والتبني والأسمر المائل الى الصُفرة أو الأسود (Bennett &Kown-Chung,1992) .

يتميزالغزل الفطري بنموه الغزير, وكثرة تفرعاته ومقسم داخليا الى خلايا ,تحوي كل خلية عددا من الأنوية تنتشر في السايتوبلازم الذي يحيط بفجوة عصارية ويوجد الغذاء المخزون داخل الخلية على هيئة حبيبات زيتية , و لون الغزل الفطري يختلف باختلاف أنواعه فمنه الأبيض والأخضر والأسود والأصفر (Abu Hila,1987) .ينشأ الحامل البوغي (Conidiophore) عموديا من الخلية القدمية (Foot cell) في الخيط الخضري ،والحامل البوغي يكون غير متفرع , وغالباً غير مقسم , وعديم اللون في جميع انواع*Aspergillius ssp.* الممرضة . وقد يحتوي في أنواع قليلة على حاجز أو حاجزين في حالات نادرة . وبمعظم الأنواع يكون عرض الحوامل البوغية اكبر من عرض الخيوط الفطرية , وجدار الحامل البوغي يكون اسمك من جدار الخيط الفطري . والحوامل البوغية تكون ملساء في أغلب الأنواع الممرضة , ماعدا *A.oryzae*, *A.flavus* و*A.avenaceus* , تنتج حوامل بوغية خشنة . وتتسع قمة الحامل البوغي ليكون الحوصلة (Vesicle), تكون أشكالها: كروية أو شبه كروية أو اهليجية أودورقيه أوصولجانيه وينشأ من سطحها التراكيب القارورية (Phialides) التي تكون أما بصف واحد من الفياليد أو بصفين . وفي الانواع ثنائية الصف (Biseriate) تكوّن الصفوف الاولية من الخلايا (التراكيب القارورية الاولية) عادة من اثنين الى ثلاثة من التراكيب القارورية الثانوية (Kown-Chung,1992 &Bennett) . ويتراوح طول التراكيب القارورية (Phialides) بين ٢٠-٣٠ مايكروميتر وسمكها

٥-١٠ مايكروميتر , وهي احادية أو متعددة الانوية , وتنشأ الأبواغ عند قمتها بتعاقب قاعدي (Basipetal) بشكل سلسلة (Fennell& Raper,1965) تكون الاقدم في القمة والاحدث في القاعدة . وقد تكون الأبواغ ملساء كما في الفطر *A.terreus* او مشوكة كما في الفطر *A.niger* , واغلب الأنواع التابعة للجنس *Aspergillus ssp.* تكون الأبواغ كروية الى اهليجية الشكل , نافرة جداً للماء , تحمل بالهواء بسهولة بعد نضجها , وتتباين الوانها من الغامقة الى الفاتحة (Kown-Chung,1992 ؛ Bennett& Hocking & Pitt,1997). ويطلق على الحوصلة (Vesicle) والتراكيب القارورية (Phialides) وسلاسل الأبواغ (Conidial chains) بالرأس البوغي (Conidial head)، إذ يكون شكل الرؤوس البوغية بشكل الحوصلة وترتب التراكيب القارورية عليها , اما لونها يتحدد من لون الأبواغ التي تحملها , ويعد كل من لون وشكل وحجم الرؤوس البوغية خصائص تصنيفية للأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* (Fennell& Raper,1965).

توجد أنواعاً قليلة من جنس*Aspergillus ssp.* تنتج في طورها الجنسي أجساماً ثمرية كروية (Cleistothecia), وتختلف الأجسام الثمرية في الحجم واللون من نوع الى آخر , ويتكون الجسم الثمري من طبقة رقيقة من الخلايا التي تكون مسطحة عادة , وتدعى هذه الطبقة بجدار الجسم الثمري , يضم في داخله الكثير من الأكياس البوغية يحوي كل منها ثمانية أبواغ كيسية (Ascospores) . (Shukri,1991)

وقد وجد في عزلات من *A.niger* و*A.flavus* و*A.oryzae* , *A.ochraceus*و*A.candidus* قدرة على تكوين تراكيب قاسية كبيرة نسبياً غامقة اللون , منفصلة ومفردة تدعى الأجسام الحجرية(Sclerotia) . وتتغاير الاجسام الحجرية في الشكل والحجم واللون , لكنها جميعاً تتكون من خلايا شبه برنكيمية سميكة الجدران (Kown-Chung,1992 &Bennett). وتحتوي الخيوط الفطرية على خلايا هولHülle cells التي تعد تراكيب متخصصة غير معروفة الوظيفة تحتل موقعاً طرفياً أو بينياً , ولها شكل كروي أوشبه كروي الى كمثري و متطاولة أو لولبية الشكل (Bennett& Kown-Chung,1992).

٢-٢ المخلفات العضوية وأثرها في البيئة وقابلية الاستفادة منها :

أصبحت مشكلة التلوث البيئي من أبرز مشكلات العصر ، فقد أزدادت نسبة التلوث بشكل كبير في الآونة الأخيرة عما كانت عليه في السابق ، وذلك بسبب التطور الصناعي والتكنولوجي وما يسببه من طرح مخلفات مؤثرة بصورة سلبية في بيئة الإنسان والحيوان والنبات بالإضافة الى إلحاق الضرر بالماء والهواء والتربة. هذه المشكلة الخطرة وجهت أنظار البشرية الى أيجاد حلول تقلل من أضرار المخلفات أو الاستفادة منها في مجالات تضمن إزالة التلوث بوسائل بسيطة وذات مردود اقتصادي عال (Southgate,1976).وتلعب المخلفات الزراعية دوراً كبيراً في التلوث البيئي نتيجة لزيادة الإنتاج الزراعي الذي أدى الى زيادة كمية المخلفات ، والمخلفات النباتية تعد من أكثر المواد العضوية الموجودة بصورة طبيعية والقابلة للتجديد ، وقد قدر حاصل الإنتاج النباتي على أساس الوزن الجاف بعملية التركيب الضوئي (٤-٢٦ طن / أيكر/ سنة) (Donovan et.al,1973).تعد قش الارز مادة عضوية متوفرة بكميات كبيرة في معظم مزارع الارز, قسم منها يحرق وقسم يزال من الحقول ومنها يترك في الحقل,نحو ١,٢ طن من قش الارز يتم انتاجه سنويا في ماليزيا,ويمكن تحويل قش الارز الى سكريات خلال عملية التحلل المائي الأنزيمي ثم يتخمر الى الايثانول عن طريق الخميرة (Jalil et.al,2010).وكذلك مادة الخشب هي كذلك مادة عضوية قابلة للتجديد وهي التركيب الرئيسي لجميع النباتات,ويتم انتاج النفايات بكميات كبيرة من قبل العديد من الصناعات بما في ذلك الغابات واللب والورق والزراعة والمواد الغذائية والنفايات الصلبة ونفايات الحيوانات (Wen et.al,2004 ; Dale& Kim,2004),هذه المخلفات يمكن ان تعامل بمواد لتصبح جاهزة للاستعمال في مجالات أخرى,اذ لاتزال متواجدة بكميات كبيرة في بعض البلدان النامية الأمر الذي يثير العديد من المخاوف البيئية (Levine,1996 ; Palacios-Orueta et.al,2005).

يجري استخدام المخلفات الزراعية في التخمرات السائلة و الصلبة على حَدْ سواء للحد من تكلفة اوساط التخمر ،ان هذه النفايات تتكون من الكربون والنيتروجين حيث يُعَدان من المصادرالضرورية للنمو والتمثيل الغذائي للكائنات الحية، وتشمل مصادر هذه المغذيات نفايات البرتقال والدخن والنشا والبطاطا والذرة والقمح والأرز والدقيق (Haq et.al,2005) . و هذا الإنتاج ثلثه الى نصفه يحصد كحبوب وثمار ونواتج أولية أخرى والمتبقي نواتج عرضية تترك في الحقول لتتحلل أو تتجمع كمرحلة نهائية . تعد الفطريات من أكفأ الكائنات المجهرية في الإنتاج الأنزيمي وإنتاج الكتلة الحيوية وذلك لقدرة هذه الكائنات على النمو على مصادر رخيصة (المخلفات الصناعية والزراعية) ،بالإضافة الى قدرتها على النمو بدرجات حرارة تزيد على ٣٥° م وفي مدى واسع من الاس الهيدروجيني وسهولة فصل كتلتها الحيوية عن الراشح الأنزيمي(Sonia et.al,2004).

٢ – ٣ أنزيم البروتييز والعوامل المؤثرة في أنتاجه:

تعد البروتييزات من الأنزيمات التي تشغل موقعاً حيوياً بالغ الأهمية تلعب ادواراً فيسيولوجية لنمو وتكاثر الأحياء المجهرية,وهي تؤدي وظيفتي التحلل والبناء (Mala et.al,1998) ولها أهمية صناعية وخصوصا في الصناعات الغذائية والمجالات الطبية.وينتمي إنزيم البروتييز إلى إنزيمات التحلل المائي EC 3.4. 23 والذي يعمل على تحلل الآصرة الببتيدية ١ ، 2 ،وتكون اما داخلية Endocellular (التي تكون داخل الخلايا ولا تفرز الى الوسط الا بعد تحلل الخلية) او تكون خارجية Extracellular (تفرز الى الوسط طبيعيا دون تحلل الخلية) وإنزيمات البروتييز الخارجية تكون اما تركيبية Constitutive (التي تفرز حسب حاجة الخلية) واما محتثة Inducible (بوجودها تفرزمادة محفزة تحث الكائن على إفراز الإنزيم) (Aunstrap,1980).

ان البروتييزات لها دور مهم في العديد من العمليات الفسيولوجية والطبية ولها تطبيقات واسعة في مجال الغذاء والصناعات الغذائية ، وقد أزداد الاهتمام بالانزيمات البروتييزية بعد النهضة الأوربية بهدف تطوير المضادات العلاجية(Venkata et.al,1993).

وتصنف أنزيمات البروتييز ضمن مجموعة أنزيمات التحلل المائي (Hydrolases)إذ يحفز تحليل الآصرة الببتيدية للبروتينات في مواقع مختلفة وتحت ظروف مختلفة وقد حاز أنزيم البروتييز التسمية النظامية EC.3.4 طبقا للجنة الأنزيمات التابعة للاتحاد العالمي للكيمياء الحياتية . (International union of Biochemistry,1992). يوجد الكثير من الأحياء المجهرية التي لها القابلية على انتاج الأنزيمات المحللة للبروتينات مثل البكتريا و الاعفان والخمائر ، وهذه الأنزيمات تختلف في تركيبها وصفاتها حسب الكائن المنتج وظروف نموها وتفضل انزيمات البروتييز الميكروبية على النباتية والحيوانية لأسباب عدة : منها سهولة عملية الاستخلاص وإنتاج أنواع مختلفة و كثيرة من الأنزيمات من قبل الأحياء المجهرية ، اضافةً إلى رخص ثمنها والكفاءة العالية لبعض السلالات في أنتاج الأنزيم (Yoshimoto&Tsurn ,1987). وهذه الأنزيمات تم إنتاجها على نطاق واسع من قبل بعض الفطريات التابعة للجنس *Aspergillus ssp*. ومن البكتريا باستغلال بعض أنواع الجنس*.Bacillus ssp* ، وينتج حاليا مايقارب العشرة أطنان من بروتييزات الفطريات وحوالي الخمسين طناً من بروتييزات البكتريا (Dunil,1980). يتم تقسيم انزيمات البروتييز اعتمادا على الأس الهيدروجيني الأمثل للفعالية إلى ثلاث مجموعات :

١ - البروتييزات المتعادلة Neutral Protease

ينتج هذا الإنزيم بوجود أيونات الكالسيوم والصوديوم والكلور للمحافظة على ثباته وصفاته الفيزيائية والكيميائية ، وهذا الأنزيم ينتج من قبل العديد من الفطريات مثل *A . oryzae* و*A . sojae* ويمتازالأنزيم بثباته عند درجة حرارة ٣٥-٤٥°م وبأس هيدروجيني ٧-٨.

٢ – البروتييزات القاعدية Alkaline Protease

ينتج هذا الإنزيم من قبل العديد من الفطريات مثل *A. flavus* و*A niger* و*A.sojae* و*A .oryzae*. الا ان معظم الإنتاج التجاري لهذا الإنزيم يتم الحصول عليه من بعض أنواع بكتريا *Bacillus ssp.* ويتميز الإنزيم البكتيري بثباته تحت ظروف حرارة مرتفعة ومدى واسع من pH يتراوح بين 6-١١ (Aunstrap,1980).

3-البروتييزات الحامضية Acid protease

الرنين والببسين الحيوانية والتي استخدمت تجاريا في صناعة الاجبان ، تنتج بصورة رئيسة من الفطريات *A. niger* و*R. chinensis* والعديد من الصناعات الغذائية الأخرى (Aunstrap,1968)، وكذلك الى عمليات تطرية اللحوم وتحصيل البروتينات من الخضروات (Vale – Vage,1984) وبعمليات دباغة الجلود وصناعة المنظفات واستخدم الانزيم في معالجة الجروح وإزالة الخثرة الدموية (Bickerstaft ,1987).

ان أهمية بروتييزات الأحياء المجهرية تاتي من مساهمتها بعدة وظائف خلوية تشمل ، تحول البروتين الخلوي (Turnover of cellular protein) لتجهيز الأحماض الامينية والببتيدات الصغيرة اللازمة لبناء البروتينات ،وتسهم في تكسير البروتينات الموجودة في الوسط الزرعي ثم تستخدم كمصدر غذائي لها , وكما تقوم بتثبيط بعض البروتينات التي لاتكون ضرورية خلال وقت النمو (North,1982). وتشير الدراسات والأبحاث الى ان هناك أجناساً وأنواعاً مختلفة من البكتريا والفطريات منتجة لإنزيمات البروتييز وهذه الأنزيمات تختلف في التركيب والصفات من كائن حي إلى آخر بحسب نوع الكائن وظروف نموه ، والبروتييزات المنتجة من قبل بكتريا *Streptomyces fradiae* و *S. rectus* والتي هي من البروتييزات القاعدية التي تتميز بالثبات الحراري ، وكما تعد البروتييزات التابعة لجنس *Bacillus ssp.* من أكثر الانواع المنتجة لبروتييزات السيرين القاعدية (Alkaline serine protease) التجارية والبروتييزات المعدنية المتعادلة (Neutral metallo protease) ، استخدمت البروتييزات بعض أنواع *ssp. Streptomyces* في صناعة المنظفات لتحملها درجة الحرارة والاس الهيدروجيني

العاليتين(Bickerstaft,١٩٨٧). ان بكتريا *Proteus ssp.* تتمكن من شطر السلاسل الببتيدية الموجودة في تركيب البروتينات المناعية بحيث تؤدي الى فقدان فعاليتها وبذلك تستطيع مقاومة الجهاز المناعي (Giovanna,2005).وفي دراسة أجراها شامي(Shumi et.al,2004)على ٢٥ مستعمرة ميكروبية لاختبار الفعالية البروتينية ، بينت النتائج أن بكتريا *B. fastidiosus* كانت لها أعلى فعالية انزيمية في تحليل البروتين (ألبومين البيض egg albumin وكازائين الحليب Milk casein والجيلاتين gelatin) والظروف المثلى للإنتاج هي ٣٥°م و pH = ٦,٥ ،وفي دراسة أجراها حسن (Hassan,1996) ، أستخدم فيها نخالة الحنطة لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *A . oryzae* لاحظ ان فعالية الأنزيم تزداد حتى تبلغ أقصاها في اليوم الرابع من مدة الحضن ثم تبدأ بالانخفاض بعد ذلك .ولاحظ (Rao et.al,2001) أن بكتريا *Pseudomonas fluorescens* تسبب تغيرات في بروتينات المواد الغذائية مثل كازائين الحليب وبروتين اللحم مما يؤدي إلى فسادهما .وقد قام (AL-Tai et.al,1988) بإنتاج أنزيمات البروتييز من الفطر *A . niger* من خلال تنميته على عصير التمر لمعرفة قدراته على تحلل البروتين.

يوجد عدد كبير من الفطريات الخيطية مثل *Aspergillus ssp.* و *Alternaria ssp.* و *Rhizopus ssp.* و *Penicillium ssp.* تفرز مديات واسعة من انزيمات التحلل عند تنميتها على أوساط زرعية غنية بالمحتوى البروتيني مثل علائق الدجاج ومخلفاتها (Osunlaja& Ogundero,1986).كما قام (Settakana,1992) ،باستخدام تقنية التخمرات الصلبة لفعالية أنزيم البروتييز من الفطر

A .oryzae باستعمال وسط فول الصويا وبين أن خلط مزرعة هذا الفطر مع مزرعة بكتريا *Bacillus subtilis B -73*وخميرة *Endomycopsis fibuligeras –S.5* يعطي فعالية عالية للأنزيم بالمقارنة مع استعمال مزرعة الفطر على حدة.

تتأثر فعالية انزيم البروتييز بعدة عوامل اهمها: العناصر المعدنية ومصدر الكاربون وتراكيزها ومصدر النيتروجين وتراكيزه في وسط الانتاج ،اضافة الى ان مكونات الوسط الزرعي المستخدم للتنمية له تأثير مهم في فعالية البروتييز, ولقد استخدمت العديد من هذه الأوساط منها ماهو صناعي أو طبيعي وهي تحتوي على مصادر بروتينية مثل نخالة الرز ونخالة الحنطة و دقيق فول الصويا و الحليب المقشود و شرش اللبن وغيرها (cholett& Mockellar,1984).

تحتاج الأحياء المجهرية للأملاح المعدنية لنموها ولإنتاج الإنزيمات إذ يمكن إضافة هذه الأملاح للأوساط الزرعية على شكل أيونات موجبة لأملاح غير عضوية مثل Ca^{+2} و Fe^{+2} وCo^{+2} وCu^{+2} وMg^{+2} وMn^{+2} وBa^{+2} ...إلخ . والحاجة إلى هذه المعادن تختلف باختلاف مصدر الإنزيم , إن هذه المعادن لها أهمية في الفعاليات الايضية يرجع إلى دورها الرئيس في تحفيز إنتاج الإنزيمات ,

و دورها في زيادة ثباتية بعض الإنزيمات مثل البروتييز , فضلاً عن دورها كمحاليل منظمة تعمل على المحافظة على الاس الهيدروجيني للوسط (Tambekar&Tambekar,2011؛ Takagi&Kumar,1999, ١٩٩٩ Demirkan&Sevinc,2011;). ذكريوستزرن(Ustyazharina et.al,1985) عند دراسة الفطر*A. oryzae* ان هناك زيادة في فعالية انزيم البروتييز عند انماء الفطر على الوسط الملحي المعدني الحاوي على حامض اللاكتيك ونترات الأمونيوم وارثوفوسفات البوتاسيوم الثنائية والأحادية النتروجين و كلوريد الكالسيوم وكبريتات المغنسيوم وكبريتات المنغنيز.وبين Holmquist et.al,1997)) ان الفطر *Geotrichum candidum* يمتلك قابلية عالية على انتاج انزيم البروتيز ويعتمد ذلك على مكونات الوسط الزرعي و ظروفه من الاس الهيدروجيني ودرجة حرارة وما لها من تأثير على فعالية الانزيم .وقد كانت كبريتات المغنيسيوم و كلوريد الكالسيوم وكلوريدالصوديوم و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية وبالتراكيز (0.1 و 2 و 0.5 و 2 و 4) غم /لتر , على التوالي من مكونات الوسط الإنتاجي لإنزيم البروتييزمن الفطر *Trichoderma reesei*. كما استخدم (2010, Zambara) فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية 0.2 % ونترات الأمونيوم 0.5 % وكلوريدالصوديوم وكبريتات المغنيسيوم 0.1 % في الوسط الإنتاجي لإنزيم البروتييزمن الفطر*R. microsporus* .

تؤكد معظم الدراسات أن المصدر الكربوني يحفز النمو ويتباين تأثيره على فعالية الأنزيمات فقد يكون محفزاً (Inducer) أو كابحاً للإنتاج (Repressor) Muthulakshmi et.al,2011)). فقداستخدمت مصادر كربونية مختلفة لإنتاج إنزيمي (Haq et.al,2008; Wang et.al,2005; البروتييز من أحياء مجهرية مختلفة ، كان الوسط الحاوي على الكازائين بتركيز١% قد حفز إنتاج إنزيم البروتييز (Pr1) و(Pr2) من الفطر *Beauveria bassiana* (Kaur&Dhar,2010).و تعد الكربوهيدرات المصدر الرئيسي لتحرير الطاقة التي تحتاجها الأحياء المجهرية للنمو (Haq et.al,2008) ،فالكلوكوز بتركيز 1% المصدر الكربوني الأفضل لفعالية البروتييز من الفطر809 DSM *Mucor mucedo* (Yegin et.al,2010) وبتركيز 0.9% لفعالية إنزيم الكايتينيز من الفطر *Alternata alternaria* (Ghanem et.al,2011) . ووجدت أعلى فعالية لأنزيم البروتييز (Pr1) و(Pr2) من الفطر *Metarhizium anisopliae* بوجود 1 % من كل من الكلوكوز وكيوتكل العث (Diamand moth cuticle) كمصدر كاربوني (Ali et.al,2011).ومن الضروري توفر المصدر النيتروجيني لمعظم الأحياء المجهرية ويكمن ذلك في أهمية النيتروجين في بناء الحوامض الأمينية وبالتالي بناء البروتين إضافة إلى الحوامض النووية ومكونات جدران الخلايا، إن إنتاج الإنزيمات وخصوصاً إنزيم البروتييز القاعدي

يعتمد على توفر المصادر الكربونية والنيتروجينية بحيث تبلغ نسبة النيتروجين في تركيب البروتييز مايقارب 15.6% وبالرغم من أن المصادر النيتروجينية المعقدة تستخدم عادة لإنتاج البروتييز القاعدي إلا أن الحاجة إلى مصادر نيتروجينية خاصة تختلف من كائن مجهري لآخر (Takagi& Kumar,1999).ان استخدام المصادر النيتروجينية العضوية له دورهام في تحفيز النمو وفعالية الإنزيم, اذ أوضح كلا من (Khachatourians& Bidochka,1988) ،أن الفطر *Beauveria bassiana* GK2016 ينتج البروتييزالسيريني الخارج خلوي عند تنميته في الوسط السائل الحاوي على الجيلاتين كمصدر نيتروجين ، وان تفوق الكازائين على الكلوكوز في تحفيزفعالية البروتييزونموالفطر *Metarhizium anisopliae* (Braga et.al,1999) .وقد كانت بيكاربونات الأمونيوم (NH_4HCO_3) من بين ثمانية مصادر نيتروجينية لا عضوية هي الأفضل لفعالية البروتييز المتعادل من الفطر *R. microsporum* NRRL3671 و باستخدام نخالة الرز(Rice bran) كمادة ساندة ,(Sumantha et.al,2006)، كما قام (Monod et.al,2002) بإنتاج أنزيم البروتييز من الفطر*A. fumigatus* مستخدماً بروتين الكولاجين مصدراً رئيساً للكربون والنتروجين ،وفي دراسة اجرها(Marchisio,1998), باستخدام الأوساط الزرعية الحاوية على الببتون كمصدر وحيد للنتروجين في عزل الفطريات الجلدية مثل وسط Sabouraud Glucose Agar و Mycobiotic Agar، وذكر(Ada& Okafer,2000) ، أن الفطر *Microsporium gypseum* يمتلك فعالية عالية لأنتاج أنزيم البروتييز (الكايتينيز) تمكنه من تحطيم الشعر عند تنميته عليه ,واستخدم (De Toni et.al,2002) الريش مصدراً وحيداً للكربون والنتروجين لأنتاج البروتييز (الكيراتينيز) من بكتريا *Xanthomononas meltophilia* .

٢-٤ -١انزيم الأمليز:

تنتج انزيمات الاميليز في كل من النباتات والحيوانات والميكروبات، أنها تلعب دورا رئيسيآ في التمثيل الغذائي للكربوهيدرات. وقد استخدمت انزيمات الاميليزمن المصادر النباتية والميكروبية لقرون باعتبارها المضافات الغذائية. ينتج انزيم الاميليزمن المصادر الفطرية والبكتيرية، وتستخدم للإنتاج الصناعي بسبب عدة مزايا مثل قلة التكاليف، وقلة الوقت والمساحة المطلوبة لإنتاجها وسهولة التعديل. (Sivaramakrishnan et.al,2006; Burhan et.al,2003)، ويعمل الاميليز على تحلل جزئيات النشا لإعطاء انتاج متنوع من الدكسترين و البوليمرات أصغر تتكون من وحدات الكلوكوزوالمالتوز. لذلك تسمى إنزيمات الأميليز بأنزيم تحلل النشا مائيا"(Fogarty,1983), وألفا أميليز يلعب دورا مهما في هضم النشا ,ويوجد حوالي ٢٥-٣٣٪ من سوق الانزيم بالعالم,وهو في الموقع الثاني بعد البروتييز(Rasooli Ben Abdelmalek-Khedher et.al,2008

; et.al,2008)استخدمت الفطريات وخصوصا جنس *Aspergillus.ssp.* حيث يُعَد هذا الجنس الأكثرشيوعا لإنتاج الأميليزعن طريق تخمير الحالة الصلبة (Solid-state) (SSF) fermentationباستخدام هذه تقنية من حيث التكلفة أرخص في مختلف المصادر الميكروبية , ان مجموعة ألفا أميليز تضم مجموعه من الانزيمات تعمل على نوع واحد من بقايا الكلوكوز ترتبط من خلال أواصر كلايكوسايد6,α-١,4,α-١,1,1-α, α. ويمكن تقسيمها إلى قسمين (van et.al,2002)، endoamylases وexoamylases. اذ تمثل مجموعة (Endoamylases) تكسر الاواصر داخل تركيب الفا اميليوز والاميلوبكتين.اذ تمثل مجموعة (Exoamylases) الكلوكوز الخارجي الاتصال للا اميلوزو الاميلوبكتين

.(Gupta et.al,2003; Itkor et.al,1989)

ويمكن تقسيم أنزيم الأميليز إلى المجموعات الرئيسية الآتيه :

١- أنزيم ألفا اميليز(α-amylases)

EC.3.2.1.1, α-1, 4-glucan-4-glucanhydrolase

توجد هذه الانزيمات في النبات والحيوان وهي انزيم تحليل النشا والأكثر وفرة في الكائنات المجهرية (Fogarty ,١٩٨٣). أن معظم انزيمات تحليل النشا تنتمي إلى مجموعة الفا الأميليز. هذه الانزيمات هي انزيم داخلي منفصل، بحيث تهاجم بشكل عشوائي آصرة كلايكوسايد α-1,٤ ،في أميلوز،أميلوبكتين،والكلايكوجين من اجل انتاج المواد النشوية والمالتوز والكلوكوز(Howling,1992; Priest,1989).وعلى الرغم من أن العديد من هذه الإنزيمات غير قادرة على مهاجمة الأصرة كلايكوسايد α-1, 6 (Kelly& Fogarty,1980)،الان العديد من الدراسات اوضحت ،أن بعض ألفا أميليز قادر على تحليل أصرة كلايكوسايدα-1,6 .وعلى سبيل المثال الفاأميليزالمنتجة بوساطة *Thermoactinomyces vulgaris& Streptococcus bovis* (Tonozuka et.al,1993) وكذلك العديد من الأبحاث ذكرت أن طريقة عمل هذا الانزيم على أميلوز يتكون من خطوتين: في الخطوة الأولى، يتم إنتاج مالتوزبينما حيث في الخطوة الثانية يؤدي الى انتاج الكلوكوز والمالتوز كمنتجات.

٢- أنزيم بيتا امليز(β-amylases)

E C. 3.2.1.2, α-1, 4-glucan maltohydrolase

يوجد الانزيم بشكل واسع بين أغشية المملكة النباتية وخصوصا في نقيع الحبوب مثل القمح وفول الصويا والبطاطا (Howling,1989). وقد تم عزل هذه الإنزيمات من الكائنات المجهرية المختلفة مثل *Bacillus megateruim* (Takekawa et.al,1991; Rhode & Friedberg,1986 ;Priest,1993).بيتا أميليز هو أميليزخارج منفصل التي تهاجم نهايات غير مختزلة في سلاسل من

أميلوز، أميلوبكتين والكلايكوجين مما يؤدي الى تكوين بيتا مالتوزكناتج نهائي (١٩٨٠, Fogarty kulp,1979; Kelly&) اثناء التحلل من أميلوبكتين والكلايكوجين، وينتج هذا الإنزيم، بالإضافة إلى بيتا المالتوز , وكميات من المواد النشوية التي ترتبط معا من خلال اصرة كلايكوسايد٦ ,١-α ويمكن أن يعزى ذلك إلى عدم قدرة هذا الانزيم لمهاجمة اواصر α-1,6 كلايكوسايد

(Howling,1989; priest١٩٩٣, ;Takasaki,1989; Fogarty,1983).

٣ - انزيم كلايكوأميليز(Glucoamylases)

amyloglucosidase وكذلك يسمى E.C. 3.2.1.3 α-1, 4-glucan glucohydrolase الفطريات هي المصدر الرئيسي لهذا الانزيم ويتم أنتاجه بشكل رئيسي من قبل *Aspergillus spp.* *Rhizopus spp.* و*Corticium rolfsii* ; et.al,1986 ; priest,1992 ; Fogarty,1983) Sakaki) هذا ألانزيم يهاجم الأصرة α-1,4كلايكوسايد في أمليوزوأمليوبكتين والكلاكوجين لأنتاج بقايا الكلوكوز من نهايات غير مختزلة. يمكن لهذا الأنزيم ايضا تحليل الاصرة α-1,3كلايكوسايد لكن بمعدل أبطأ من أصرة α-1,4 كلايكوسايد.

(Fogarty et.al,1993,1983 Tonozuka;).

٤- أنزيم isoamylase

EC. 3.1.2.68 Glycogen 6-glucanohydrloase

الانزيمات من هذه المجموعة لديها القدرة على مهاجمة الاصرة الكلايكوسايد ٦ ,١- αفي أمليوبتين والكلايكوجين والبولين. ويعد العالمان مايور وكوباش (Kobayshi & Mauro,1951) أول من عزل هذا الانزيم من الخميرة.تتكون هذه المجموعة من اثنين من الانزيمات الرئيسية أزو امليزوبولينيز. واحدهما يعمل على كلايكوجين وأمليوبكتين بينما الاخريعمل على أمليوبكتين وبيولينين .

٢- العوامل المؤثرة على انتاج الانزيم:

تتأثر فعالية انزيم الأميليز بعدة عوامل منها: العناصر المعدنية ومصدر الكاربون وتراكيزهما ومصدر النيتروجين وتركيزه في وسط الانتاج.ان مكونات الوسط الزرعي المستخدم للنمو له تأثير هام في فعالية الأميليز، وتم استخدام العديد من هذه الأوساط منها ما هو صناعي أو طبيعي مثل نخالة الرز ونخالة الحنطة ووسط جوز الهند ووسط زيت الفول السوداني وغيرها (et.al,2011 Suganthi). ومن المعروف أن انزيم الأميليز يعتمدعلى ايونات المعادن ,وهي أيونات ثنائية التكافؤ مثل Ca^{+2} و Fe^{+2}وCo^{+2} وCu^{+2} وMg^{+2} وMn^{+2} وBa^{+2} ...إلخ (Pandey et.al,2000) . وهذه المعادن تختلف الحاجة اليها باختلاف مصدر الإنزيم , ودور المعادن الثقيلة في إنتاج الأنزيم أمر بالغ الأهمية. وقد أظهرايونFe^{2+} أعلى فعالية انزيم µg/ml ١٢٤من جميع الأيونات المعدنية

الأخرى, لكن Hg^{2+} ٣٢µg/ml ثبط إنتاج الإنزيم (Arunsasi et.al,2010).ودراسة أجراها فرالكشما (Varalakshmi et.al,2009) استخدموا بعض من الأيونات المعدنية المختلفة مثل Co^{+2},Ca^{+2},Mg^{+2},Na^{+},وأملاح الكلوريد مثل $CoCl_2$,$CaCl_2$,$MgCl_2$,NaCl,وفعالية الأنزيم تقدر على الاس الهيدروجيني=6.8 وبدرجة حرارة٢٢± 2 ˚ م في وجود الأيونات المعدنية بتراكيز ١٠مايكرومول,ووجد ان أفضل نشاط للأنزيم بوجود الكالسيوم ، بينما ذكرأسكر(et.al,2007 Asgher) ، بأن الكالسيوم له تأثيرعلى نشاط الانزيم. وان أيونات Hg^{2+},and Cu^{2+},Co^{2+}ثبطت نشاط الانزيم . كما وجد ان ايون الصوديوم ثبط نشاط الأنزيم (Reyed,2007 Rahman&Mahmood,2008:)، وان الكالسيوم والنترات تلعبان دورا هاما في انتاج أنزيم ألفا أميليز بوساطة الفطريات,اما ايونZn^{+2} له تأثيرات متنوعة على انزيمات الأميليزالمختلفة. وبوجود ايونZn^{+2} انخفض نشاط انزيم ANT-6(Burhan et.al,2003) .

وان إضافة $CaCl_2$ الى وسط التخمر يزيد من انتاج الأنزيم (Vishwanathan ,2001 Surlikar&),بينما $CaCl_3$ و$MgSO_4$ لهما تأثيرا ايجابيا على انتاج الأنزيم (Francis et.al,2003). ومن أجل أنتاج الإنزيم المطلوب من قبل الكائنات المجهرية ، يجب أن يستكمل الوسط مع مصدر الكاربون المناسب ،كما ان الكائنات المجهرية لديها واحد فقط اوعدد قليل من مصادر الكربون الداعمة في إنتاج هذا الانزيم (Goodfellow et.al,1987).وقد وجد ان اضافة المالتوزوالفا – مثيل- دي- كلايكوسايد أدى الى انتاج ألفا أميليز أعلى بثلاثة اضعاف مما علية عندما تضاف الى الوسط كمصدر كاربوني فقط (Goto et.al,1998). أعطت *Bacillus sp*. اعلى كمية أميليز هضم النشأ في وسط يحتوي لاكتوز(١٪) وخلاصة الخميرة

(Hamilton et.al,1999) , وان الفطر *Thermomyces lanuginosus* أعطى اعلى انتاج من ألفا أمليز عند أضافة ملتوديكسترين الى الوسط (Nguyen et.al,2000),وتم دراسة تأثير مصادر الكاربون المختلفةعلى إنتاج إنزيم بوساطة محلول مكمل من الاملاح القاعدية ،الاس الهيدروجيني7 ، مع ٢٪ من مصادر كاربون مختلفة مثل الكلوكوز والمالتوز واللاكتوز والسكروز والنشا,و تم الحضن لمدة ٦ أيام في درجة حرارة الغرفة. وبإضافة مصادر كاربون مختلفة مثل كلوكوز,مالتوز,لاكتوز,ونشأ لم يحدث تغير في الانتاج. واظهر السكروز انتاج افضل (كان النشاط المحدد ٥٠ U / ملغم) لاسيما في وسط زيت الفول السوداني و وسط زيت جوز الهند كما يمكن ان يثبط الانتاج بواسطة اضافة مصدر كاربون(Suganthi et.al,2011). وفي دراسة أخرى وجد ان الكلوكوز والسكروزمكملات تؤدي الى كبح انتاج الانزيم (varalakshmi et.al,2009), قد ثبت ان أعلى إنتاجية من الفا اميليزمكتسب من المالتوز وخلاصة الشعير تستخدم كمصدر كاربون (Teodoro &Martines,2000) ، بينما أظهر أن الكلوكوز له تأثير كابح على الانتاج من انزيم

الامليزبواسطة*Bacillus sp*. ويشير باحثون اخرون الى ان النشا كمصدر للكاربون مناسبا للانتاج من ألفا الأمليز في العديد من أنواع البكتريا المختلفة. النشا هو مصدر الكربون في *Thermoactinomyces viridis* (Fogarty&Upton,1977 ; ١٩٩٨, LIN).ودراسات عديده تظهر مصادر مختلفة من الكاربون لها تأثير مغاير على انتاج انزيمات خارج خلوية خاصة لانتاج الأميليز,فقد ذكر ارتان (Ertan et.al,2006) انتاج الأميليزعالي بوساطة *chrysogenum Penicillium* في وسط التخمرات الصلبة (نخالة الحنطة) تستكمل مع اللاكتوز.وذكرهسلتين (Heseltine et.al,1996)الكلوكوز يكبح انتاج الامليز في *Sulfolobus solfataricus*, ولذلك الكلوكوز يمنع اداء جين الاميليز وليس قسم من الانزيم.ومصادر النيتروجين واحد من المصادر الأساسية لإنتاج الفا امليز.وتستكمل الاوساط بمصدر للنيتروجين (غير عضوية أو عضوية) (Hartman & Kuo,1966) .

ان تأثير مصدر النيتروجين يختلف بين الكائنات الحية المجهرية من واحد إلى آخر (Fogary&Upton,1977) ، حيث وجد انه من بين ثمانية مصادر نيتروجين مختلفة تم اختبارها على *T.viridis* ان الببتون يعطي انتاجية عالية من الفا امليز ،بينما وجدت كبريتات الأمونيوم هو أفضل مصدر للإنتاج من *Thermoactinomyces sp.* (Odibo&Obi,1984) وتعد خلاصة الخميرة افضل مصدر نتروجين لإنتاج الامليز و حقق محتوى في المعادن ,الفيتامينات, مساعد الانزيم ومركبات النتروجين (Pastrana & Guerra,2002), ان انتاج الامليز من الفطر *A. oryzae* في وسط التخمر من بقايا السكر يمكن ان يؤثر بشكل كبير بمصادر النتروجين عضوي خاصة خلاصة الخميرة (Perez-Guerra & Renato,2009) .

كما تم دراسة تأثير مصدر النيتروجين في إنتاج إنزيم في محلول الملح القاعدي، الاس الهيدروجيني7 ، مع ٢٪ من $NaNO_3$، $SO_4(NH)_4$ ، NH_4Cl، NH_4 NO_3 وKNO_3، وحضنت في درجةالحرارة الغرفة لمدة ٦ أيام. واستخدمت كمصدر للنتروجين مع مواد اساسية صلبة , ومصادر النيتروجين تؤدي إلى زيادة كبيرة في إنتاج إنزيم الاميليز(كان نشاط محدد ٣٢٠ U / ملغ) في وسط زيت الفول السوداني ,وهناك زيادة في إنتاج الأميليز في الوسط الحاوي على نترات الأمونيوم بأضافة مواد تحتوي على كلوريد الأمونيوم وسط زيت جوز الهند (Suganthi et.al,2011).وتعتبر مصادر النتروجين (العضوية أو غير العضوية) مكملات لغرض زيادة انتاج الأميليز بواسطة الفطريات في وسط التخمرات الصلبة (Pandy et.al,2005) .

ووجد مصادر النتروجين يحسن انتاج الكائن الحي وزيادة في الكتلة العضوية (Ravindra& Anupam,2001) .وأن الببتون,نترات الصوديوم و الكازين هو مصدرنتروجين جيد من انتاج الامليز في*A.niger ,A. fumigates* (Got et.al,1998).وانتاج عالي للامليز

باستخدام خلاصة الخميرة والكازين بواسطة *A. oryzae* (Neilson& Pederson,2000),وفي دراسة أخرى وجد أن الببتون يؤدي الى زيادة في انتاج الأنزيم في الوسط جوز الهند (Ramachandran et.al,2004),وخلاصة الخميرة والببتون هو ضرورة لنمو وصناعة الانزيم بواسطة *B. cereus* (Teodoro& Martins,2000).

أن معظم الكائنات المجهرية تفضل مصدر النيتروجين في شكل أملاح الأمونيوم وبعض الكائنات غير قادره على الاستفادة من مصادر النيتروجين في شكل أيونات النترات (1993,Priest).وتعتبر خلاصة الخميرة كمصدر نتروجين عضوي جيد في انتاج الانزيم لكل من الفطريات والبكتريا (Oshoma et.al,2010; Roohi et.al,2011; Irfan et.al,2012 ;Valaparla,2010).

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1المواد و الاجهزة المستخدمة

جدول (١) المواد الكيميائية المستخدمة

تسلسل	اسم المادة		الشركة المصنعة
١	اليود		Fluka(Switzerland)
2	كاربونات الصوديوم اللامائية	Na_2C0_3	Fluka(Switzerland)
3	كبريتات النحاس المائية	$CuSO_4.5H_2O$	Fluka(Switzerland)
4	3,5- Di NitroSalicylicAcid داي نتروسلسيلاك اسد		Fluka(Switzerland)
5	كبريتات الامونيوم	$(NH_4)_2SO_4$	Fluka(Switzerland)
6	مولبيدات الامونيوم	MO_4NH_4	Fluka(Switzerland)
7	صبغة الكوماسي الزرقاء G-250 Blue G -250	Coomossie Brilliant	BDH(England)
8	حامض الخليك ثلاثي الكلور(TCA)		BDH(England)
9	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	(KH_2PO_4)	BDH(England)
10	فوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين	(K_2HPO_4)	BDH(England)
11	كلوريد الكالسيوم	$CaCl_2$	BDH(England)
12	هيدروكسيد الصوديوم	NaOH	BDH(England)
13	حامض الهيدروكلوريك	HCl	BDH(England)
14	كلوريد الصوديوم	NaCl	BDH(England)
15	الكازائين	Casein	BDH(England)
16	ارسينات الصوديوم	Na_2A	BDH(England)
17	حامض الكبريتيك	H_2So_4	BDH(England)
18	كلوكوز	$C_6H_{12}O_6$	BDH(England)
19	كبريتات المغنسيوم المائية	$MgSO_4.7H_2O$	BDH(England)

20	كلوريد البوتاسيوم	KCl	BDH(England)
22	حليب فرز	Skim milk	BDH(England)
23	كاربونات الصوديوم الحامضية	$NaHCO_3$	BDH(England)
24	كبريتات الصوديوم اللامائية	Na_2SO_4	BDH(England)
25	فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين	NaH_2PO_4	BDH(England)
26	فوسفات الصوديوم احادية	Na_2HPO4	BDH(England)
27	كحول أثيلي	Ethanol	BDH(England)
28	النشأ	Starch	تجاري
29	سكروز	Sucrose	تجاري
30	وسط اكار البطاطا والدكستروز الجاهز PDA		HIMEDIA-India
31	اكار-اكار	Agar-Agar	HIMEDIA-India
32	خلاصة الخميرة Yeast Extract		HIMEDIA-India
33	ألبومين المصل البقري BSA		HIMEDIA-India
34	الببتون	Pepton	HIMEDIA-India
٣٥	الكلوراكس		تجاري

جدول (٢) الاجهزة المستخدمة

اسم الجهاز		الشركة المصنعة
1. حاضنة	Incubator	DAIHAN Lab Tech-Korea
2.تقطيرالماء	Distilled Water	DAIHAN Lab Tech-Korea
3.ميزان حساس	Analytical Balance	Sartorius-Germany
4.مجهر ضوئي	Light Microscope	Humascope-Germany
5. مؤصدة	Autoclave	Allamerican-USA
6.مقياس الاس الهيدروجيني	pH- Meter	Hanna-Portugal
7. مفرغ هوائي	Vacuum Pump	Yangyi
٨. فرن كهربائي	Electrical Oven	Heraeus
٩. حجرة تلقيح	Hood	Tianjin Taisite-China
١٠.جهاز الطيف الضوئي	spectrophotometer	Aurora Instruments Ltd (England
١١.جهاز طرد مركزي مبرد	(Cooling Centrifuge)	Hettich-Germany

3–٢ الاوساط الزرعية المستخدمة

١- وسط بطاطا دكستروز أكار Potato Dextrose Agar (PDA)

حضر الوسط الجاهز من انتاج شركة HIMEDIA – India بإذابة 39 غم من مسحوق الوسط في لتر واحد من الماء المقطراستخدم لنمو الفطريات .

2- وسط الزابك CzapekDox Agar

حضر الوسط بحسب طريقة Tuite (1969) و ذلك بإذابة 20 غم من الأكار – أكار في 500 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ، و أذيبت باقي مكونات الوسط و التي تشمل 30 غم سكروز و 2 غم $NaNO_3$ و 1 غم K_2HPO_4 و 0.5 غم من $MgSO_4$ و 0.5 غم من KCL و 0.01 غم من $FeSO_4$ في 400مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ثاني ، بعد ذلك مزجت محتويات الدورقين في دورق زجاجي واحد و اكمل الحجم الى 1 لتراستخدم لتشخيص الفطريات .

٣ -وسط أكار الحليب المقشود Skimmed – milk Agar

حضر بأذبة ١غم من مسحوق الحليب في ١٠مل ماء مقطر كما ذوب ٢غم من الاكار في ٩٠ مل ماء مقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٦ عقم المحلولان كلاً على حدة ومزجا بعد تبريدهما الى درجة حرارة ٤٥ مْ وصب الوسط في أطباق بتري معقمه Bilinsk (١٩٨٧).

٤- وسط إنتاج انزيم البروتييز Protease Product

تم إضافة ($CaCl_2$(% 0.1) , KH_2PO_4(% 0.7) ,K_2HPO_4 (%0.٤), (% ٠،٠١) casein(٪١), Glucose (% 1), $MgSO_4.7H_2O$ وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 6 باستخدام فوسفات البوتاسيوم المنظم حضر الوسط حسب طريقة Hassan (١٩٩٦)

تم تعقيم جميع الأوساط بدرجة ١٢١°م وضغط ١ بار لمدة ١٥ دقيقة ماعدا وسط الحليب المقشودالذي عقم لمدة ٥ دقائق كما أضيف المضاد الحيوي كلورومفنيكول Chloromphenicol إلى الأوساط الزرعية بتركيز ٢٥٠ ملغم / لتر لتثبيط نمو البكتريا بعد التعقيم.

5-وسط أكارالنشأ Starch Agar

حضر بأذبة ١٥غم من النشأ و١غم K_2HPO_4 و0.5 غم من $7H_2OMgSO_4$. و١٥غم من الأكار في لتر من الماء المقطرحسب طريقة Sarhan(٢٠١٢) المحورة(حذف خلاصة الخميرة) .

6- وسط انتاج انزيم الأميليز Amylase Product

الوسط يتكون من (٣٪)Glucose و(٠،٣%) $MgSO_4.7H_2O$ و (٢،٢%)Pepton و (٣٪) KH_2PO_4 وعدل الى PH٤،٥ وعقم عند درجة حرارة ١٢١ مْ ولمدة ١٥ دقيقة حسب طريقة AL- Hussuna (٢٠٠٥) مع تحوير pH.

تحضير الراشح الانزيمي:

تلقيح وسط الانتاج بفطر بقرص ١٠ ملم ويحضن لمدة ٣أيام وبعدها يرشح الوسط ويأخذ الراشح الانزيمي وتجري عليه تقدير الفعالية الانزيمية للفطر.

٣-٣المحاليل والكواشف المستخدمة:

١-**محلول اليود** Iodine solution :حضربأذابة ١غم من اليود في ١٠٠ مل من الماءالمقطر (Pandey et.al,2006) .

٢- محلول ا لفوسفات الدارىء Phosphate buffer بتركيز M ٠,٢

أ - محلول $NaH_2PO_4.2H_2O$ بتركيز M ٠,٢ حضربإذابة ٣١,٢ غم منه في كمية قليلة من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى لتر.

ب - محلول Na_2HPO_4 بتركيز M ٠,٢ حضر من إذابة ٢٨,٣٩ غم منه في لتر ماء مقطر ,مزج المحلولان معاً بحسب الاس الهيدروجيني المطلوب (Craickshank et.al,1982).

٣- محلول ثلاثي كلورو حامض الخليك Trichloroacetic acid(TCA)(٥٪)

اذيب ٥غم من ثلاثي كلورو حامض الخليك (TCA) في كمية من ماء مقطر مع التحريك ، اكمل الحجم الى ١٠٠ مل .

4- محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز (0.5M)

ذوب ٢٠ غم من NaOH في لتر ماء مقطر .

٥ - محلول ا لكازائين (٠,٥ %)

حضر من اذابة ٠,٥ غم من الكازائين في ٩٠ مل من محلول الفوسفات الدارىء بتركيز 0.2M و سخن بدرجة ٨٠°م لحين ذوبان الكازائين عدل الاس الهيدروجيني الى ٦ بإضافة بضع قطرات من محلول NaOH بتركيز0.5M وأكمل الحجم إلى ١٠٠ مل وأستخدم المحلول لتقدير فعالية انزيم البروتييزProtease (Hassan,1996).

6 – كاشف ا لنحاس Cupper reagent

أ- حضر من المحلولين الآتيين :-

ذوبت ٦ غم ترترات صوديوم – بوتاسيوم و ١٢ غم كربونات الصوديوم اللامائية في ١٢٥ مل ماء مقطر ثم أضيف لها ٢ غم كبريتات النحاس المائية و٨ غم كربونات الصوديوم الحامضية وذوبت المكونات جيداً ثم رشحت .

ب- ذوبت ٩٠غم كبريتات الصوديوم اللامائية في ٢٥٠ مل ماء مقطر وسخنت لحين اختفاء الفقاعات ورشحت وهي ساخنة ثم خلط المحلولان(أ مع ب) وأكمل الحجم إلى ٥٠٠ مل بالماء المقطر(Somogyi,1952).

7 – كاشف نيلسون Nelson's reagent

أذيب ٢٥ غم من مولبيدات الامونيوم في ٤٥٠ مل ماء مقطر سخن المزيج تسخينا هينا ثم اذيب ٣غم ارسنات الصوديوم في ٢٥ مل ماء مقطر مع الرج المستمر ثم أضيف له ٢١ مل من حامض الكبريتيك المركز خلطت المكونات ثم اكمل الحجم الى ٥٠٠ مل بالماء المقطر ثم وضع المزيج في حمام مائي بدرجة٥٥مْ لمدة ٢٥ دقيقة ثم بردت المحتويات وحفظت في قنينة داكنة بدرجة حرارة الغرفه (Somogyi et.al,1952) أستخدم كاشف النحاس وكاشف نيلسون لتقدير السكريات المختزلة بطريقة Somogyi.

٨-محلول سترات منظم بتركيز ٠,٠٥:

أذيب ٩,٦غم من حامض الستريك في كمية معينة من الماء المقطر واكمل الحجم الى ١٠٠٠مل و pH=4.5.

٩-محلول 3,5- Di NitroSalicylic Acid (DNSA):

اذيب ١غم من DNSA في٥٠مل ماء مقطر .واضيف ٢٠ مل من هيدروكسيد الصوديوم تركيز ٢M ثم بإضافة ٣٠ غم من تترات الصوديوم -البوتاسيوم تدريجيا حتى الذوبان تماما . ويكمل الحجم الى ١٠٠مل بالماء المقطر ويحفظ في قنينة داكنة لحين الاستخدام طريقة Bernhard & Whitaker (١٩٧٢)

١٠-محلول النشأ (١٪):

اذيب ١غم من النشأ في ١٠٠مل من محلول سترات المنظم تركيز ٠,٠٥.

١١- محلول صبغة الكاشف(صبغة كوماسي الزرقاء):

حضر محلول صبغة الكاشف بإذابة ١٠٠ ملغم من صبغة الكوماسي الزرقاء جي -٢٥٠ (Coomossie Brilliant Blue G -250) في ٥٠ مل من الكحول الأثيلي بتركيز ٩٥٪ مع التحريك المستمر ثم أضيف ١٠٠ مل من حامض الفسفوريك تدريجيا بتركيز ٨٥٪ وأكمل الحجم إلى ١ لتر بالماء المقطر البارد، رشح محلول صبغة الكاشف باستخدام ورق الترشيح Whatman No.1 وحفظ بقنينة معتمة عند درجة حرارة ٤مْ لحين الاستعمال.

١٢- محلول ألبومين المصل البقري Bovine Serum Albumin

بتركيز ٢ ملغم/مل:- حضر بإذابة ٠,٢ غم من ألبومين المصل البقري بكمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠مل بالماء المقطر.

١٣- منظم الخلات (0.1) مولاري(pH 5.0)

حضر بتخفيف 0.58 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر و بعد تعديل الـ الاس الهيدروجيني إلى 5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

٣ ـ٤ طريقة Somogyi لتقدير السكريات المختزلة

اتبعت طريقة Somogyi (١٩٥٢) لقياس السكريات المختزلة (Reducing Sugar)المتحررة من تحلل الأميليز في المحلول الزرعي الفطري ، استخدمت مادة الـ (Glucose) كمادة قياسية (Standard) لعمل المنحنى القياسي (الشكل ٣-١) للسكريات المختزلة حيث تم تحضير محلول من سكر الكلوكوز وبتركيز (١٠٠ مايكرو غرام / مل) كالاتي :

١ ـ ذوب ٠,٥ غم من الكلوكوز في ٥٠٠ مل ماء مقطر للحصول على تركيز ١ ملغم /مل (محلول A) .

٢ ـاخذ ٥٠ مل من محلول A ومزج مع ٥٠٠ مل من الماء المقطر للحصول على تركيز ٠,١ ملغم / مل (١٠٠ مايكرو غرام / مل) (محلول B) .

جدول (٣) تحضير تراكيز من (محلول B) :

رقم العينة	(محلول B) مل	ماء مقطر/مل	تركيز السكر الناتج
1	0.1	0.9	١٠مايكروغرام/مل
2	0.2	0.8	٢٠ مايكرو غرام/مل
3	0.3	0.7	٣٠مايكروغرام/مل
4	0.4	0.6	٤٠مايكروغرام/مل
5	0.5	0.5	٥٠مايكروغرام/مل
6	0.6	0.4	٦٠مايكروغرام/مل
7	0.7	0.3	٧٠مايكروغرام/مل
8	0.8	0.2	٨٠مايكروغرام/مل
9	0.9	0.1	٩٠مايكروغرام/مل

٤ ـ أخذ ١ مل من التراكيز أعلاه , ثم حضر (Blank) (١ مل ماء مقطر) .

٥ـ أضيف ١ مل من كاشف النحاس (٣ - 3 -٦) الى العينات أعلاه ثم وضعت في حمام مائي مدة ١٠ دقائق ثم بردت بماء الحنفية .

٦ـأضيف ٢ مل من كاشف نيلسون (٣-3- ٧) ووضعت العينات في مكان مظلم لمدة ٣٠ دقيقة .

٧ ـ وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي بسرعة ٤٠٠٠ دورة / د. مدة ٥ دقائق وقرأت مباشرة بجهاز Spectrophotometer على الطول الموجي nm ٥٠٠ .

٣ -٥ تقدير تركيز البروتين حسب طريقة برادفورد (Bradford ,١٩٧٦):

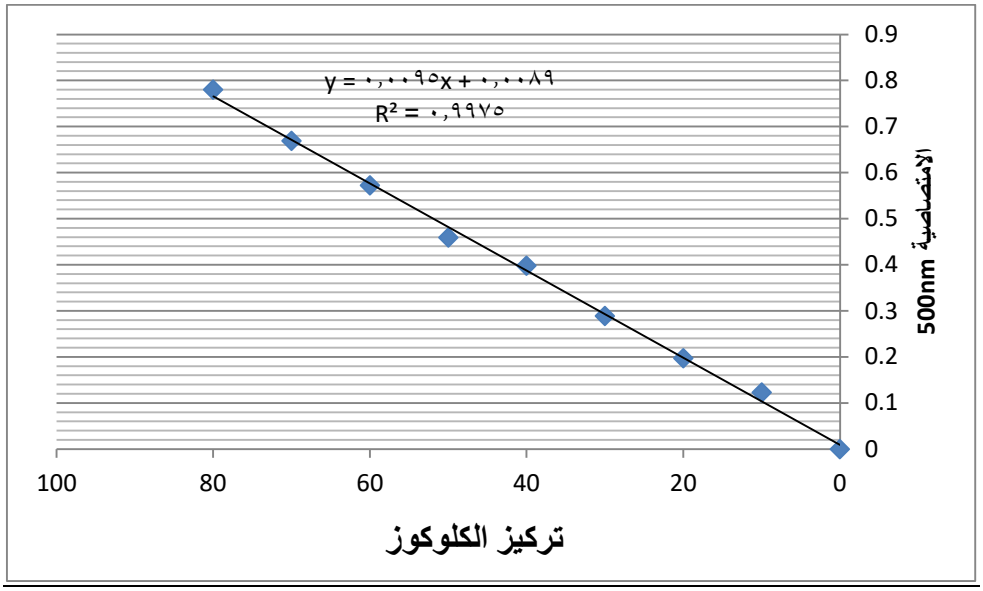
١-رسم المنحنى القياسي لتركيز البروتين:

جدول(٤) تحضير تراكيز متدرجة من محلول البومين المصل البقري

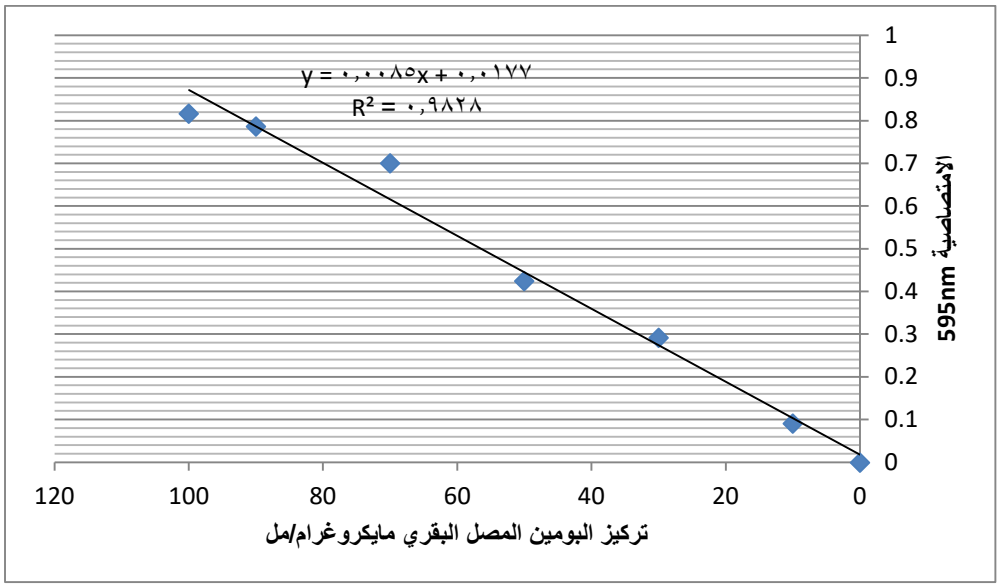
المحلول الخزين (مايكروليتر)	الماء المقطر (مايكروليتر)	الحجم الكلي (مايكروليتر)	تركيز البروتين (مايكروغرام)
100	900	1000	10
300	700	1000	30
500	500	1000	50
700	300	1000	70
900	100	1000	90
1000	0.0	1000	100

أضيفت 2.5 مل من محلول رقم (11) إلى 500مايكروليتر من كل تركيز ، ثم مزج المحلول بصورة جيدة و ترك لمدة خمس دقائق بعدها تمت قراءة الإمتصاص (لكل تركيز مكررين) على طول موجي 595 نانوميتر ، بعد أن صفر جهاز المطياف بمحلول صفري (Blank) الذي يتكون من 0.5 مل منظم الخلات (pH 5.0) و 2.5 مل من محلول رقم 11 .

تم تمثيل العلاقة بين تركيز البروتين (مايكروغرام/مليلتر) والامتصاصية على الطول الموجي ٥٩٥ نانومتر بيانيا (الشكل: ٢).



شكل (١) المنحنى القياسي لتركيز الكلوكوز



شكل (٢): المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين.

٣- ٦-عزل وتشخيص الفطريات

تم عزل بعض الانواع التابعة لجنس *Aspergillus ssp.* شملت *A.terrus* و *A. parasiticus* و *A.oryzae*و *A.flavus* و *A. niger* من بعض المواد الغذائية بعد ان شجعت لنمو الفطريات عليها تمثلت بالباقلاء والذرة والرز ونخالة الرز وذلك بوضعها بأكياس نايلون محكمة الغلق وحفظت بجو المختبر .وبعد ظهور علامات الاصابة عليها ,عقم سطحها بالتغطيس بمحلول الكلوراكس التجاري بتركيز٠,٠٦٪ لمدة ٣ دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات وتركت تجف على ورقة ترشيح معقمة موضوعة في طبق بتري معقم وتحت ظروف معقمة لغرض سحب الماء الزائد منها,زرعت قطع حوالي ٢ملم من الانسجة المصابة على وسط P.D.A وبواقع أربع قطع عند محيط الطبق وقطعة خامسة في مركز الطبق ،حضنت الأطباق عند درجة حرارة ٢٥ ±٢ مْ ، فحصت الأطباق بعد ٥ أيام من الحضن فحصاً أولياً لغرض عد المستعمرات النامية على الأوساط الزرعية ، استمرت المراقبة لمدة أسبوعين بعدها عزلت الفطريات في مزارع نقية ، حضرت شرائح زجاجية من المزارع النقية لدراسة الصفات الدقيقة للفطريات تحت المجهر الضوئي، شخصت الفطريات بحسب أشكالها المورفولوجية وألوان المستعمرات على وسط الزابك Czapex Dox agar إضافة الى الصفات التشخيصية لكل فطر. وإعتمدت المصادر الآتية في التشخيص:-

(Ellis,1971 ; Bary& Barnett ,1972 ; Hocking & Pitt ,1997 ; Moubasher,1993).

وتم حساب مايأتي :

١.النسبة المئوية للتردد وحسبت من القانون الآتي :

$$\text{Frequency \%} = \frac{\text{عدد عزلات الجنس الواحد}}{\text{العدد الكلي لجميع العزلات}} \times ١٠٠$$

2.النسبة المئوية للظهور وحسبت من القانون الآتي :

$$\text{Occurrence \%} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الجنس أو النوع}}{\text{العدد الكلي للعينات خلال الدراسة}} \times ١٠٠$$

٣- ٧- الكشف عن الفطريات المحللة

٣ -٧-١ للبروتين

صب وسط أكار – الحليب المقشود المحضر في الفقرة (3-2-3) Skimmed – milk Agarفي أطباق بتري معقمة ثم لقح بالأنواع الفطرية التي تم الحصول عليها من مستعمرات نقية نامية على وسط (PDA) حيث لُقحت الأطباق بقرص قطره (٥ ملم) حضنت الأطباق بدرجة ٢٨°م لمدة ٧٢ ساعة ثم كشف عن تحلل البروتين (الكازائين في الحليب) عند ظهور هالة شفافة حول المستعمرات الفطرية (Bilinsk,1987).

٣ -٧-٢ **الأميليز**

لقح وسط آ كار النشأ المحضر بحسب الفقرة (٣-٢-٥) بقرص قطره (5 ملم) من الانواع الفطرية النقية والنامية على وسط (PDA) وبعمر ثلاثة ايام حضنت الأطباق بدرجة ٢٨°م مدة ٧٢ ساعة كشف عن تحلل النشأ باستخدام الكاشف اليود(٣ -٣-١) أضيف الكاشف الى الطبق وترك لمدة ٥ دقائق ثم سكب المحلول وترك الطبق مدة 5 دقائق لوحظ ظهور هالة شفافة حول المستعمرات الفطرية دلالة على أنتاج أنزيم الاميليز و كلما كبر قطر الهالة يكون دليلا على نشاط الفطر في إنتاج الأنزيم (Pandey et.al,2006).

استخدم الجدول الآتي لقياس قطر الهالة الشفافة حول المستعمرات الفطرية لكلا الوسطين أعلاه للكشف عن فعالية التحلل :-

فعالية التحلل	عمق منطقةالتحلل	الرمز
غير محلل	Zero	-
ضعيف الفعالية	< ١٠ ملم	+
متوسط فعالية	١٠ – ١٥ ملم	++
شديد الفعالية	> ١٥ ملم	+ ++

٣ - ٨- تقدير كفاءة الانواع الفطرية المنتخبة على تحلل الكازين

انتخبت خمسة عزلات أنواع فطرية هي ***A.nigerA.terrus,A.parasiticus,*** ***A.flavus,A.oryzae*** كان لها أعلى فعالية على وسط أكار الحليب المقشود Skim – milk ونميت الفطريات المنتخبة في وسط ألانتاج المعدني (٣-٢-٤) ، أجريت للفطريات ظروف حضانة ثابتة عند درجة حرارة ٣٠°م وباس هيدروجيني ٦ ومدة ٣ أيام قدرت خلالها الفعالية الأنزيمية لأنزيم البروتييز وتركيز البروتين الذائب(Hassan,1996) .

1-قياس فعالية أنزيم البروتييزProtease

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Murachi,(1970) في تقدير فعالية أنزيم البروتييز اذ أضيف ٠,١ مل من الراشح الأنزيمي الى ٢ مل من محلول التفاعل٠,٥ % كازائين بأس هيدروجيني ٦ ، وضعت العينات في حمام مائي عند درجة حرارة ٣٥°م لمدة ٢٠ دقيقة ثم أضيف ٣ مل من محلول TCA ٥٪ لإيقاف التفاعل .

حُضر المحلول Blank بالطريقة السابقة عدا إضافة محلول TCA قبل إضافة الأنزيم نبذت المحاليل بسرعة ٢٥٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة وعند درجة حرارة ٤°م ثم قيست الامتصاصية للمحلول الرائق بطول موجي ٢٨٠ نانوميتر ، ثم قدرت وحدات الفعالية الأنزيمية اذ تعرف وحدة الفعالية بأنها :كمية الأنزيم التي تسبب زيادة في الامتصاص الضوئي على الطول الموجي ٢٨٠ نانوميتر مقدارها٠,٠١ في الدقيقة تحت ظروف القياس.

٢- تقدير تركيز البروتين

قدرت البروتينات الذائبة في الراشح الأنزيمي بطريقة (Bradford,1976).أضيف إلى أنبوبة اختبار نظيفة ٠,٠٥ مليلتر من الراشح الانزيمي، و٠,٤٥ مليلتر من دارئ الفوسفات و٢,٥ مليلتر من صبغة الكوماسي الزرقاء G-250 المحضرة كما في الفقرة (١١)، مزج الخليط جيدا باستخدام جهاز الرج، وترك لمدة دقيقتين بدرجة حرارة الغرفة ثم قيست الامتصاصية على الطول الموجي ٥٩٥ نانومتر ومن قيمة الامتصاصية تم معرفة تركيز البروتين الذائب في الراشح الإنزيمي من المنحنى القياسي للبروتين .

٣ -٩- تحديد الظروف المثلى للفطر *A. niger* لانتاج أنزيم البروتييز

١- تأثير العناصر المعدنية على انتاج الانزيم

درس تأثير كبريتات المغنيسيوم وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (الموجودتين أصلاً في وسط الإنتاج)، اذ حضر الوسط بوجود كبريتات المغنيسيوم, وبعدم وجودها ,وبوجود فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ,وبعدم وجودها ,إضافةً إلى المعاملة الحاوية على كلا الملحين و تركت إحدى المعاملات من دون إضافة أملاح معدنية لغرض المقارنة ،ولقح بفطر بقرص ١٠ملم وحضن الوسط الإنتاجي لمدة 72 ساعة وعند درجة حرارة 30 مْ .

٢-تأثير مصادر مختلفة من الكاربون

حضر الوسط الانتاج كما في الفقرة(٤-٢-٣) وباستخدام مصادر كاربون مختلفة مثل (الكلوكوز,النشأ, اللاكتوز, السكروز) بتركيز ١٪ ولقح بفطر بقرص ١٠ملم وحضن لمدة ٧٢ساعة وعند درجة حرارة٣٠ مْ.

٣-تأثير تراكيز مختلفة من الكاربون

حضر الوسط الانتاجي وأضافة تراكيز مختلفة من الكلوكوز (2,1.5,1,0.5%) ولقح الوسط بالفطر بقرص ١٠ ملم وحضن لمدة ٧٢ ساعة وعند درجة حرارة ٣٠ مْ.

٤-تأثير مصادر مختلفة من النتروجين

من أجل تحديد مصدر النيتروجين الأمثل لإنتاج إنزيم البروتيز، تم اختبار مصادر النيتروجين المختلفة في تركيز ١٪. وهذه المصادر هي: ببتون والكازين وكبريتات الأمونيوم وخلاصة الخميرة .

٥-تأثيرتراكيز مختلفة من النتروجين

حضر الوسط الانتاجي وأضافة تراكيز مختلفة من النتروجين (2,1.5,1,0.5 %) للوسط ولقح بالفطر وحضن لمدة ٧٢ ساعة وبدرجة حرارة ٣٠مْ.

٣-١٠- تقدير كفاءة الانواع الفطرية المنتخبة على تحلل النشأ

حضر الوسط الزرعي المعدني الخاص بإنتاج أنزيم الأميليز (٣ -٢- ٦) ووزعت المكونات على٣ دوارق سعة الدورق الواحد ٢٥٠ مل بواقع ١٠٠ مل لكل دورق وعقمت بالمؤصدة بدرجة ١٢١°م وضغط ١ بار لمدة ١٥ دقيقة وبعد التبريد أضيف للوسط قرص قطره ١٠ ملم من المستعمرات الفطرية النقية والنامية على وسط PDA وبعمر ثلاثة أيام اجري الاختبار على ثلاثة انواع من الفطريات التي أعطت أعلى فعالية على وسط أكار النشأ (٥ -١- ٣) .اختبرت الانواع الفطرية المنتخبة لتشخيص الفطر الأكفأ في الإنتاج الإنزيمي من خلال ظروف حضانة ثابتة. حضنت الدوارق مدة ٣ أيام عند درجة حرارة ٣٠°م وبعد انقضاء مدة الحضانة تم استخلاص الراشح الإنزيمي عن الكتلة الحيوية واجري تقدير لتركيز السكريات المختزلة ثم قدرت الفعالية الإنزيمية لإنزيمي التحلل الأميليزوتركيز البروتين الذائب كالآتي :-

أخذ ١مل من خلاصة الانزيم و١مل من ١٪نشأ مذاب في محلول سترات منظم تركيز ٠,٠٥ مولاري وpH٤,٥.خليط التفاعل يحضن على ٦٠ °م لمدة ٢٠ دقيقة والتفاعل ينتهي بوساطة أضافة ٢مل منDNSA في أنابيب أختبار وتغمر الأنابيب في حمام مائي مغلي بدرجة ١٠٠°م لمدة ٥ دقائق.تقاس الامتصاصية على ٥٤٠ نانوميتر.ثم قدرت وحدات الفعالية الأنزيمية حيث تعرف وحدة الفعالية بأنها كمية الأنزيم التي تحرر ١مايكرومول من السكريات المختزلة في الدقيقة الواحدة تحت ظروف القياس.وحسب العلاقة الآتية :-

الفعالية الأنزيمية (وحدة /مل) = الامتصاصية /الميل × عامل التخفيف

الوزن الجزيئي للكلوكوز×حجم الأنزيم×زمن الحضانة(بالدقيقة)

.(Miller,1959)

٣-١١- تحديد الظروف المثلى للفطر *A. oryzea* لانتاج أنزيم الأميليز

١- تأثير العناصر المعدنية على انتاج الانزيم

تم دراسة تأثير العناصر المعدنية مثل كبريتات المغنيسيوم وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (الموجودتين أصلاً في وسط الإنتاج)، حيث حضر الوسط بوجود كبريتات المغنيسيوم وعدم أضافة فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين بوجود فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و بعدم أضافة كبريتات المغنيسيوم, وبالإضافة إلى المعاملة الحاوية على كلا الملحين و تركت إحدى المعاملات بدون إضافة أملاح معدنية لغرض المقارنة ، وحضن الوسط الإنتاجي لمدة 72 ساعة و عند درجة حرارة 30 مْ .

٢- تأثير مصادر مختلفة من الكاربون

تم استخدام مصادر كاربون مختلفة مثل(الكلوكوزوالنشأ واللاكتوز والسكروز) بتركيز ٣٪ في وسط الانتاج كما في الفقرة(٣-١-٣) ولقح بالفطر بقرص ١٠ملم وحضن لمدة ٧٢ساعة وعند درجة حرارة٣٠ مْ و٤,٥الاس الهيدروجيني .

٣- تأثير تراكيز مختلفة من الكاربون

عملت تراكيز مختلفة من الكلكوز(4,3.5,3,2.5,2%) في الوسط الانتاجي ولقح الوسط بالفطر بقرص ١٠ ملم وحضن لمدة ٧٢ ساعة وعند درجة حرارة ٣٠ مْ.

٤-تأثير مصادر مختلفة من النتروجين

لمعرفة مصدر النيتروجين الأفضل لإنتاج إنزيم الأميليز، تم اختيار مصادر نيتروجين مختلفة بتركيز ٢٪ وهذه المصادر هي: ببتون والكازين وكبريتات الأمونيوم وخلاصة الخميرة .

٥-تأثيرتراكيز مختلفة من النتروجين

ومن اجل معرفة التركيز الأفضل أستخدمت تراكيز مختلفة من النتروجين (4,3.5,3,2.5,2 %) بوسط الأنتاج ولقح بالفطر وحضن لمدة ٧٢ ساعة وعند درجة حرارة ٣٠مْ.

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

٤-١ عزل الفطريات المرافقة للمواد الغذائية المحلية:-

تم عزل العديد من الفطريات المرافقة للحبوب المحلية وقد تم اختيار خمسة انواع فطرية تعود للفطر *Aspergillus ssp.* هي *A.niger* و *A.oryzae* و *A.flavus* و *A.parasiticus* و *A.terrus* وكان الفطرين *A.niger* و *A.flavus* الأكثر مرافقةً للاغذية المدروسه ظهورا,تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه(Varalakshmi et.al,2009) . وكما يبين الجدول (٣) إن معظم المواد الغذائية كانت مصابة بالفطر *A.niger* بنسبة ظهور ١٠٠٪ ,إما الفطر *A.flavus* فقد احتل المرتبة الثانية من حيث ظهوره بالأغذية بنسبة ظهور ٧٥٪, ويلية الفطرين *A.parasiticus* و *A.oryzae* بنسبة ظهور ٥٠٪,واحتل المرتبة الاخيرة الفطر *A.terrus* بنسبة ٢٥٪ ويعود سبب سيادة الفطر *Aspergillus sp.* في الحبوب ألمخزنة لانتشاره الواسع في البيئة والذي يأتي من قدرته على تكوين إعداد كثيرة من الوحدات التكاثرية اللاجنسية المقاومة لظروف البيئية الغير ملائمة (Al camo,1996) وكذلك النمو في مديات واسعة من الحرارة والرطوبة,إذ تتصف الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus ssp.* بأنها تنمو في مديات من درجات الحرارة تتراوح مابين(5-45) م° أو اعلى من ذلك (M oubasher et.al,1982) كذلك فان لهذه الفطريات القابلية على النمو في مستويات رطوبة منخفضة حيث تسود الفطريات التابعة لجنس *Aspergillus spp.* عند محتوى رطوبي يتراوح مابين (15-18)% فضلا عن عوامل أخرى, مثل مدة الخزن إذ كلما زادت المده زاد معها احتمال حدوث الإصابات وتلعب بعض العوامل الحيوية كالحشرات والعناكب دورمهماً في زيادة الإصابات الفطرية من خلال إحداثها أضرارا في البذور تساعد الفطريات ألمخزنيه على إحداث الاصابه (Rustum,1997 ; Sinclair& Agarwal ,١٩٩٧;) كما أن المتطلبات الغذائية البسيطة للجنس *Aspergillus spp.* وتحمله للظروف البيئية الحرجة كانا سببا في سيادة هذا الجنس,فضلاً عن أن امتلاكه لنظام إنزيمي متعدد مكنه من استغلال المصادر الغذائية المختلفة(Abu Hila ,1987) . كما تمتلك البعض من أنواعه القدرة على التنافس وتثبيط نمو الأنواع الأخرى عن طريق أنتاج سموم حيوية فعالة مثل Aflatoxin (Mishra,1973 & Kanaujia).

جدول (٣) لنسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة من بعض المواد الغذائية

الفطر	النسبة المئوية للظهور
A.niger	100%
A.flavus	%٧٥
A.parasiticus	%50
A.oryzae	٪٥٠
A.terrus	٪٢٥

2-4 النسبة المئوية للتردد % Frequency

أظهرت نتائج النسبة المئوية لتردد الانواع الفطرية تبايناً واضحاً فيما بينها (الجدول ٤) :

ففي حبوب الباقلاء كانت أعلى قيمة تردد للفطر *Aspergillus niger* (46.15%) يليه الفطر *A.parasiticus* بنسبة (30.76%) يليها الفطر *A. flavus* بنسبة (23.07%) اما في حبوب الذرة فقد أظهرت نتائج التردد الكلي للأنواع الفطرية أعلى قيمة للفطرين *A. terreus* و *A. flavus* بنسبة (٣٣,٣٣٪) , يليه الفطر*A. niger* (٢٦,٦٦٪) بينما كان أدنى تردد للفطر *A.parasiticus* بمقدار (6.66%) . وفي حبوب الرز سجل الفطر *A.niger* أعلى نسبة تردد وهي (50%) يليه الفطر *A.oryzae*بتردد (41.66%) .إما نتائج التردد الكلي للأنواع الفطرية لسحالة الرز فقد كانت قيم التردد الأعلى مسجلة من قبل الفطر *A . oryzae* وهي (٥٨,٣٣ %) ، يليه الفطر *A.niger* ثم الفطر*A.flavus*(25 % ،16.66%) على التوالي.

جدول (٤) : نسبة التردد (%) للفطريات المعزولة من بعض المواد الغذائية

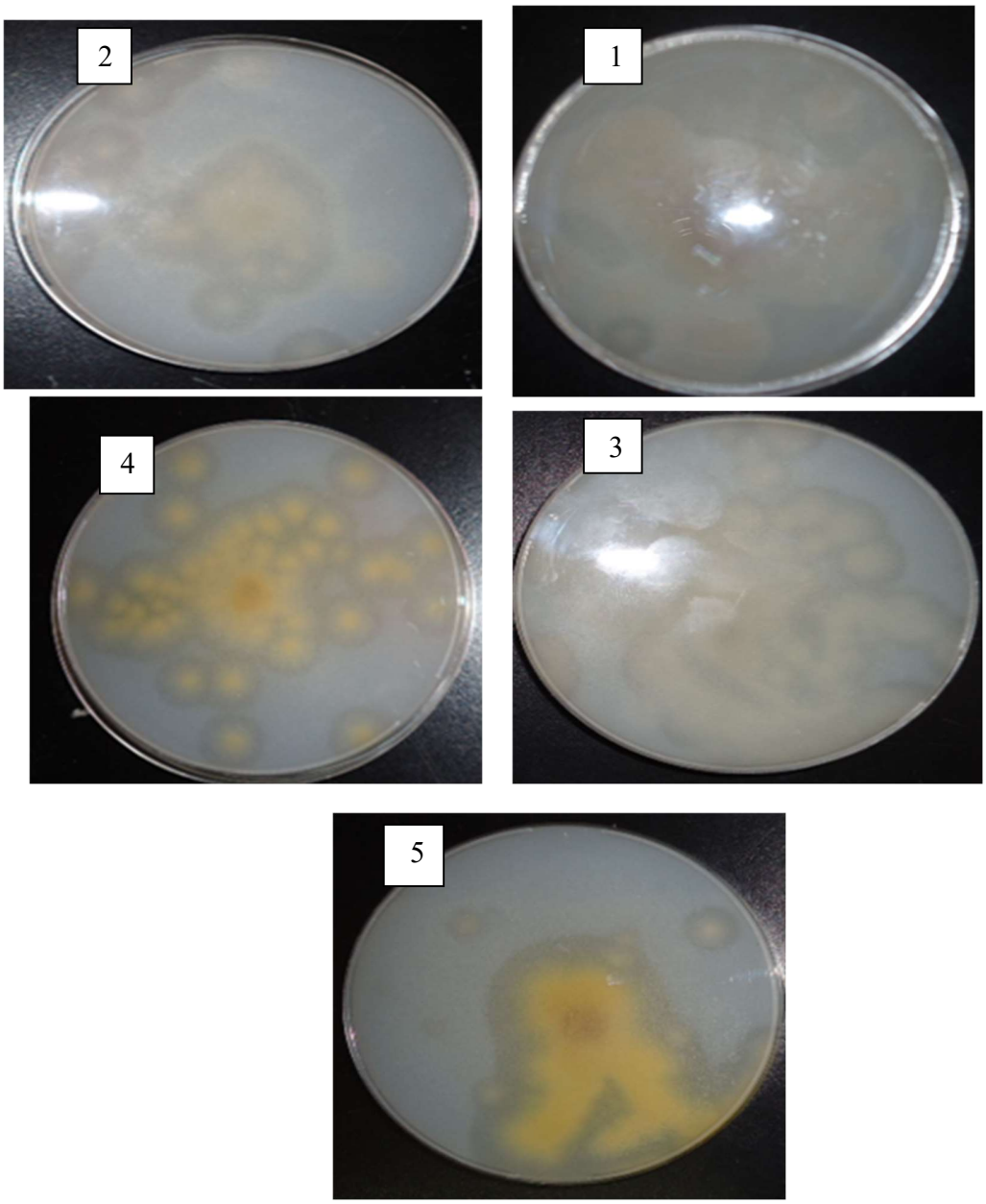
نسبة التردد (%)					
الفطر / المادة	*A.niger*	*A.oryzae*	*A.flavus*	*A.parasiticus*	*A.terrus*
باقلاء	٤٦,١٥	-	٢٣,٠٧	٣٠,٧٦	-
ذرة	٢٦,٦٦	-	٣٣,٣٣	٦,٦٦	٣٣,٣٣
رز	٥٠	٤١,٦٦	-	-	-
نخاله الرز	٢٥	٥٨,٣٣	١٦,٦٦	-	-

- عدم وجود الفطر

٤-3الكشف عن الفطريات المحللة:

٤-3-١ البروتين

أظهرت نتائج اختبار فعالية الفطريات في تحلل البروتين على وسط أكار – الحليب المقشود ,ان جميعها كانت فعالة حيث كان قطر الهالة الشفافة اكبر من ١٥ ملم مما يدل على انها شديدة الفعالية الشكل (٣)



شكل(٣) :فعالية الفطريات في تحليل البروتين على وسط أكار الحليب المقشود عند درجة حرارة ٢٨م بعد ثلاثة ايام من الحضن.

1- Aspergillus niger 2- A. parasiticus 3-A. terreus 4-A. oryzae 5- A. flavus

٤-3-٢ الأميليز

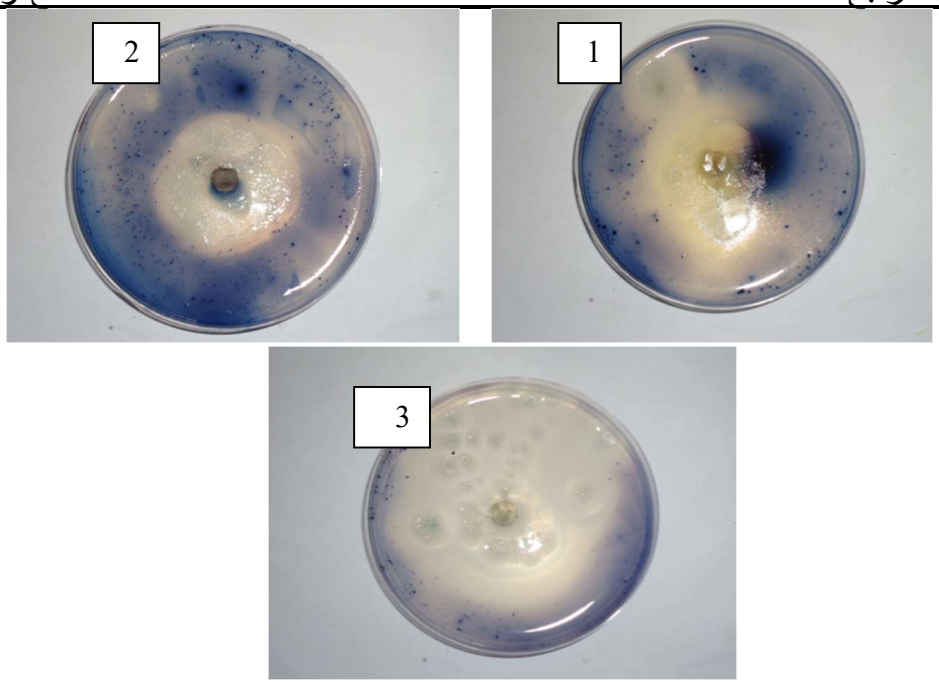
اظهرت نتائج الاختبار في الجدول(٥)، أن الأنواع *Aspergillus niger,A. flavus, A . oryzae* كانت شديدة الفعالية اذ كان قطر الهالة الشفافة اكبر من ١٥ ملم والموضحة بالشكل (٤)، إما الانواع *A . terreus, A. parasiticus*.فقد كانت أقل فعالية اذ كان قطر الهالة حول المستعمرات اقل من١٠ملم .

جدول : ٥ ،تحلل النشا بفعل الاميليز المنتج من الفطريات على وسط النشأ عند درجة حرارة ٢٨ مْ لمدة حضن ٣ أيام

الانواع الفطرية	قطر منطقةالتحلل(بالملم)	فعالية التحلل النشا
A.niger	>15	+++
A.oryzae	>15	+++
A.flavus	>15	+++
A.parasiticus	6-7	++
A.terreus	6-7	++

+++ شديدة الفعالية

++ متوسط الفعالية



شكل (٤) الفطريات الشديدة الفعالية في انتاج انزيم الاملیز على وسط اكار النشأ النقي عند درجة حرارة ٢٨م وحضن لمدة ٣ أيام

1- Aspergillus oryzae 2- Aspergillus niger 3- Aspergillus flavus

٤-4 تقدير كفاءة الانواع الفطرية المنتخبة على تحليل الكازئين

أظهرت الأنواع الفطرية في الجدول (٥) فعالية عالية في تحليل البروتين على وسط اكار الحليب المقشود skim milk إذ كان الفطر *A. niger* هو الفطر الاكفأ في إنتاج انزيم البروتييز وبفعالية قدرها ١٨,٩٧ وحدة / مل وبتركيز بروتين ٠,٤٦٠ ملغم / مل يليه الفطر *A. flavus* وبفعالية انزيمية قدرها ١٦,٤٢ وحدة / مل وكان تركيز البروتين الذائب ٠,٤٣٤ ملغم / مل ، اما الفطر *A. parasiticus* فكان الأدنى في إنتاج الانزيم وبفعالية قدرها ٧,٩٥ وحدة / مل في حين كان تركيزالبروتين الذائب ٠,٢٢٣ ملغم / مل .

جدول: (٦) ، الفعالية الانزيمية لأنزيم البروتييز وتركيز البروتين الذائب على الوسط عند درجة حرارة ٣٠°م وبأس هيدروجيني٦ ولمدة ٣ ايام حضانة

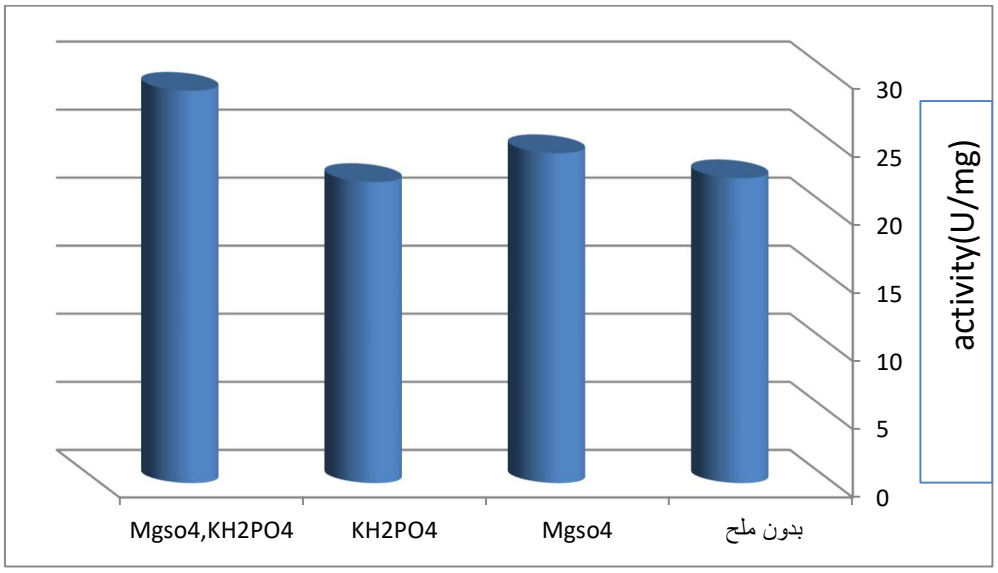
الانواع الفطرية	الفعالية الأنزيمية (وحدة /مل)	تركيز البروتين الذائب (ملغم / مل)
A.niger	18.97	0.460
A.flavus	16.٤٢	0.434
A.terreus	14.6	0.380
A.oryzae	13.65	0.374
A.parasiticus	7.95	0.223

٤-5 تحديد الظروف المثلى للفطر *A niger* لإنتاج أنزيم تحلل البروتين

١- العناصر المعدنية في الوسط الزرعي

أظهر الشكل (٥) ، إن استخدام الملحين $MgSO_4$ وKH_2PO_4 معاً تأثيراً منشطا واضحاً في إنتاج إنزيم البروتييز مقارنة بالمعاملة الخالية من الأملاح ، إذ بلغت الفعالية الانزيمية (٢٨.82) وحدة /ملغم بروتين . بينما أظهرت المعاملة الخالية من الملحين المذكورين فعالية انزيمية بلغت ٢٢,٣٩ وحدة / ملغم بروتين لإنزيم البروتييز.

ان توفرالأيونات المعدنية في وسط التخمر يعد من أحد المتطلبات الضرورية لإنتاج الإنزيمات وثبوت واستقرار بعضها ولكنها تختلف بالاعتماد على مصدر الإنزيم (Ire et.al,2011) وبالرغم من وجود بعض الأحياء المجهرية المنتجة للإنزيمات الثابتة حرارياً إلا إن وجود بعض هذه الأيونات يزيد من الثبات الحراري للإنزيمات ويجعلها فعالة حتى عند درجات الحرارة العالية (Haq et.al,2006) . وهناك عدة دراسات أوضحت الدورالفعال للأملاح المعدنية في إنتاج الإنزيم من الفطريات , فقد قام جوبتا (Gupta et.al,1992) بإنتاج الإنزيمات المحللة للكيوتكل من الفطر *Beauveria bassiana* في استخدام وسط زرعي يحتوي على كبريتات المغنيسيوم المائية ٠,٠٦ % وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ١,٥ % وكلوريد الصوديوم ٠,٠٥ % . كذلك استخدمت كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وبتركيز (٤ و٥) غم / لتر في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر*B. brongniartii*, (Erlacher et.al,2006) . وقد أشارا كل من (Kapat & Elad , ١٩٩٩) إلى استخدام كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين وبالتراكيز ٠,٣ و٢ و٦,٩ غم / لتر على التوالي ،لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر*T. harzianum* .

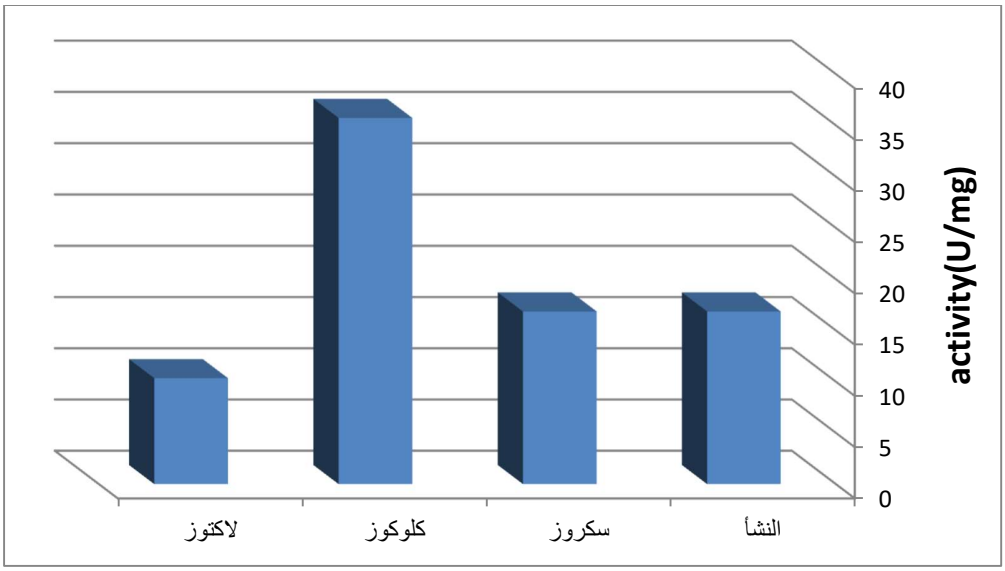


شكل (٥) تأثير العناصر المعدنية على فعالية انزيم البروتيز وحدة /ملغم بروتين

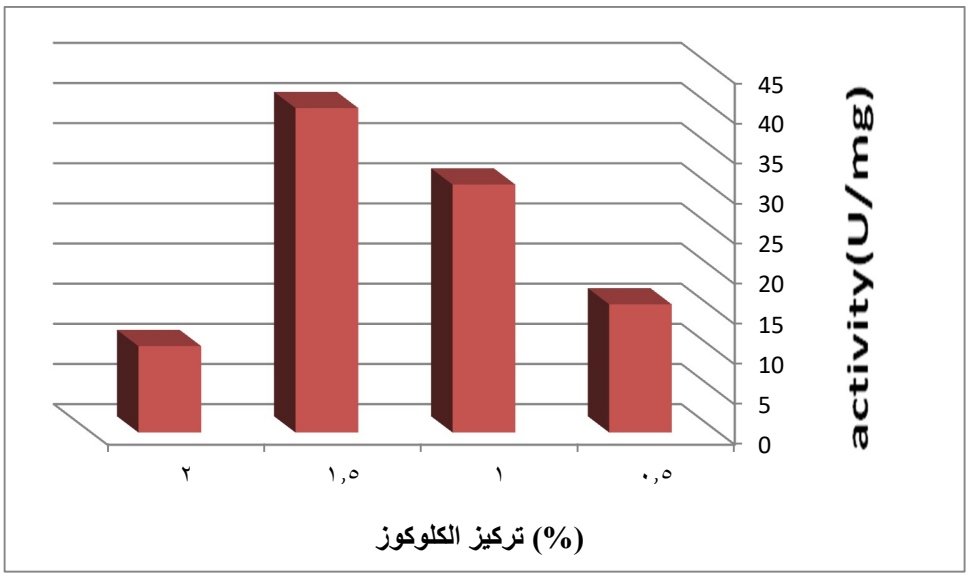
٢- تحديد نوع المصدر الكاربوني وتركيزه على فعالية انزيم البروتييز

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (٦) ، أن الكلوكوز أفضل مصدرلإنتاج انزيم البروتييزمقارنة بباقي المصادرالنيتروجينية المستخدمة , إذ بلغت الفعالية الانزيمية حدها الأقصى لإنزيم البروتييز ٧٢.٣٥ وحدة / ملغم بروتين . في حين ظهرت أوطأ فعالية انزيمية للبروتين بوجود النشأ والسكروزحيث بلغت قيمتها ١٦,٨٥ وحدة / ملغم بروتين ,واوطأ بوجود اللاكتوز.إذ تم استخدام الكلوكوز بتراكيز متدرجة ٠,٥ و١ و ١,٥ و ٢ %. إن قيم الفعالية الأنزيمية تبين أن أفضل تركيزللكلوكوزلإنتاج إنزيم البروتييز هو ١,٥٪ إذ بلغت الفعالية الأنزيمية٤٠,٤٢ وحدة /ملغم بروتين كما في الشكل (٧). وفي ضوء هذه النتائج تم استخدام الكلوكوز بتركيز ١,٥ % لإنتاج الإنزيم في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها.ان توفير مصدر كاربون في الوسط ضروري لتحرير الطاقة التي تحتاجها الأحياء المجهرية للنمو و قلة تجهيزها بالوسط يقلل من نموها , لذا فهي تؤثر بشكل كبير في إنتاج الإنزيم من تلك الأحياء المجهرية (Haq et.al,2008), تتباين المصادر الكربونية وتراكيزها المطلوبة لتنمية الأنواع المختلفة من الأحياء المجهرية وإنتاج الإنزيم (Jaswal et.al,2008) . ومن الفطر *A.niger* حصل كلا من (Kalpana et.al,2008) على نتيجة مماثلة عند تعزيزنشاط انزيم البروتييز بأستخدام تركيز الكلوكوزبنسبة تصل الى ١-١,٥٪. وهناك عدة دراسات قارنت كفاءة مصادر كربونية مختلفة وبتراكيز مختلفة على إنتاج إنزيم الكايتينيز والبروتييز من أحياء مجهرية مختلفة ، وقد حصل(Donatti et.al,2008) على أعلى فعالية لإنزيمي البروتييز (Pr1)

و(Pr2) عند تنمية الفطر *B. bassiana* في وسط يحوي كيوتكل الجراد كمصدر كاربون . فقد أستخدم (Silva et.al,2011) الكلوكوز والكايتين بتركيز ٠,٠٢ و٠,٥ % , على التوالي كمصدرين كاربونيين لإنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *T.asperellum* . وحصل على أعلى إنتاج لإنزيم البروتييز من الفطر *P.chrysogenum* بإضافة الكلوكوز ٠,٥ % كمصدركاربوني في الوسط (Haq et.al,2008) .



شكل(٦) تأثير مصادر مختلفة من الكاربون على فعالية انزيم البروتيز وحدة /ملغم بروتين



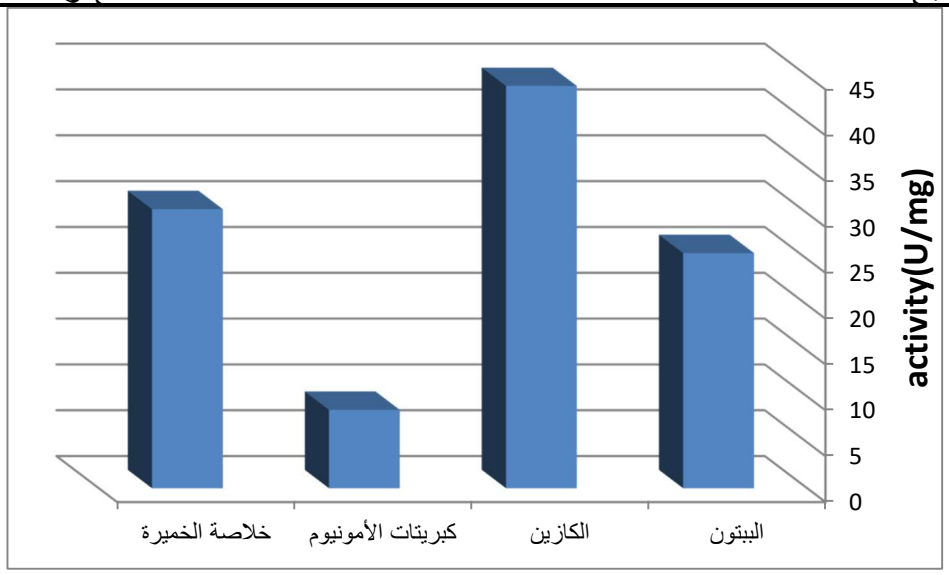
شكل (٧) تأثير تراكيز مختلفة من الكلوكوز على فعالية انزيم البروتيز وحدة /ملغم بروتين

٣- تحديد نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه على فعالية انزيم البروتييز :

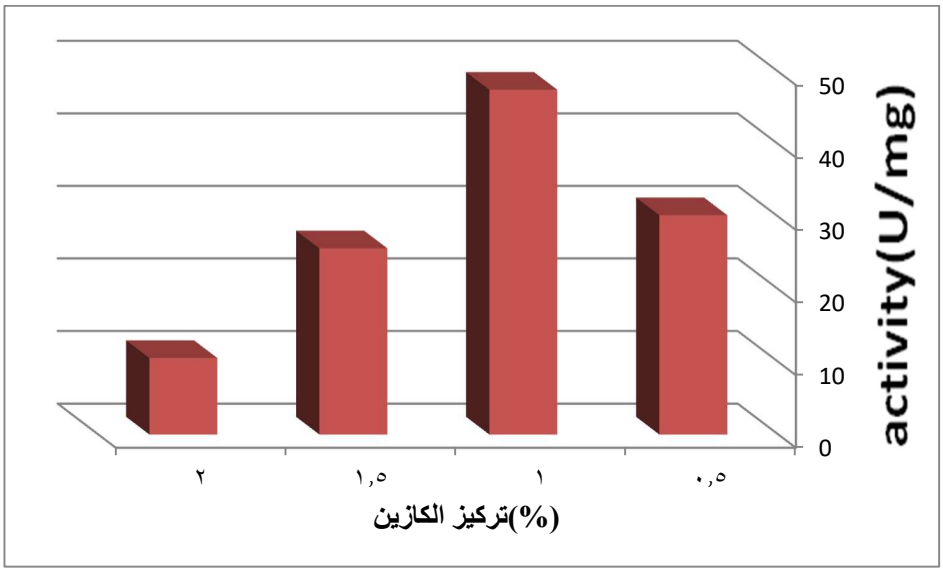
أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (٨)، أن الكازين هو المصدر النيتروجيني الأكفأ في إنتاج الإنزيم مقارنة بباقي المصادر النيتروجينية المستخدمة , إذ بلغت الفعالية الانزيمية البروتييز (٤٣,٨٩) وحدة / ملغم بروتين . في حين ظهرت أوطأ فعالية للإنزيم بوجود كبريتات الامونيوم حيث بلغت قيمتها (٧,٥٥) وحدة / ملغم بروتين .

وبعد أن تم تحديد المصدر النيتروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم درست تراكيز مختلفة من الكازين لتحديد التركيز الأمثل منها لإنتاج الإنزيم كما في الشكل(٩), وقد سجلت أعلى فعالية أنزيمية عند استخدام الكازين بتركيز ١٪ وكما موضح في الشكل (٩) ،إذ بلغت الفعالية النوعية (٤٧,٥١) وحدة / ملغم بروتين لإنزيم البروتييز. في حين انخفضت الفعالية النوعية تدريجياً بزيادة تركيز المصدر النيتروجيني المستخدم في هذه الدراسة , فظهرت أوطأ فعالية انزيمية للبروتييز ١٠,٥٣ وحدة / ملغم بروتين عند التركيز ٢٪ من الكازين.وان مصدر النيتروجين المستخدم في وسط الإنتاج هو أحد العوامل الرئيسة المؤثرة في إنتاج الإنزيمات (Abd-Aziz et.al,2008) والذي له دور تنظيمي في تصنيع الإنزيم , إذ يتأيض هذا المصدر ليعطي أحماض أمينية تعد ضرورية لإنتاج الإنزيمات (Saurabh et.al,2007) . ومما تجدر الإشارة إليه أن الأعفان تستطيع إنتاج هذه الأحماض الأمينية من مصادر نيتروجينية غير عضوية (Chutmanop et.al,2008) .تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه (Krishna et.al,2009) و الذي أشار إلى استخدام الكازين كمصدر نيتروجيني لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Penicillium sp.* .

بينما أوضح (Haq et.al,2008) ان الببتون (Pepton) أفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *P. chrysogenu m* لإعطائه اعلى فعالية إنزيمية والتي بلغت ١٢,٧١ وحدة / مل.



شكل (٨) تأثير مصادر مختلفة من النتروجين على فعالية انزيم البروتيز وحدة /ملغم بروتين



شكل (٩) تأثير تراكيز مختلفة من الكازين على فعالية انزيم البروتيز وحدة /ملغم بروتين

٦-٤ تقدير كفاءة الانواع الفطرية المنتخبة على تحليل النشأ

تم انتقاء ثلاثة أنواع فطرية كان لها فعالية عالية في تحليل النشأعلى وسط اكار النشأ الجدول (٧) إذ كان الفطر*A.oryzae* هو الفطر الاكفأ في إنتاج انزيم الأميليز وبفعالية قدرها ١٦,٣٥وحدة / مل وبتركيز بروتين ٠,٤٨١ ملغم / مل يليه الفطر *A.niger* وبفعالية انزيمية قدرها ١٤.94 وحدة / مل وكان تركيز

البروتين الذائب ٠,٤٢١ ملغم / مل ، اما الفطر *A.flavus*. فكان الأدنى في إنتاج الانزيم وبفعالية قدرها ١٢,٦٥وحدة / مل في حين كان تركيز البروتين الذائب ٠,٣٨٩ ملغم / مل .

جدول: (٧) الفعالية الانزيمية لانزيم الأمليز وتركيز البروتين الذائب على وسط الانتاج عند درجة حرارة٣٠مْ وبأس هيدروجيني٤,٥ ولمدة ٣ ايام حضانة

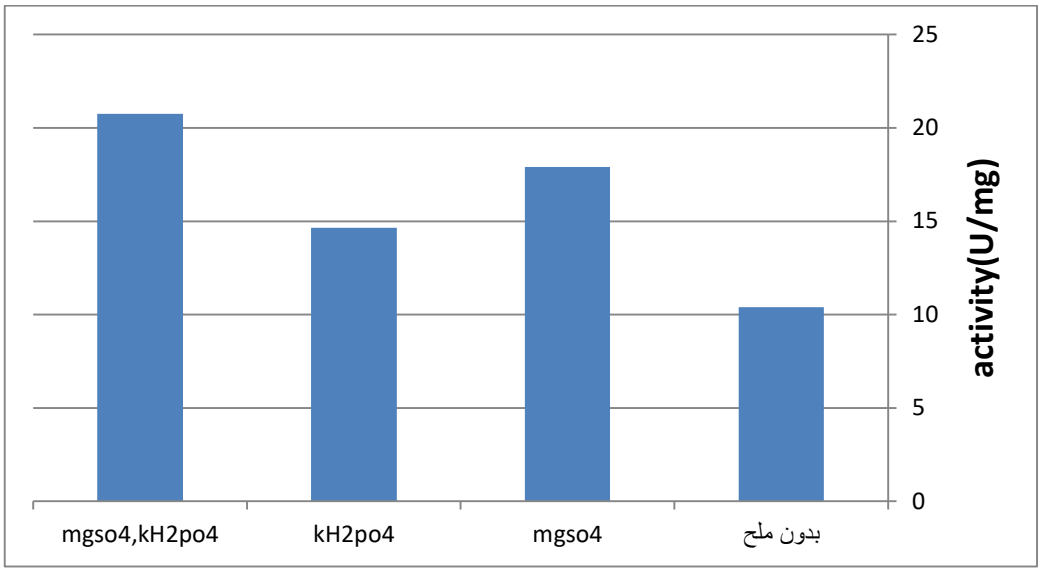
الانواع الفطرية	الفعالية الأنزيمية (وحدة /مل)	تركيز البروتين الذائب (ملغم / مل)
A.oryzae	١٦,٣٥	0.481
A.niger	١٤,٩٤	0.421
A.flavus	١٢.65	0.389

٤-٧ تحديد الظروف المثلى للفطر *A. oryzae* لانتاج أنزيم تحلل النشأ

١- العناصر المعدنية في الوسط الزرعي

يظهر الشكل (١٠) ،إن لاستخدام الملحين معاً($MgSo_4$,KH_2Po_4) تأثيراً منشطا واضحاً في إنتاج إنزيمي الأميليز مقارنة بالمعاملة الخالية من الأملاح ، إذ بلغت الفعالية الانزيمية 20.75 وحدة /ملغم بروتين . بينما أظهرت المعاملة الخالية من الملحين المذكورين فعالية انزيمية بلغت ١٠,٣٩ وحدة / ملغم بروتين لإنزيم الأميليز.

وان $MgSO_4$ ١ مايكرومول يؤدي الى زيادة انتاج الأنزيم بوساطة *Bacillus sp.* (Sodhi وأخرون,٢٠٠٥;Goyal وأخرون ,٢٠٠٥), ولكن $CaCl_3$ و$MgSO_4$ تأثير ايجابي على انتاج الأنزيم (Francis وأخرون ,٢٠٠٣).وقد أظهرايونFe^{2+} أعلى فعالية انزيم ١٢٤µg/ml من جميع الأيونات المعدنية الأخرى, لكن µg/ml Hg^{2+} ٣٢ ثبط إنتاج الإنزيم (Arunsasi وأخرون ,2010).



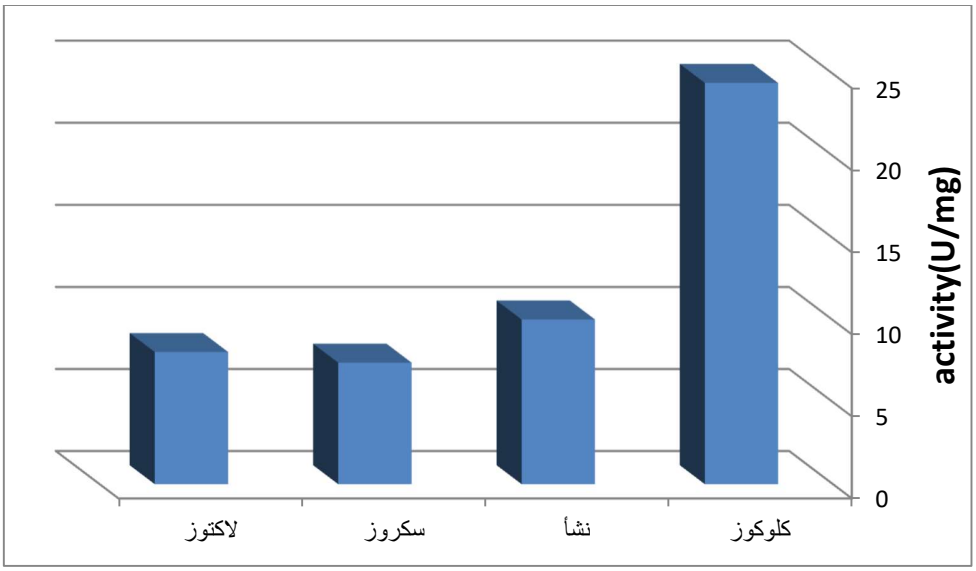
شكل (١٠) تأثير العناصر المعدنية على فعالية انزيم الأميليز وحدة /ملغم بروتين

٢- تحديد المصدر الكاربوني وتركيزه على فعالية انزيم الاميليز:-

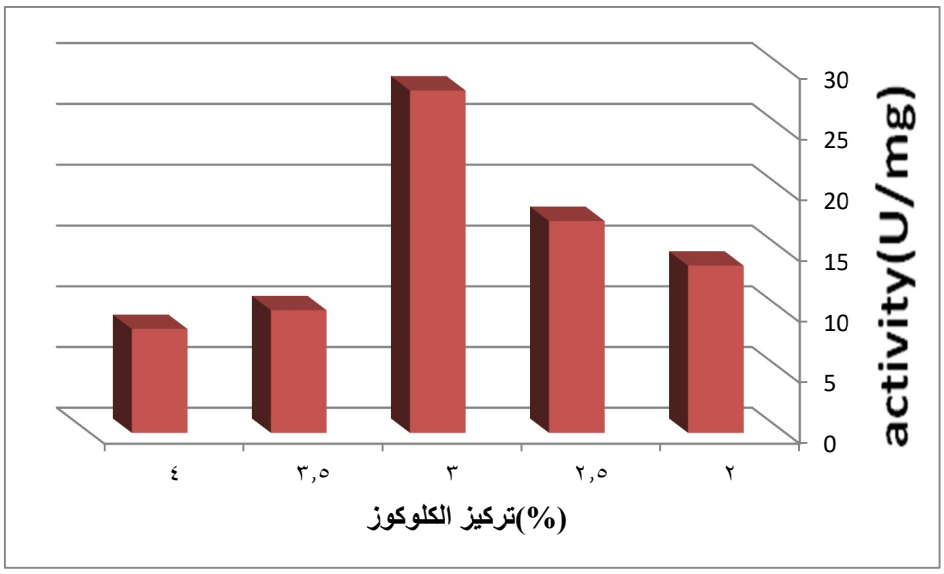
أظهرت النتائج في الشكل (١١)، ان استخدام الكلوكوز كمصدر وحيد للكاربون في الوسط أعطى اعلى فعالية انزيمية من انتاج الألفا اميليزتقدر٢٤,٤٥وحدة/ملغم ، بينما فعالية الانزيم ألفا أميليز عندما يستخدم النشأ (١٠,٠٤) وحدة/ملغم كمصدر وحيد للكاربون على الرغم من النشأ من المفترض أن يكون الأفضل كمصدر للكاربون , غير أن هذا قد يعود الى تعقيد تركيب النشأ حيث ينفع الكائنات الحية المجهرية لإنتاج البروتينات المختلفة وعوامل النمو بالمقارنة مع بساطة الكلوكوز كمصدر وحيد للكاربون . ان أضافة اللاكتوز والسكروز في الوسط ادى الى نشاط انزيمي يقدر٧,٤١,٨,٠٦وحدة/ملغم على التوالي.وعند الحصول على نشاط انزيمي عالي عند استخدام الكلوكوز كمصدر للكاربون من الممكن ان نستنتج ان هذا الانزيم يتم إنتاجه بشكل جوهري عن طريق الفطر*A.oryzea*وانها على نقيض من العديد من الالفا أميليز الاخرى.أشارت دراسات أخرى ان الفا املیز يحث الكلوكوز. وجود الكلوكوز يمكن ان يحث الانزيم بينما مالتوز ودكستروز والنشأ قابلة للذوبان تكون مناسبة لانتاج الانزيم الذي يتم الحصول عليه عند استخدام الكلوكوز (Pandy واخرون, ٢٠٠٠).

وجد (Chung et.al,1995) ان أضافة الكلوكوز الى الوسط الزرعي ليس له أي تأثير كابح لتحطم الالفا املیز المنتجة بواسطة *Thermococcus peofund*. وجد (Nahas,2002 & Waldemarin) ان الكلوكوز قادر على حث صناعة الفا املیز بواسطة *A. ochraceus*. بعد تحديد

مصدر الكاربون الأفضل بأنتاج الفا اميلز وعمل تراكيز من الكلوكوز المضاف الى وسط الانتاج (% 4,3.5,3,2.5,2) لمعرفة التركيز الافضل .النتائج في الشكل (١٢) اظهرت ان قدرة الفطر في انتاج الفا اميلز عندما استكمل الوسط مع تركيز الكلوكوز بنسبة ٣٪ نتج هذا التركيزعنه فعالية انزيم ٢٨,١٧ وحدة/ملغم لذلك يعتبر افضل تركيز للكلوكوزلإنتاج الفا اميليز وأستخدم في مراحل الدراسة اللاحقة كافة .



شكل (١١) تأثير مصادر مختلفة من الكاربون على فعالية انزيم الأمليز وحدة /ملغم بروتين

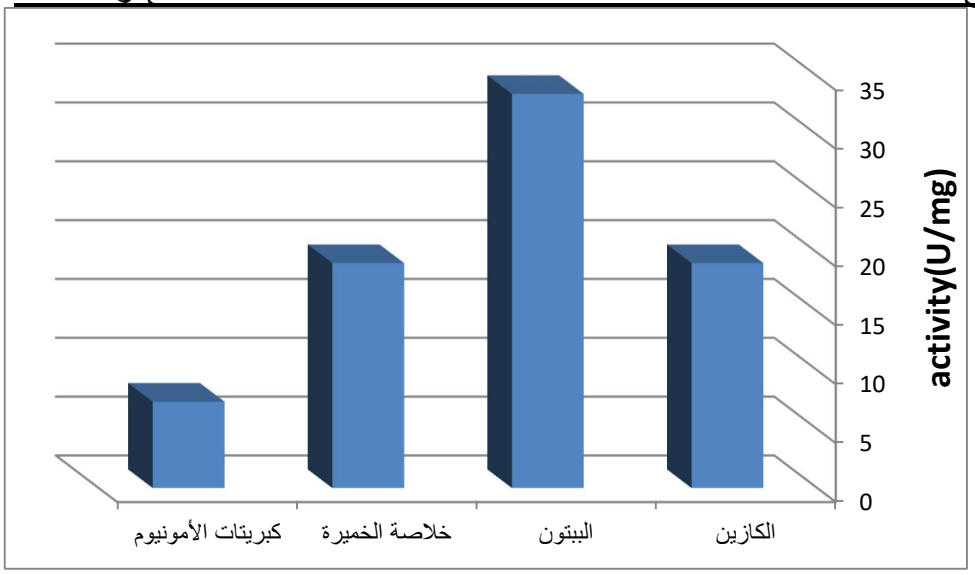


لشكل (١٢) تأثير تراكيز مختلفة من الكلوكوز على فعالية انزيم الأمليز وحدة /ملغم بروتين

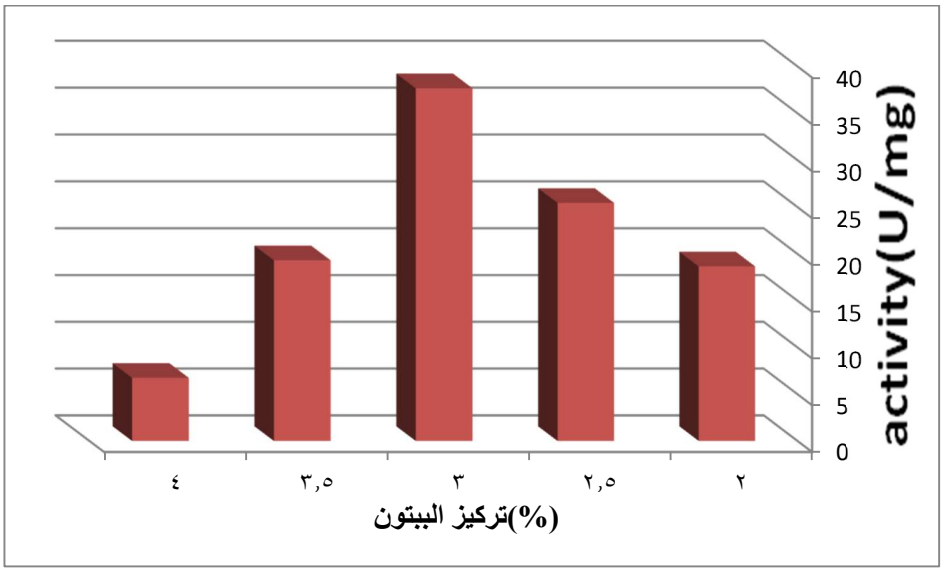
٣- تحديد المصدر النيتروجيني وتركيزه في فعالية انزيم الاميليز

اظهرت النتائج في الشكل (١٣) ان الوسط مع الببتون كمصدر وحيد للنتروجين ,أعطت اعلى فعالية ٣٣,٤٩وحدة/ملغم ,وخلاصة الخميرة والكازين فعالية انزيمية ١٩,١٢وحدة/ملغم. وتم الحصول على اقل فعالية عند استخدام كبريتات الامونيوم كمصدر للنتروجين وهو أدنى مستوى .

اظهر الشكل (١٤) ان تركيز الببتون الامثل كان في ٣٪,وكان هناك انخفاض ملحوظ في فعالية الانزيم عند تركيز ٤٪. (Hizukuri et.al,1994) وجدوا ان اعلى انتاجية للاميليز تم الحصول عليها عند استخدام خلاصة الخميرة والببتون كمصادر للنتروجين لإنتاج الفا اميليز من *Xanthomonas campestris*.وقد أظهرت دراسات أخرى أن الببتون كان مصدر النتروجين المناسب لانتاج الفا اميليز .حيث وجد (Hsu et.al,1998) ان اعلى انتاجية للألفا اميليز تم الحصول عليه في الوسط الذي يحتوي ببتون والنشأ قابل للذوبان مثل النتروجين ومصادر الكاربون. وقد وجد (Teodoro&Martinez,2000) أن أضافة مستخلص الخميرة أو الببتون الى وسط سائل تقصر فترة التأخر والزيادة لكل من الوزن الجاف للخلية وتركيب الانزيم المنتج .نتيجة لذلك يفضل خلاصة الخميرة والببتون لنمو وتخليق الاميليز بوساطه الكائنات الحية. وفي دراسة (Santos& Martinez,2003) أظهر ان الببتون كان مصدر النتروجين الامثل لتخليق الاميليز من *Bacillus sp.*,ويعتبر الببتون واحد من أفضل مصادر النتروجين لانها خليط من الاحماض الامينية والبروتينة والاملاح المعدنية بينما الخميرة هو مصدر لعوامل النمو والفيتامينات.



الشكل (١٣) تأثير مصادر مختلفة من النتروجين على فعالية انزيم الأميليز وحدة /ملغم بروتين



الشكل(١٤) تأثير تراكيز مختلفة من البيتون على فعالية انزيم الأميليز وحدة /ملغم بروتين

الاستنتاجات و التوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات *Conclusions*

١. شكلت انواع *Aspergillus ssp.* اكثر نسبة ظهور مقارنة بالفطريات من اجناس الاخرى

٢. اعطى الفطر *A. niger* اعلى إنتاج لانزيم البروتييز عند تنميته في وسط الانتاج واعلى فعالية بوجود العناصر المعدنية وافضل مصدر كاربون الكلوكوز وأفضل تركيز ١,٥٪ وأفضل مصدر نيتروجين الكازين وأفضل تركيز ١٪.

٣. اعطى الفطر *A. oryzae* اعلى إنتاج لانزيم الأميليز عند تنميته في وسط الانتاج واعلى فعالية بوجود العناصر المعدنية وافضل مصدر كاربون الكلوكوز وأفضل تركيز ٣٪ وأفضل مصدر نتروجين الببتون وأفضل تركيز ٣٪.

التوصيات *Recommendations*

1- دراسة قدرة الفطر *A. niger* و *A. oryzae* على انتاج انزيمات أخرى لاتقل اهمية عن الإنزيمات المدروسة مثل اللايبيز والسليليز والبكتينيز واليوليز.

٢- توصيف وتنقية الإنزيمات المنتجة في الدراسة الحالية لاستخدامها في مجال الصناعة وللمشاركة في الحد من التلوث البيئي.

٣- دراسة قدرة الفطريات على تحليل مخلفات خطرة مثل (مخلفات المجازر ومخلفات المجاري ومخلفات زراعية وصناعية اخرى).

المصادر

References

Abd-Aziz, S. ; Sin, T.; Alitheen, N.; Shahab, N. & Kamaruddin, K.(2008).Microbial Degradation of Chitin Materials by *Trichoderma virens* UKM1 . Journal of Biol. Sci ., 8(1): 52-59 .

Abu EA, Ado SA,& James DB.(2005) Raw starch degrading amylase production by mixed culture of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisae* grown on *Sorghum pomace*, Afr. J. Biotechnol.; 4; 785 – 790.

Abu Hila, Abdullah Nasser.(1987). Basics of Mycology, Public Libraries - King Saud University, Riyadh. P.325.(Arabic)

Agarwal, V. K. & Sinclair. J. B. (1997).principles of seed pathology .2 nd ed. Lewis puplishers.CRC press Inc.p: 539.

Alcamo,E.(1996).Fundamentals of microbiology.5thed.The Binjumin / cummings putlishing compang. pp: 451.

Al-Hussuna Y.R.(2005). Purification and Characterization of α – Amylase Produced by The Local Isolate *Xanthomonas campestris* H6. A Thesis coll.Sci. ,Univ.Al Nahrain.(Arabic)

Ali,S. ; Huang,Z, ; Zang,W. & Ren,S. (2011) . Production and Regulation of Extracellular Proteases from the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the Presence of Diamondback Moth Cuticle. Pakistan J. Zool., vol. 43(6):1203-1213.

ALseoha, M. M. A.; (2002). Microbial enzymes, Dar Nile for printing, first edition. .(Arabic)

Al-Tai , W.F. ; Taqi , N.K. ; Al-Nakkash , Sh.M. & Al- Ogaidi ; H.K. (1988) . Screening of fungal for protease production .J. Agric. Water Reco . Res. ; 7 : 11 – 24.

Alva S, Anupama J, Salva J, Chiu YY, Vyshali P, Shruthi M, Yogeetha BS, Bhavya D, Purvi J, Ruchi K, Kumudini BS & Varalakshmi KN.(2007).

Production and characterization of fungal amylase enzyme isolated from *Aspergillus sp*. JGI 12 in solid state culture. Afr. J. Biotechnol.; 6(5): 576 – 581.

Anke, T. , (1997). Fungal biotechnology. Chapman and Hall : London . Glassgow .

Anupama and Ravindra P.(2001). Studies on production of single cell protein by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of rice bran. Braz. Arc. Biol. Tec; 44: 79-88.

Arunsasi, M. S, Jegadeesh. G, Ravikumar. M.(2010) Submerged fermentation of amylase enzyme by *Aspergillius flavus* using cocos nucifera meal . K athmandu university Journal of Science,Engineering and Technology . 6(ll): 75-87.

Asgher M.,M.Javaid Asad,S.V. Rahman & R.L. Legge.(2007).Athermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. J.Food Eng. 79: 950-955.

Ashie, I. N. (2003). Bioprocess Engineering of Enzymes. Food Technolo. Feature**.** 57(1):44-51.

Aunstrap , K.(1968) . External enzyme of *Mucor Miehi* : their nature & formation .J. Bacterial ; 98 : 1224 – 1234 .

Aunstrap , K. (1980) . Proteinases In : "Microbial enzymes & bioconversion". A.H. Rose . Academic press Inc . , Newyork & London .

Barnett , H.L. & Bary , B.H. (1972) . Illustrated Genera of imperfect fungi . 3rd . Burgess pubilishing com .

Ben Abdelmalek-Khedher I., Udarci M.C., Limam F., Schmitter J.M., Marzouki M.N. & Bressollier P.(2008). Purification, characterization, and partial primary sequence of a major-maltotriose producing α-amylase, Sc Amy 43; from *Sclerotinia Sclerotiorum*. J. Microbiol. Biotechnol., 18: 1555-1563.

Bernfeld, P. (1951). Enzymes of starch degradation and synthesis. In: Advances in Enzymology. *3*: 379-428.

Bickerstaft , G.F. (1987) . Enzymes in industry and medicine – Edward Arnold . Great British .

Bidochka, M. & Khachatourians,G. (1988). N-Acetyl-d-Glucosamine – Mediated Regulation of Extracellular Protease in the Entomo -pathogenic fungus *Beauveria bassiana* .Appl. Environ. Microbiol. 54 (11): 2699-2704.

Bilinsk, E.A. (1987). Proteinases and beer production. Appl. Environ. Microbiol., 53: 495-499.

Bradford, M. (1976) . A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding . Analytical Biochemistry , 72: 248-254 .

Braga, G.; Destéfano, R. & Messias,C. (1999) . Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. Revista de Microbiologia. 30 : 107-113

Burhan, A. Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A. and Osman,G. (2003) Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkalineand

chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus Sp*. Isolate ANT-6. Proc. Biochem. **38**: 1397-1403.

Chakrabarti ; A. &Stotey , K. (2005) . Enzyme structure &mechanism , Appl . Biochem .Biotechnol ; 22 : 263 .

Chang , W.T.H. & Thayer , D.W. (1975) . The growth of *Cytophaga* on mesquite .Dev. Ind. Microbiol ; 16 : 456 – 464 .

Chung, Y. C., T. Kobayashi, H. Kanai, T. Akiba, and T. Kudo. (1995). Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432. Appl. Environ. Microbiol. **61:**1502-1506.

Chutmanop, J.; Chuichulcherm, S.; Chisti, Y. & Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 83:1012–1018.

Craickshank , R. ; Duguid , J.P. ;Marmion , B.P. & Swain , R. H . (1982) . The practice of medical microbiology , In : "Medical microbiology" , 12th ed . Edinburgh , London & Newyork , Vol 12 .

Cuervo-Parra,J. ; Ramírez-Suero,M. ; Sánchez-López,V. & Ramírez-Lepe,M. (2011) . Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. African Journal of Biotechnology . Vol. 10(52). pp. 10657-10663.

Dalaly , B.K. (1993) . Subjects of biological technology . 2nd . ed . Univ. of Mousel Press . (Arabic)

De Toni C.H. Richter , M.F.; changas , J.R. ; Henriques , J.A.P. & Termignoni , C. (2002) . Purification & Characterization of an alkaline Serine end opeptidase from feather degrading *Xanthomonas maltophilia* Strain . Can .J. Microbiolog ; 48 : 342 - 348 .

Denovan , P; Woodward , W ; Cherry , W.R; Morse, F.J.& Herwing , L.O . (1973) . An assessment of Solar energy as anational energy resource : International Biomass Energy coference Winnipeg Manitoba May 15 – 16 .

Dhar,P. & Kaur,G. (2010). Production of cuticle-degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different Media.African Journal of Biochemistry Research. 4(3):65-72.

Donatti, **A.; Furlaneto-Maia, L.; Fungaro, M. & Furlaneto, M.** (2008). Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle.Curr. Microbiol.56:256-260.

Doyle , M. P. ; Beuchat , L. R. and Montville , T. J. (1997) . Food microbiology fundamentals and frontiers . ASM press . Washington D C,USA. pp.171-191.

Dunil , P. (1980) . The current Status of enzymes technology . In : "Enzymiz & non - enzymic catalysis" .P. Dunil . ; A. Wiseman . & N. Blakebrorgh . Ellis Horwood 1td . ; C. chichester . England .

Elad, Y. & Kapat, A. (1999) .The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Pathology . 105: 177-189 .

Ellis , M.B. (1971) . Dematiaceous by phomycetes common weather mycological Institute . Kew , Survey , England.

Erlacher, A. ; Sousa, F. ; Schroeder, M. ; Jus, S. ; Kokol, V. ; Cavaco-Paulo, A. & Guebitz, G.(2006). A new cuticle scale hydrolysing protease from *Beauveria brongniartii*. Biotechnol Lett. 28:703–710.

Ertan F, Balkan B, Balkan S, Aktac T (2006). Solid state fermentation for the production of α–amylase from *Pencillium chrysogenum* using mixed agricultural by products as substrate. Biol. Bratis., 61:657–661.

Fogarty, W. M. and Kelly, C.T.(1980). Amylases, Amyloglucosidase and related glucanases. In: Microbial enzymes and Bioconversion (ed. Rose A.H.) Chp. 3: 115- 170. Academic Press. London.

Fogarty, W.M., (1983). Microbial amylases. In:(Microbial Enzymes and Biotechnology, W.M. Fogarty, ed., pp.2-71), Applied Science Publishers. London.

Francis, F., A. Sabu, K.M. Nampoothiri,S. Ramachandran, S. Ghosh, G. Sszakacs and A. Pandey, 2003. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of alpha amylase by Aspergillus oryzae, Biochem. Eng. J., 15: 107-115.

Friedberg, F. and Rhodes, C. (1986). Cloning and characterization of Beta – amylase gene from *Bacillus polymyxa*. J.Bacteriol., *163*(3): 819-824.

Gupta, S. ; Leathers, T. ; El-Sayed, G. & Ignoffo, C. (1992). Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. Experimental Mycology. 16: 132-137.

Ghanem, K. ; AL-Fassi,F. & Farsi, R. (2011). Statistical optimization of cultural condition for chitinase production from shrimp shellfish waste by *Alternaria alternata* .African Journal of Microbiology Research.Vol. 5(13).1649-1659.

Giovanna , H.S. (2005) . Characteristics of a proteinase of some bacterial strain isolated from Dungeness crab meat.App. microbiol. ; 14 : 110 - 114.

Godfrey, T. and West, S.(1996). Industrial enzymology, 2nd ed., p. 3. Macmillan Publishers Inc., New York, N. Y.

Goodfellow,M., Lacy, J. and Todd, C. (1987). Numerical classification of thermophilic *Streptomyces*. J. Gen. Microbiol., *133*: 3135-3149.

Got CE, Barbosa EP, Kistner LCI, GAndra RF, Arrias VL and Peralta RM.(1998). Production of amylase by *Aspergillus fumigatus*. Revista de Microbiologia ; 28: 99-103.

Goto C.E., Barbosa E.P., Kistner L.C.L, Moreira F.G., Lenartovicz V.,R.M.(1998) Peralta, Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing a-methyl-D-glucoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate, *FEMS Microbiol. Lett. 167* , 139–143.

Goyal, N., J.K. Gupta and S.K. Soni, 2005. A novel raw starch digesting thermostable alpha amylase from Bacillus sp. I-3 and its use in the direct grown on oil cakes and its ties. Braz. Arch. Biol. Technol., 47(2):309–

Guerra, N.P. and L. Pastrana, (2002). Production on mussel-processing waste supplemented with glucose and five nitrogen sources. Lett. Appl. Microbiol., 34: 114-118.

Guillen , R.J ; Pante P.J. & vanden C.A . (1992) . Efficient production of secreted proteins by fuugi , Appl . microbiol . Biotechnol ; 47 : 11 - 22 .

Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, and Chauhan B. (2003). Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. Process Biochem. *38*: 1599-1616.

Gupta, S. ; Leathers, T. ; El-Sayed, G. & Ignoffo, C. (1992). Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. Experimental Mycology. 16: 132-137.

Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM (1999). Purification and properties of the raw starch degrading α-amylase of *Bacillus* sp.IMD434. Biotechol. Lett. 21:111-5.

Hamlyn , P. F. (1997) . Fungal biotechnology . Electronic Version by internet fungus.org.uk/nwfg/Fungbiot.htm.

Haq, I., H. Ashraf, M.A. Qadeer and J. Iqbal, 2005. Pearl millet, a source of alpha amylase production by Bacillus lincheniformis, Biosensor. Technol., 96: 1201-1204.

Haq, I. U. ; Mukhtar, H. and Umber, H. (2008). Fermentation Medium Optimization For The Biosynthesis of Protease by *Penicillium chrysogenum* in shake flasks. Pakistan J. Zool. Vol. 40. (2): pp. 69-73.

Haq, I. U.; Mukhtar, H. and Umber, H. (2006). Production of protease by *penicillium chrysogenum* Through Optimization of Environmental conditions.Journal of Agriculture & Social Sciences.Vol.2. No.1: 23-25.

Hassan , Sh. S. (1996) . Production , Purification and Charactrization of protease from *Aspergillus oryzae* by solid Fermination . Ph .D. Thesis coll. Sci .Univ . Baghdad .(Arabic)

Henrissat B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. *280*: 309-316.

Heseltine C, Rolfsmeier M, Blum P. (1996). The glucose effect and regulation of α–amylase synthesis in the hypert hermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus.* J. Bacteriol., 178:945-950.

Hizukuri S., Abe J., Onitsuka N., Nankano T., Shibata Y., and Entani E.(1994). Purification and Characterization of Periplasmic a-Amylase from *Xanthomonas campestris* K-1 1 151. J. Bacteroil. *176*(12):3584-3588.

Holmquist,M.; Tessier D.C; Cygler, M.(1997). Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of *Geotrichum candidum* Lipase I and II . Biotechnology Research Institute. National Research Council of Canada..pp:13-34.

Howling, D. (1989). Mechanism of starch hydrolysis. International Biodeterioration, *15*: 15-19.

Hsu, W. H., Long L. L. Chyau C. C. (1998). Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. Biotechnol. Appl. Biochem. *28*: 61– 68.

Ire,**F. ; Okolo,B. ; Moneke,A. & Odibo,F**. (2011). Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation.African Journal of Food Science. 5(6): 353-365.

Irfan,M.,M. Nadeem and Q.Syed,(2012).Media optimization for amylase production in solid state fermentation of wheat bran by fungal strains J.Cell. Mol. Biol.,10:55-64.

Itkor, P., Shda, O., Tsukagoshi, N. and Udaka, S. (1989). Screening for raw starch digesting bacteria. Agric. Biol. Chem. *53*: 53-60.

Jalil R., Ibrahim W.A., Sarif M., Ali M., Hashim SH., Elham P., Tahar A.and Zahidi N.F.A.(2010) . Application of Local Enzymes Extracted from Selected Fungi Species in Bioethanol Production from Rice Straw. Biomass Asia Workshop7th, November 29-December 01, Jakarta, Indonesia.

Jaswal,R.; Kocher,G. & Virk,M. (2008).Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues:A statistical approach. Indian Journal of Biotechnology.7. 356-360.

Karthick R. N.& Nirmala , S . D.(2011) .Enhanced productionof alpha amylase using vegetable wastes by *Aspergillus Niger* strain SK01 marine isolate .

Kalpana M. D., Rasheedha A. Banu, G.R. Gnanaprabhal, B.V.Pradeep, M.Palaniswamy,(٢٠٠٨) .Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian Journal of Science and Technology*. 1, 7: 1-7.

Kim S and Dale BE.(2004) Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. Biomass and Bioenergy; 26: 361-375.

Kown-Chung, K.J. and Bennett, J.E. (1992). Medical Mycology. Lea & Febiqer.745 pp.

Krishna,V. ; Gupta,M. ; Gupta,N. ; Gaudani,H. ; Trivedi,S. ; Patil, P. ;Gupta, G. ; Khairnar,Y. ; Borasate,A. & Mishra,D. (2009). Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. International Journal of Microbiology Research. Vol.1. Issue.1. pp.14-18.

Kulp, K. (1979). Carbohydrates, In:(Enzyme in food processing, G. Reed, ed., Academic Press, New York, London. pp. 45-123.

Kumar,C. & Takagi,H. (1999).Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint.Biotechnology Advances. 17.561-594.

Kuo, M.J. and Hartman, P.A. (1966). Isolation of amylotic strains of *Thermoactinomyces vulgaris* and production of thermopholic actinomyces amylases J. Bacterio., *92*(3): 723-726.

Levine JS.(1996) Biomass burning and global change. In: Levine JS (eds) (vol. 1) Remote sensing and inventory development and biomass burning in Africa. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA; pp 35.

Lin L. L., Chyau C. C. and Hsu W. H. (1998). Production and properties of a raw-starch-degrading amylase from the thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. TS-23. Biotechnol. Appl. Biochem. *28:* 61–68.

Mahmood S. and Rahman S. R.(2008), Production and Partial Characterization of Extracellular α-Amylase by *Trichoderma viride.* Bangladesh J Microbiol, Volume 25, Number 2, December, pp 99-103.

Mala , B.R. ; Aparna , M.T. ; Mohini , S.G. & rasanti , V.D. (1998) . Molecular & Biotechnological Aspects of microbial proteases . American soc . microbiol ; 62 : 597 – 635 .

Marchisio,V.F.(1998).Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms **.** microbiol **.** Bioen ; 46 : 208 – 240 .

Martins M. L and Santos E.O.(2003). Effect of the medium composition on formation of amylase by *Bacillus sp*. Braz. arch. biol. technol. *46*(1):57 – 61.

Martins M. L. and Teodoro C. E.(2000). Cutlure condition for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Braz. J. Microbiol. *31*(4):982-302.

Mauro, B. and Kobayshi, T. (1951). Enzymatic scission of branch links in amylopectin. Nature *167*: 606 – 609.

Miller, G.L.(1959). Use of Dinitro Salicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. *31*(3): 426 – 428.

Mishra , R.R. & Kanaujia , R.S.(1973) . Observation on soil fungistasis in relation to soil depth , Seasonal changes soil Amendment & physico – chemical characteristics of the soil plant& soil ; 38 : 321 – 330 .

Mockellar , R.C. & cholett , H. (1984). Synthesis of Extracellular proteinase by *Pseudomonas fluoresens* under condition of limiting carbon , nitrogen & phosphate . Appl . Environ . Microbiol ; 47 : 1224 – 1227 .

Monod , M. Capoceia , S; Lechenne , B; Zauyg , C; Holdom , Mand Jousson , C (2002) .Secreted proteases . From pathogenle fungi – Int . J.Med . Microbiol . 292 : 405 – 419 .

Moubasher , A.H. (1993) . Soil fungi in Qatar & other arab countries . Dep . of . Bota .2nd ed .

Moubasher,A.H.;Abdel-Hafez,S.I.I.;Abdel-fattah,H.M.& Mohrran .(1982). Fungi of wheat and broad-bean staw composts-Mycopathology-78:161-168.

Muhammad.,Ayaz S. (2010). Enzymes: A revaluation in textile processing. *PTJ*.48-51.

Mukerjee S.K and Majumdar S.K.(1993) Fermentative production of alpha amylase by *Aspergillus flavus*. Indian J. Exp. Biol.; 11: 436-438.

Murachi , T. (1970) . Bromelain enzymes . In ; Methods in Enzymology . Academic press . Newyork ; 19 : 273 – 284.

Muthulakshmi, C.; Gomathi, D.; Kumar, D.; Ravikumar, G. ; Kalaiselvi, M. & Uma, C.(2011). Production ,purification and characterization of

protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation .Jordan Journal of Biological Sciences. Vol.4. No. 3. pp.137-148.

Nahas E. and Waldemarin M. (2002). Control of amylase production and growth characteristics of *Aspergillus ochraceus*. Microbiologia *44*(1): 5 – 10.

Nester, E. W.; Roberts, C. E.; Pearsall, N. N.; Anderson, D. G. and Nester, M. T. (1998). Microbiology. 2nd ed. Wcb. McGraw-Hill, USA

Nguyen Q.D., Rezessy-Szabo J.M., A. Hoschke,(2000) Optimisation of composition of media for the production of amylolytic enzymes by *Thermomyces lanuginosus* ATCC 34626, *Food Technol*. *Biotechnol*. *38* , 229–234.

North , M.J. (1982) . Comparative biochemistry of the protease of eukaryotic microorgnism . microbiol . Rev ; 46 : 308 - 340 .

Novo N., A/S. (2004). Enzymes at work . Bagsvaerd, Denmark. Oliveira; M. (2001). Production of fungal protein by solid substrate fermentation of cactus *Cereus peruvianus* and ficus indica.Quim Nova. 24(3)307- 310.

Obi, S.K.C. and Odibo F.J.C. (1984). Some properties of a highly thermostable α- amylase from a *Thermoactinomyces* sp. Can. J. Microbiol., *30*: 780-785.

Ogundero , V.W. & Osunlaja , T.F. (1986) . Thermophilic fungi from Nigerian palm produce . Mycologia ; 77 : 132 - 191.

Okafer , J.I. & Ada , N. (2000) . Keratinolytic activity of five human isolated of the dermatophytes . J. commun . Dis. ; 32 : 300 – 305 .

Olsson , L. (2004) . Investigation of cellulase & hemicellulase production in filamentous fungi during growth on cellulase , centar of process Biotechnology , Biocentrum – DTU , Tech .Uni of Denmark .

Oshoma,C.E.,E.E. Imarhiagbe,M.J.Ikenebomeh & H.E. Eigbaredon,2010.Nitrogen supplements effect on amylase production by *Aspergillus niger* using cassava whey medium.afri.J.Biotechnol.,9:682-686.

Palacios-Orueta A, Chuvieco E, Parra A & Carmona-Moreno C.(2005) Biomass burning emissions: a review of models using remote-sensing data. Environ Monit Assess; 104: 189-209.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Singh, D.& Mohan, R. (2000).). Advances in microbial amylases. Biotechnol.Appl. Biochem. (31):135-152.

Pandey.A, Nigamp V.T, SoccoL, Singh, D & Mohan.R,(2006). Advances in microbial amylases, Biochem, 31 35-152.

Pandey A, Webb C, Soccol CR & Larroche C (2005). Enzyme Technology. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers Inc., p. 760.

Pederson H, Neilson J (2000). The influence of nitrogen sources on α– amylases productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53:278-281.

Pitt , J.I. & Hoching , A.D. (1997) . Fungi & food Spoilage . Blackie academic & professional . 2nd ed . London . Newyork . Tokyo . Melbourne .

Priest, F.G. (1992). Enzymes, Extracellular. In: encyclopedia of microbiology. Academic Press, Inc. 2 : 81-93.

Priest, F.G. (1993). *Bacillus*. In:(Biotechnology, H-J. Rehm, and G. Reed, eds., pp. 368-400).

Qadar, S.A.U.; Shireen, E.; Iqbal, S. & Anwar, A. (2009). Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus sp*. PCSIREA-3 Indian Journal Biotechnology , 8: 286-290.

Rai , M.B. and Saxe , M.S . (1994) . Molecular & biotechnological aspects of microbial proteases , microbiol . Mol . Biol . Rev ; 62 : 579 - 615 .

Ramachandran S, Patel KP, Nampoothiri KM, Sandhya C, Szakacs G, Soccol CR& Pandey A (2004). α–amylase from a fungal culture grown on oil cakes and its ties. Braz. Arch. Biol. Technol., 47(2):309–318.

Rao , M.B.; Tanksale . A. P. & Deshpands , V.V. (2001) . Molecular & biotechnological aspects of microbiol proteases , Microbiol . Biol . Rev ; 62 : 597 – 635.

Raper , K.B. and Fennell , D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. The Williams & Wiking Co. , Battimor. 686 pp.

Rasooli I. Asthaneh S.D.A., Borna H. and Barchini K.A. 2008. A thermostable α-amylase producing natural variant of *Bacillus* spp. isolated from soil in Iran. Am. J. Agri. Biol. Sci., 3: 591-596.

Reddy, S.& Annapoorna Nimmagadda and K. R. S. Sambasiva Rao (2003). An overview of the microbial α-amylase family. African Journal of Biotechnology *2* (12): 645-648.

Renato P, Perez-Guerra N (2009). Optimization of amylase production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material. World J. Microbiol. Biotechnol., 25:1929–1939.

Reyed M.R.(2007).Biosynthesis and properties of extracellular amylase by encapsulation *Bifidobatrium bifidum* in batch culture.Aust.J.Basic Appl.Sci.1(1):7-14.

Rezaei, F., Xing, D., Wagner, R., Regan, J. M., Richard, T. L. and Logan, B.E. (2009) Simultaneous cellulose degradation and electricity production by Enterobactercloacae in an MFC. Appl. Environ. Microbiol. 192: 304–309.

Roohi, K.M., I.Z. Ahmad and J. M. Arif, 2011.Production of coldactive extracellular α-amylase by newly isolated *Microbacterium foliorum* GA2 from gangotri glacier, Western Himalaya, India. Asian. J. Biotechnol., 3: 449-459.

Rustum, Y. S. I. (1997). Aflatoxin in food and feed occurance, Legistatation an activation by physical methods. Food chemistry ,59:57-67.

Sakaki, H,. Kurosawa, K, and Takao, S. (1986). Screening of microorganisms for raw starch saccharifying enzyme production. Agric. Biol. Chem., *50*(6): 1661-1664.

Salva G. and Moraes T. (1994). Effect of pH and temperature on *Bacillus subtilis* ATCC 601 amylase production. Some properties of the crude enzyme. Rev. Microbiol., São Paulo, Brasil. 25:119-25.

Sarhan T. A.,(2012). Mycology practical. Printed book by the City College of Science University of Baghdad, first edition, p 62. .(Arabic)

Saurabh, S.; Jasmine, I.; Pritesh, G. & Kumar, R. (2007). Enhanced productivity of serine alkaline protease by *Bacillus* sp. Using soybean as substrate. Malaysian Journal of Microbiology .3(1).1 – 6.

Settakana , P. (1992) . Solid state fermentation for water soluble protein enrichment of soyabean using mixed cuitures . Bangkok (Thailand) . (Abstract) .

Sevinc,N. &Demirkan, E. (2011). Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. J.Biol. Environ.Sci. 5(14): 95-103.

Shukri, M. M..(1991). The basics of fungi and plant diseases. Dar al-Hikma Press Printing and Publishing - University of Baghdad - and the Ministry of Higher Education and Scientific Research. 396 pages .. .(Arabic)

Shumi , W. ; Towhid , H. & Anwar , M.N. (2004) . Protolytic activity of Bacterial isolate *Bacillus fastidiosus* , .J. , Biological Sci ; 4 : 370 – 374 .

Sidkey, N. M., Abo-Shadi, M. A., Al-Mutrafy , A. M., Sefergy, F. and Al-Reheily, N. (2010) Screening of Microorganisms Isolated from some Enviro-Agro-Industrial Wastes in Saudi Arabia for Amylase Production. J. Americ. Sci. 6 (10): 926-939.

Silva,B.; Ulhoa,C. ; Batista,K. ; Yamashita,F. & Fernandes, K . (2011). Potential Fungal Inhibition by Immobilized Hydrolytic Enzymes from *Trichoderma asperellum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59: 8148–8154.

Sinha S., Sinha S.,studies on the production of acid protease by submerged Fermentation. *International Journal of Food Engineering*, **2009**, 5, 1

Sivaramakrishnan, S. Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R. & Pandey, A. (2006) Alpha amylase from microbial sources: an over view on recent developments. Food. Technol. Biotechnol. 44 (2): 173- 184.

Sodhi, H.K., K. Sharma, J.K. Gupta and S.K. Soni, 2005. Production of a thermostable alpha amylase from Bacillus sp. PS-7 by solid-state fermentation and its synergetic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production, Process Biochem., 40: 525-534.

Somogyi , N. (1952) . Notes on sugar determination , .J. Biol . Chem ; 195 : 19 – 23 .

Sonia , K.G. chadha , A. K. & saini , H.S. (2004) . Diversity of hemicellulases in thermophilic fungi . Dep of micro , India , Guru Nanak Dev Univ ; 1 – 18 .

Southgate , D.A.T (1976) . Determination of food Carbohydrates . Applied science published , London .

Stanley , G. (1998) . Cheeses. In: Wood BJB, editor. Microbiology of fermented foods, 2nd ed, vol 1. London: Blackie Academic & Professional: 263-307.

Suganthi, R., Benazir, J.F., Santhi, R., Ramesh Kumar, V., Anjana Hari, Nitya Meenakshi, Nidhiya, K. A., Kavitha, G., Lakshmi, R.(2011) amylase production by *Aspergillus niger* under solid state

fermentation using agroindustrial wastes. International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST). 3. 2,1756-1763.

Sumantha, A. ; Deepa,P.; Sandhya,C.; Szakacs,G.; Soccol, C . & Pandey, **A**.(2006). Rice Bran as Substrate for Proteolytic Enzyme Production . Brazilian Archives of Biology and Technology.49. 5.843-851.

Takasaki, Y.(1989). Nvel maltose – producing amylase from *Bacillus megateruim* G-2. Agric. Biol. Chem. *53*(2): 341-347.

Takekawa, S., Uozumi, N,. Tsukagoshi, N. & Uda, S. (1991). Proteases involved in generation of β- and α- amylase from a large amylase precursor in *Bacillus polymyxa*. J. Bacteriol *173*(21): 6820-6825.

Tambekar,D. & Tambekar ,S. (2011). Partial Characterization and Optimization of Protease Production from newly isolated *Cohnella Thermotolerans* from Lonar Lake .Journal of Research in Biology.1.4:292 – 298

Theradimani , B.E. & Sullen , G.F . (2002) . Purificaltion & characterization of protease from microorganisms isolated from soil . Appl . Biochem . Biotechnol ; 35 : 144 – 154 .

Tonozuka, T., Ohtsuka, M., MoGi, S-I., Sakai, H., Ohta, T. & Sakano, Y. (1993). A neeophullulanase – type α-amylase gene from *Thermoactinomyces vulgaris* R-47. Biosci. Biotech. Boichem., *57*(3): 395-401.

Tuite, J.F. (1969). Plant Pathological Methods: Fungi and *Bacteria*. Burgess Publishing, Minneapolis, Minnesota, USA, pp.1-238.

Tsurn , D. & Yoshimoto , T. (1987) . Microbiol Proteases . In : Hand book of microbiology (eds . Laskin , A.I. & Lechevalier , H.A.) . VII. CRC Press Florida ; PP:239 – 283.

Upton, M.E. & Fogarty, W.M. (1977). Production and purification of thermostable amylase and protease of *Thermomonospora viridis*. Appl. Environ. Microbiol., *33*(1): 59-64.

Ustyazharina , S.V ; Yarovenko , V.L. & Voinarskii , I.N.(1985). Synthesis of protease & amylase by washed cells of *Aspergillus oryzae* . Appl . Biochem . microbiol ; 22 : 55 – 58 .

Valaparla,V.K.,(2010).Purification and properties of a thermostable α-amylase by *Acremonium sporosulcatum*. Int. J. Biotechnol. Biochem., 6:25-34.

Vale – Vage , .P. (1984) . Proteolytic enzymes in food industry . Quoted from FSTA . (1986) ; 18 : 65 .

van D. M. MJEC, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L (2002). Properties and applications of starchconverting enzymes of the α-amylase family. J. Biotechnol. 94:137-155.

Varalakshmi KN, Kumudini BS, Nandini BN, Solomon J, Suhas R, Mahesh B and Kavitha AP.(2009) Production and characterization of α-amylase from *Aspergillus niger* JGI 24 isolated in Bangalore. Polish Journal of Microbiology; 58: 29-36.

Venkata , R P.& Puvanakrishnan , R. (1993) . Microbiol enzyme technology as an alternative to conventional chemicals in leather industry Sci , Rep ; 30 : 58 – 61.

Vishwanathan P, Surlikar NR (2001). Production of alpha amylase with *Aspergillus flavus* on amaranthus grains by SSF. J. Basic Microbiol., 41:51-64.

Wang , S.H. ; Wang , J. & Bulfraz , M. (2005) . Efficient cellulase production from corn straw by *Trichoderma reesi* LW1 through soild state fermentation process , Univ of Hebei , China , coll of food Sci Agri . (abstract).

Wen Z, Liao W and Chen S.(2004). Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. Bioresour Technol 2; 91: 31-39.

Whitaker, J.R. and Bernhard, R.A. (1972). Experiments for an introduction to Enzymology. The Wibber Press Davis.

Yegin, S. ; Lahore,M. ; Guvenc,U. & Goksungur,Y.(2010). Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM 809. African Journal of Biotechnology. 9(38): 6380-6386.

Zambara,V. (2010). Strain improvement of alkaline protease from *Trichoderma reesei* MTCC-3929 by physical and chemical mutagen. The IIOAB Journal. Vol.1 Issue.1.

Summery

Isolated fungi had been estimulated to growth on some food samples, which were obtained from the local markets and put them in nylon bags and conservation in the laboratory atmosphere . *Aspergillus ssp.*were diagnosted from food samples and determine the efficiency of those isolates to produce protease and amylases enzymes. The best isolated was selected by using solid media conteining pepton and casein separately . Five isolates showed its ability to produce protease and three isolates the most efficient enzyme secretion amylases, the diameter of transparent Halo around fungal colonies larger than 15 mm. *Aspergillus niger* showed the highest effectiveness in producing protease (18.97 Unit/ML) ,with protein concentration (0.460 mg/ml) , This fungal isolate was selected to make other tests including improve their productivity and create optimal conditions for growth and protease production in liquid media and mineral elements of various carbon and nitrogen concentration .it was found that the use of metal components have an impact on the effectiveness of the enzyme. Glucose was the best carbon source at concentration(1.5 %) and the best source of casein was 1%. *Aspergillus oryzea* achieved the highest effectiveness to produce the amylases (16.35Unit/ML) and protein concentration(0.481mg/ml), and also studied the effect of some factors on the effectiveness of the enzyme. The mineral elements activated enzyme and the best source of carbon was glucose at concentration (3 %), and the best source of nitrogen was pepton at concentration (3%) .

Ministry of Higher Education and Scientific Resear
University of Karbala
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology

Effect of some Nutrient compounds on Enzymatic activity of some Aspergillus isolates

A thesis

submitted to the Council of The College of Education for Pure Science , University of Karbala in partial fulfillment of requirements for the degree of Master of Science / botany

By
Sarab Fadel Hussein al-Amiri
(Bachelor of science in/2002)

Under Supervision of
Prof. Dr. Ban Taha Mohammed

1435 A.H **2013 A.D**