

Efficiency of fungus *Aspergillus fumigatus* (Thermophilic fungi) to produce Glycoamylase enzyme

كفاءة الفطر *Aspergillus fumigatus* المتحمل لدرجات الحرارة العالية Glycoamylase في إنتاج أنزيم Thermophilic fungi

م.د. بان موسى حسن الزبيدي
جامعة كربلاء/ كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة

الخلاصة :

تم الحصول على عزلة الفطر *Aspergillus fumigatus* المتحمل لدرجات الحرارة العالية من تربة أحد المناطق الصحراوية في محافظة كربلاء في شهر آب من سنة 2010 وبعد إجراء الاختبار الأولي للعزلة على وسط آكار النشا تبين أن العزلة كفاءة عالية في إنتاج أنزيم الكلواميليز Glycoamylase , بعد إجراء اختبارات مختبرية متعددة لتحديد الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم من العزلة تبين أن النشا 1% كمصدر كربوني و 0.2% من كبريتات الأمونيوم كمصدر نتروجين ودرجة حرارة 45م° ورقم هيدروجيني 6 وبلقاح قدره 15 ملم, ومدة حضانة أربعة أيام في حاضنة ساكنة كانت هي الظروف المثلى في إنتاج الأنزيم .

Abstract

The fungus *Aspergillus fumigatus* (Thermophilic fungi) isolate from Kerbala government , in August 2010 so the fungus tested in term of producing glycoamylase . Results revealed that , this fungus had high ability to produce enzyme .The main objective of this study was to produce glucoamylase under optimum conditions The maximum activity of glucoamylase from this fungus was recorded in the culture after 96 hours , the best temperture 45c° and 6 pH , starch the best as carbon source and NH₃So₄ anitrogen source , so the inculation 15 mm were considered as the best to produce enzyme.

المقدمة:

يعد أنزيم الأميليز Amylase أحد الأنزيمات المهمة جداً حيث يقوم هذا الأنزيم بتكسير النشا الى سكر , كما يعد هذا الأنزيم الخطوة الأولى في العمليات الكيميائية للهضم لتواجده في لعاب الإنسان (1). تحتوي أطعمتنا بصورة عامة على كميات كبيرة من النشا مثل الرز Rice والبطاطا Potato و الخبز Bread والتي تعطي طعماً حلواً "خفيفاً" في الفم عند المضغ بسبب تحول جزء منها الى سكريات بفعل عمل أنزيم الأميليز Amylase . يصنف أنزيم الأميليز الى ثلاثة أنزيمات هي α -Amylase والأسم المرادف له Calcium metallo (1,4- α -D-glycanohydrolase; glycogenase) ويعد هذا الأنزيم من الأنزيمات الفلزية enzyme فهو غير قادر على القيام بعمله كاملاً" بغياب الكالسيوم ويعمل هذا الأنزيم على تحطيم السلاسل الطويلة للكربوهيدرات مثل (النشا) في مواقع عشوائية Action at random locations وفي النهاية ينتج Maltose أو Maltoriose أو قد ينتج Maltose و Glucose و (Limit dextrin) وهو مركب صمغي يستخرج من النشا , وبالتالي فإن α -Amylase يقود الى عمل الأنزيم الثاني β -Amylase والأسم المرادف له (1,4- α -D-glycan maltohydrolase; Saccharogen amylase) يعمل هذا الأنزيم على النهايات غير المختزلة فيحفز التحلل المائي للأواصر الكلايكوسيدية الثانوية 1,4 Second α -glucosidic bond , ومع الوقت فإن هذا الأنزيم يقسم النشا الى وحدات كلوكوز ثنائية (Maltose) (2). الأنزيم الثالث γ -Amylase والأسم المرادف له (Glucan 1,4- α -glucosidase; amyloglucosidase) أو Glycoamylase (GA) ورقمه التصنيفي (EC 3.2.1.3) يعمل هذا الأنزيم على أختراق الروابط الكلايكوسيدية -1 α glucosidic linkages (4) النهائية في النهايات غير المختزلة لل Amylopectin و Amlase محرراً الكلوكوز بمعنى آخر يحفز هذا الأنزيم التحلل المائي للمالتوز الى جزيئين من الكلوكوز (3) . الأميليزات من أول الأنزيمات التي عرفت بأهميتها في مجال التصنيع الغذائي حيث قام العديد من الباحثين باستخلاصها من العديد من النباتات وخاصة الحبوب (4) . بالرغم من إمكانية الحصول على الانزيمات من مصادر متعددة مثل النبات Plant والحيوان Animals ولكن تعد الاحياء المجهرية مصدراً " أنزيمياً" مهماً لا يضاهاى لكونها تحتاج الى مساحات محدودة في التربية والرعاية وإمكانية معالجتها وراثياً" (5).

بالإضافة الى سهولة ويسر الحصول على الأحياء المجهرية وسهولة التحكم بظروف النمو وأمكانية تنميتها على أوساط ذات كلفة واطنة وسهولة الاستخلاص , كما تعد بعض السلالات ذات كفاءة عالية في إنتاج الأنزيمات (3)
وتعد الفطريات أحد أهم الأحياء المجهرية المنتجة للأنزيمات مثل انزيم Cellulase و Protease و Amylase و Lipase (6).
نظرا" لأهمية هذا الأنزيم الحيوية وأهميته الصناعية هدفت هذه الدراسة الى :
1- دراسة إمكانية الفطر *Aspergillus fumigatus* المتحمل لدرجة الحرارة العالية والمغزول من البيئة المحلية في إنتاج أنزيم الكلواميليز Glycoamylase
2- دراسة بعض الظروف المزروعية لتنشيط الظروف المثلى لإنتاج الأنزيم .

المواد وطرائق العمل

أولاً: عزل وتشخيص الفطر

تم عزل الفطر *Aspergillus fumigatus* من أحد التربة الصحراوية في محافظة كربلاء في شهر آب / 2010 وبعد زراعة العزلة وتنقيتها على وسط PDA شخّصت العزلة من قبلنا في المختبر وباستخدام المفاتيح التصنيفية : (7;8) .

ثانياً: تنمية وحفظ العزلة الفطرية

نميّ الفطر ونقي على وسط آكار البطاطا دكستروز PDA وحضن بدرجة حرارة 45م° فحصت الأطباق بعد مرور خمسة أيام من الحضن حفظت العزلات الفطرية على وسط PDA حيث صب الوسط في أنابيب اختبار بشكل مائل وحفظت في الثلاجة بدرجة 4 – 8 م° (9).

ثالثاً: وسط آكار النشا

حضر الوسط بحسب طريقة (10) مع بعض التحوير من قبلنا وتضمن الوسط المواد التالية: 2غم NaNO_3 , 1غم $\text{NH}_4)_2$ (So₄)₂ , 1غم KH_2PO_4 , 0.5غم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5غم KCl , 0.5غم CaCl_2 , 0.01غم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01غم $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.005غم $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.001غم $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15غم Agar ذوبت المكونات في لتر ماء مقطر وأضيف الى الوسط 5غم من النشا Starch .

رابعاً: وسط إنتاج أنزيم الكلواميليز

استخدم عصير التمر الزهدي بعد تدعيمه بمصدر كربوني ونيتروجيني وبعض الأملاح في إنتاج أنزيم الكلواميليز من عزلة الفطر *Aspergillus fumigates* إذ تم اعداد العصير , و قياس المحتوى الكلي للكربوهيدرات الموجودة في العصير تبعاً لطريقة الفينول – حامض الكبريتيك الموصوفة من قبل (11) , ثم خفف عصير التمر المستحصل عليه الى تركيز 0.5% (كربوهيدرات كلية) ودعم ببعض المغذيات التي شملت النشا وكبريتات الأمونيوم وكبريتات المغنسيوم وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وبعد أتمام عملية الأذابة عدل الرقم الهيدروجيني (pH) الى 4.7 وكمل الى 1 لتر بالعصير نفسه , قسمت البيئة الى أحجام متساوية قدرها (50) مل ووضعت في دوارق حجم (250) مل ثم عقرت بوساطة المؤصدة بدرجة حرارة 121م° لمدة 15 دقيقة وبعد انتهاء عملية التعقيم أخرجت الدوارق وبردت الى درجة حرارة الغرفة لتهيئتها لعملية التلقيح .

خامساً: تهيئة بيئة النمو والحضن

- 1- تنشيط العزلة الفطرية : نشط الفطر على اطباق تحوي PDA مع ضبط الرقم الهيدروجيني pH الى 4.5 على درجة حرارة 45 م° لمدة 7 أيام .
- 2- اختبار قدرة الفطر على إنتاج الأنزيم : تم أخذ لقاح من الفطر المنشط في الفقرة (خامساً-1) بحجم قرص قطره 6 ملم وزرع في وسط الطبق الحاوي على وسط آكار النشا حضنت الأطباق بدرجة 45م° في حاضنة ساكنة ثم قيس أقطار الهالات الشفافة حول المستعمرة الفطرية دلالة على تحلل النشا .
- 3- اختبار الفعالية الأنزيمية للفطر : نقل قرص قطره 15 ملم من الفطر المنشط النامي على وسط PDA الوارد في الفقرة (خامساً-1) الى وسط الإنتاج الوارد في الفقرة رابعاً وحضنت النماذج في حاضنة ساكنة على درجة حرارة 45 م° ثم قيس الفعالية الأنزيمية.

سادساً: دراسة الظروف المزروعية المثلى لإنتاج أنزيم الكلواميليز من الفطر *A. fumigatus*

- 1-تحديد مدة الحضن : تمت متابعة إنتاج الأنزيم من الفطر *A. fumigatus* لفترة عشرة أيام حيث كان يسحب يومياً 1 مل لغرض تقدير الفعالية الأنزيمية.
- 2- تحديد درجة الحرارة المثلى : أختبرت عدة درجات حرارية تضمنت (25م° و 30م° و 35م° و 40م° و 45م° و 50م°) لمعرفة تأثيرها في إنتاج الأنزيم إذ تم حضن العينات في الدرجات الحرارية أعلاه لمدة أربعة أيام في حاضنة ساكنة ثم قدرت الفعالية الأنزيمية.
- 3- تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل : أختبرت عدة أرقام هيدروجينية pH تضمنت (3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8) لدراسة تأثيرها في إنتاج الانزيم حضنت العينات بدرجة 45م° لمدة أربعة أيام في حاضنة ساكنة ثم قدرت الفعالية الأنزيمية.

- 4-تأثير المصدر الكربوني : أضيفت المصادر الأتية (نشا , مالتوز , فركتوز , إضافة الى المعاملة الخالية من المصدر الكربوني) بتركيز 1% (وزن / حجم) لدراسة تأثيرها على إنتاج الأنزيم حضنت النماذج في حاضنة ساكنة لمدة أربعة أيام وبدرجة حرارة 45°م وبرقم هيدروجيني 3.
- 5- تأثير المصدر النتروجيني :أضيفت المصادر النتروجينية الأتية (كبريتات الأمونيوم و كلوريد الأمونيوم و يوريا و مستخلص الخميرة و إضافة الى المعاملة الخالية من المصدر النتروجيني) كلا" على حدة وبتركيز 0.2% لتحديد أفضلها في إنتاج الأنزيم وتحت الظروف الوارد ذكرها في أعلاه.
- 6-تحديد حجم اللقاح : لفحت الدوارق بقرص قطره (5 , 10 , 15 , 20 , 25) ملم من الفطر وحضنت تحت الظروف السابق وضعها لتحديد حجم اللقاح الأمثل لإنتاج الأنزيم .

سابعا": تقدير الفعالية الأنزيمية

قدرت فعالية أنزيم الكلوكواميليز وفقا" للطريقة الموصوفة من قبل (12) والمحورة من قبل (13) وتعرف وحدة الفعالية الأنزيمية بأنها كمية الأنزيم التي تحرر (1 مايكرومول) من الكلوكوز في الدقيقة تحت ظروف القياس وبأستخدام المعادلة الأتية:

$$\text{الفعالية الأنزيمية (وحدة/مل)} = \frac{\text{الأمصاصية لمحللول الأنزيم}}{\text{مدة الحضانة} \times \text{عامل التخفيف}}$$

النتائج والمناقشة

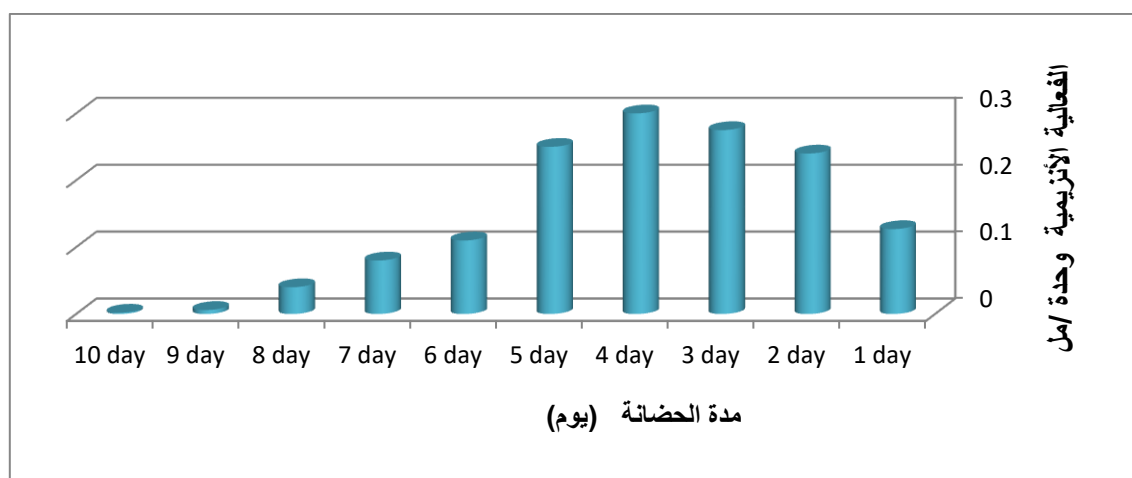
أولاً": العزلة الفطرية

تم الحصول على عزلة الفطر *A.fumigatus* من أحد الترب الصحراوية في محافظة كربلاء في شهر آب / 2010 تمتاز العزلة بالنمو السريع على وسط PDA حيث يبلغ قطر المستعمرة 7- 8 سم خلال سبعة أيام ذات سطح مخملي , بحافات بيضاء , والمستعمرة بصورة عامة ذات لون رصاصي مخضر , اما ظهر الطبق بدون لون , الحامل البوغي قصير , ناعم ذو لون أخضر , والأبواغ كروية الى شبه كروية الشكل , خضراء اللون ناعمة هذه المواصفات تنطبق مع ما جاء به كل من (7;8) .

كان للعزلة كفاءة عالية في إنتاج الأنزيم على وسط اختبار قابلية الفطر على إنتاج الأنزيم الوارد في ثالثا" من مواد وطرائق العمل حيث بلغ معدل أقطار الهالات الشفافة حول المستعمرات 16.5 ملم دلالة على تحلل النشا .

ثانياً": تأثير مدة الحضانة للفطر *A.fumigatus* على إنتاجه لأنزيم الكلوكواميليز

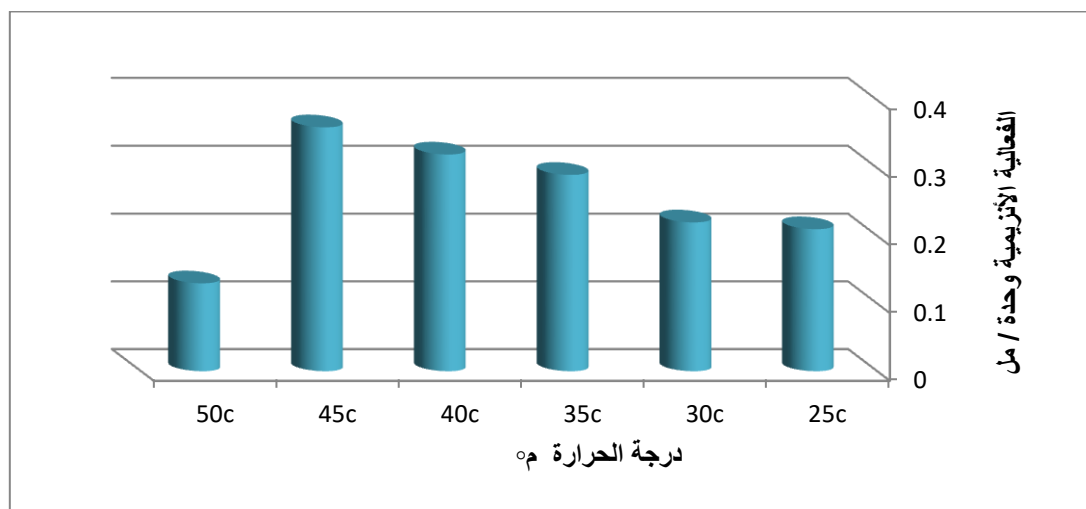
بينت النتائج أن أفضل إنتاجية لأنزيم الكلوكواميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus* كانت عند اليوم الرابع فقد بلغت الإنتاجية 0.3 وحدة / مل بينما بلغت 0.275 وحدة /مل و 0.240 وحدة / مل لكل من اليومين الثالث والثاني على التوالي كما بلغت في اليوم الأول 0.172 بدأت الفعالية بالتناقص ابتداء من اليوم السادس حتى وصلت الى ادنى مستوياتها في اليوم العاشر وكما موضح في الشكل (1) , وهذه النتيجة متقاربة مع ما جاء به (14) حيث أعطت عزلة الفطر *Aspergillus oryzae* أعلى إنتاجية لأنزيم الكلواميليز بعد مرور 120 ساعة , وأنفقت نتائجنا مع ماذكره (15) من أن أعلى إنتاجية للأنزيم المذكور كانت 96 ساعة , أن الفعالية الأنزيمية تعتمد على نوع الأنزيم ومصدر الأنزيم والأرتباطات الحاصلة بين الأنزيم والعوامل الأخرى المرتبطة بالمصدر المنتج (16) وقد تعزى هذه النتيجة الى أن اليوم الرابع كان اليوم الأفضل لتكامل نمو العزلة الفطرية المنتجة فأن سرعة بناء الحوامض الأمينية في الطور الخضري تقدر عشرة أمثال ما هو عليه في الأبواغ وبذلك يمكن تخليق البروتينات أسرع مما هو عليه في الأبواغ كما أن إنتاج الأنزيمات يصل أقصاه في طور الثبات ثم ينخفض .



الشكل (1) تأثير مدة الحضانة على إنتاج أنزيم الكلوكواميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus*

ثالثاً: درجة الحرارة

كانت درجة الحرارة 45م° هي الدرجة المثلى في إنتاج أنزيم الكلوكوأميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus* حيث بلغت الفعالية 0.36 وحدة / مل بينما بلغت الفعالية (0.21 , 0.29 , 0.32) لكل من الدرجات (25, 30, 35, 40) م° على التوالي بينما لوحظ انخفاض كبير في الفعالية الى 0.13 وحدة / مل عند درجة حرارة 50م° الشكل (2) قد يعود سبب كون درجة 45م° أعطت أعلى كفاءة في الإنتاجية لكونها الدرجة المثلى لنمو الفطر بينما كانت الدرجات الأقل أقل إنتاجية لتباطئ النمو الفطري عند هذه الدرجات وبالتالي تأخر في تخليق الأنزيم وقلة في الإنتاجية كما أن ارتفاع درجة الحرارة عن 45م° أثر سلباً بشكل واضح على الفعالية الأنزيمية قد يعود السبب أن درجة الحرارة أثر على الروابط الهيدروجينية للأنزيم والتأثير على البنية الثلاثية للبروتين مما أدى الى مسخ الأنزيم (17)

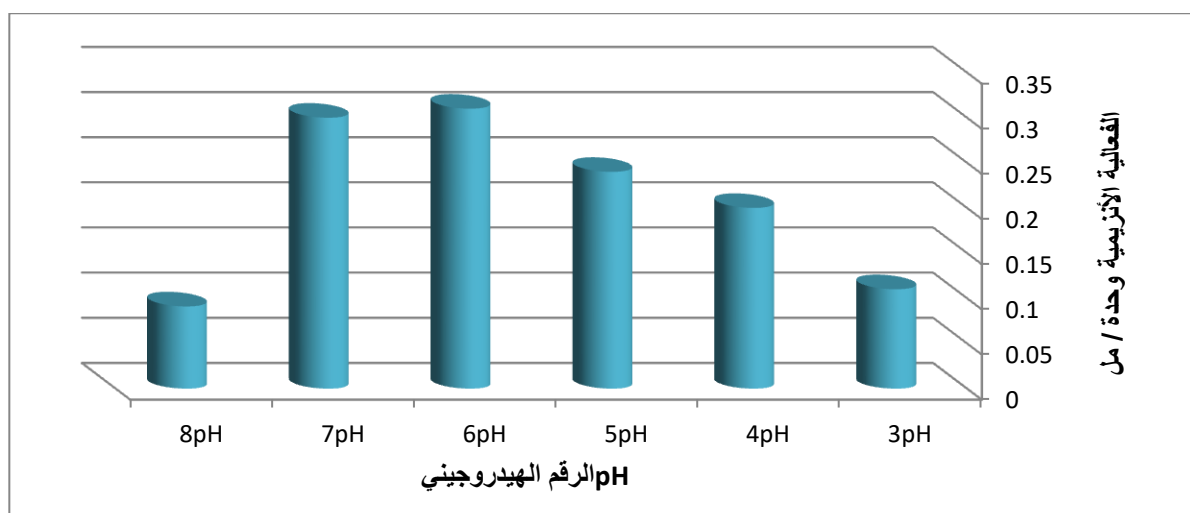


الشكل (2) تأثير درجة الحرارة على إنتاج أنزيم الكلوكوأميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus*

رابعاً: الرقم الهيدروجيني

كان الرقم الهيدروجيني 6 هو الرقم الأمثل في إنتاج أنزيم الكلوكوأميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus* حيث بلغت الفعالية 0.31 وحدة / مل بينما بلغت 0.30 وحدة / مل عند الرقم 7 في حين كانت الفعالية (0.11, 0.20, 0.24) لكل من الأرقام الهيدروجينية (3, 4, 5) وحدة / مل على التوالي , بينما بلغت 0.091 وحدة / مل للرقم الهيدروجيني 8 نلاحظ انخفاض الفعالية بشكل كبير عند الأرقام الحامضية والقاعدية المتطرفة بالمقارنة مع الأرقام المتعادلة والقريبة من المتعادلة شكل (3). يؤثر الرقم الهيدروجيني في ثبات الأنزيمات المنتجة وليس بالضرورة أن يتطابق الرقم الهيدروجيني الأمثل للإنتاج مع الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم (18) , وأن تغير الرقم الهيدروجيني يؤثر على الصفات الأيونية لجزيئة الأنزيم وعلى مكونات وسط التفاعل الأخرى (19).

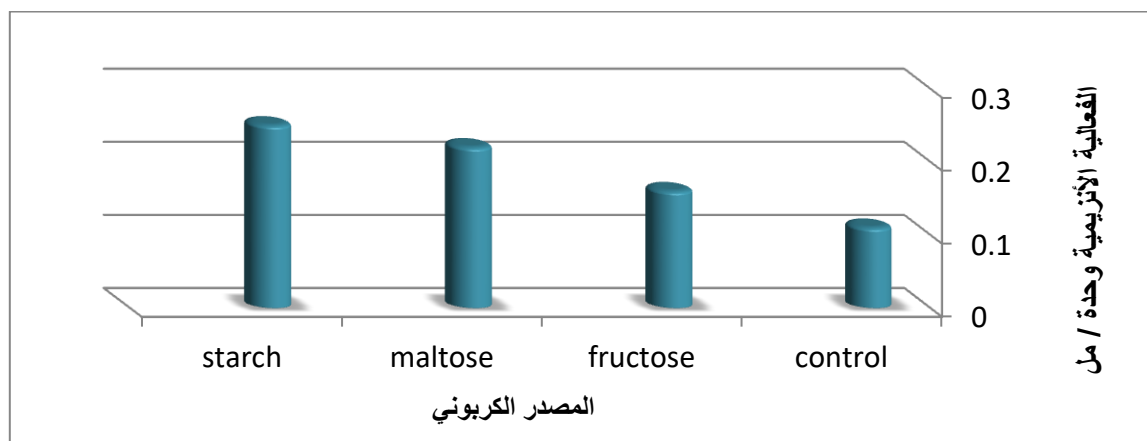
نتائجنا جاءت مقارنة مع ماجاء به (20) حيث بين أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج الأنزيم كان 6.5 بينما كانت النتيجة مختلفة مع ما ذكره (21) إذ كان الرقم الأمثل لإنتاجية الأنزيم 4.8 .



الشكل (3) تأثير الرقم الهيدروجيني على إنتاج أنزيم الكلوكوأميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus*

خامساً: المصدر الكربوني

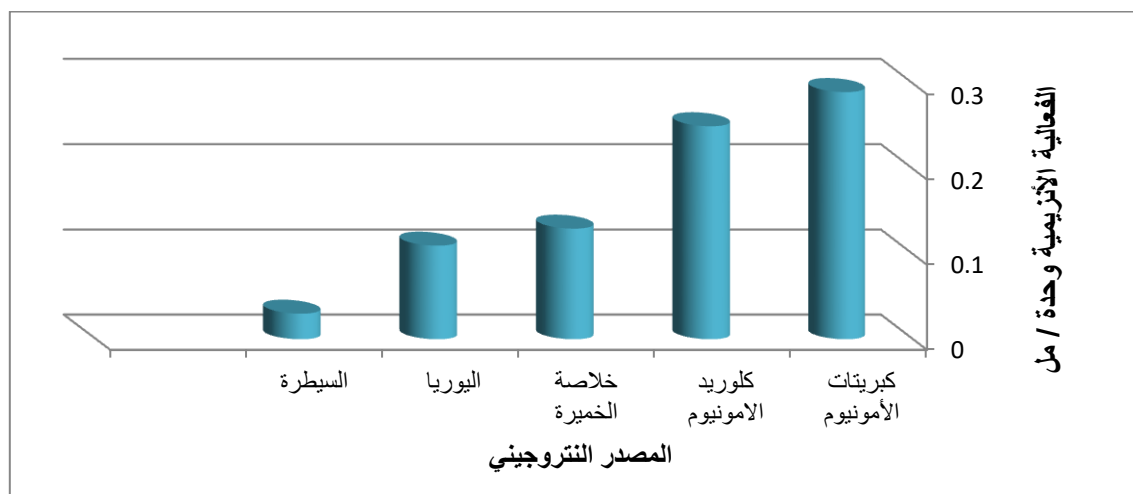
بينت النتائج أن النشا (starch) كان المصدر الكربوني الأمثل لإنتاج الأنزيم من عزلة الفطر *A.fumigatus* إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 0.25 وحدة / مل تلاه المالتوز (maltose) وفعالية قدرها 0.22 وحدة / مل ثم الفركتوز (fructose) بفعالية قدرها 0.16 وحدة / مل أما معاملة السيطرة (بدون مصدر كربوني) فقد بلغت الفعالية 0.11 وحدة / مل الشكل (4) ، وأن وجود المادة الأساس (substrate) في الوسط ضروري لإنتاج الأنزيم المطلوب فكل إنزيم مادة معينة أو مجموعة مواد متشابهة كيميائياً يستطيع أن يؤثر فيها دون غيرها وهذا مايسمى بالتخصص الأنزيمي ، بين (22) ان مكونات الوسط الزراعي المستخدم للتنمية لها تأثير مهم على إنتاج الأنزيم .



الشكل (4) تأثير مصدر الكربون على إنتاج أنزيم الكلوكواميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus*

سادساً: المصدر النتروجيني

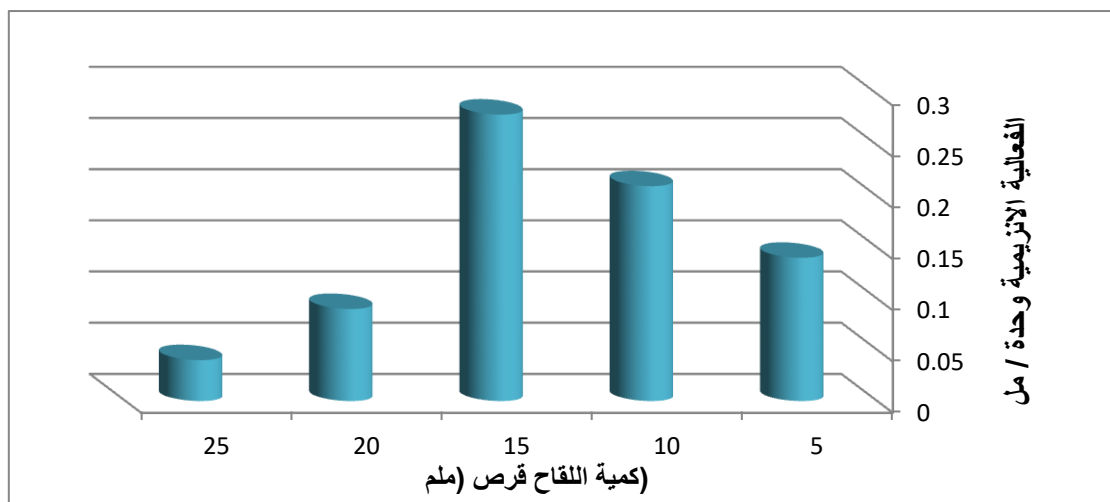
أوضحت النتائج أن كبريتات الأمونيوم كانت الأفضل كمصدر نتروجيني لإنتاج الأنزيم فقد بلغت الفعالية الأنزيمية 0.29 وحدة / مل تلاه كلوريد الأمونيوم بفعالية بلغت 0.25 وحدة / مل أنخفضت الفعالية الى (0.13 و 0.11) وحدة / مل لكل من خلاصة الخميرة واليوريا على التوالي بينما كانت الفعالية في أدنى مستوى لها في معاملة السيطرة (بدون مصدر نتروجيني) حيث بلغت 0.03 الشكل (5)، هذه النتيجة جاءت متقاربة مع ما جاء به (15) إذ بين أن كبريتات الأمونيوم كانت الأفضل في إنتاج الأنزيم .



الشكل (5) تأثير المصدر النتروجيني على إنتاج أنزيم الكلوكواميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus*

سابعاً: كمية اللقاح

بينت النتائج أن أفضل كمية لقاح كانت بقرص قطره 15 ملم من مستعمرة نقية للفطر *A.fumigatus* حيث بلغت الفعالية الأنزيمية 0.28 وحدة / مل بينما بلغت (0.21 و 0.14) وحدة / مل عندما كانت كمية اللقاح 10 ملم و 5 ملم على التوالي , أنخفضت الفعالية الأنزيمية بعد زيادة كمية اللقاح الى 20 ملم , 25 ملم الى (0.09 و 0.04) وحدة / مل على التوالي وكما موضح في الشكل (6) يتضح من النتائج أن كمية الأنزيم ازدادت بزيادة كمية اللقاح تصاعدياً حتى الوصول الى القرص بقطر 20 ملم أذ انخفضت الفعالية انخفاض مفاجئ وقد يعود السبب الى زيادة كمية اللقاح وأستنفاد المادة الغذائية في وسط الإنتاج وزيادة المواد الايضية السامة داخل الوسط (19).



الشكل (6) تأثير كمية اللقاح على أنتاج أنزيم الكلوكواميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus*

المصادر References

- 1) Fogarty ,W.M and Kelly ,C.T (1980) Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. In: Rose AH (ed) Microbial enzymes and bioconversions. Academic Press, London, pp. 115-170.
- 2) Dariush, N.; Azim, A.; Jeno ,M. S and Murray, M.Y.(2005) Fungal glucoamylases . Department of Chemical Engineering, University of Waterloo . Canada N2L 3G1.
- 3) Fogarty ,W.M. (1983). Microbial Amylases. In: *Microbial Enzyme and Biotechnology*, Applied Science Publishers, London, UK .pp. 1–90.
- 4) Ghavidel , R. A. and Davoodi , M. G. (2011). Evaluation of Changes in Phytase , α -Amylase and Protease Evaluation of Changes in Phytase, α -Amylase and Protease Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics IPCBEE vol.5
- 5) Reed, G. (1975). Carbohydrases. In: *Enzymes in Food Processing*, 2nd, Academic Press . New York .Robinson and N. A. Eskin (Ed) P. 175.
- 6) Steel, R.G.D., T.H. Torrie and D. Dickey. 1996. Principles and Procedures of Statistics . A Biometrical Approach. 3rd Ed. McGraw Hill Book Co., New York, USA.
- 7) Moubasher ,A.H.(1993)Soil fungi in Qatar and other arab countries .Doha ,university of Qatar , center of scientific and applied research .First published.
- 8) Pitt , J.I. and Hocking ,A.D.(1997). Fungi and food spoilage (Second ed.) Shampain and Hill .U.K. PP:989.
- 9) Evans , E.G.V. and Richardson ,M.D. (1989) Medical mycology : a practical approach .IRL press , oxford university ,Oxford , England .
- 10) Antranikian,G. (1992) Microbial Degradation of Starch. In: *Microbial Degradation of Natural Products*, G. Winkel (Ed.), VCH Publishers, Weinheim, Germany .pp. 27–51.
- 11) Dubois , M ; Gilles , K .A ; Hamilton , J . K ;Rebers , P.A and Smith ,F (1959) . Colorimetric method from determination of sugars and related substances .Anal .Bioch , 28 (3):350-356.

- 12) Specka ,U .; Mayer ,F .and Antranikian,G .(1991) Purification and properties of athermoactive glucoamylase from *Clostridium thremosaccharolyticum* applied and environment microbiology ,Aug . pp 2317-2323.1
- 13) Al-Ghanimi, A.A ; Al-Ethari,A.Y.and Al-Ahmar ,S.D .(2007) Effect of cultural condition on the production of glucoamylase from *Aspergillus ustus* .Kerb uni jor .V5.N2 :61-68.
- 14) Ritech, P . A and Barkha, S .(2011) Production of Glucoamylase by *Aspergillus oryzae* Under Solid State Fermentation Using Agro Industrial Products . Inter Jour of Microbio Res 2 (3): 204-207.
- 15) Haq , N.B ; Mohammed , H .R ; Rakhshanda , N ;Muhammad , A ; Raheela , P; Abdul ,J . (2007) Optimization of Media for Enhanced Glucoamylase Production in Solid-State Fermentation by *Fusarium solani* . *Food Technol. Biotechnol.* 45 (1) 51–56 .
- 16) Javeri, S. and Uhlenbruck, G. (2004). Isolation of β -galactosidase . Clin Biochem . 22: 735 – 739.
- 17) Bickerstaff,G.F. (1987) Enzyme in industry and medicine .Edward, A.Publishers Ltd .,London .
- 18) Volesky ,B. and Luong , I . (1985) Microbiol enzymes production purification and isolation . Critical reviews in biotechnology ; 2: 119-146.
- 19) Pandey, A.; Nigam, P.; Soccal, C. R.;Soccal, V. T.; Singh, D. and Mohan, R. (2000). Advances in Microbial amylase. Biotechnol. Appl. Biochem. 31: 135-152.
- 20) Egwin,E.C and O.B,Oloyed .(2006) Comparison of α amylase activity insome sprouting .Nig .Cereal.Biokemistri,18:15-20.
- 21) Muhammed ,I ; Muhammed ,J.A ; Muhammed ,G ; Rahma ,T.Q ; Hina ,G ;Nizsh ,M ; and Arshad ,N.C .(2012) Glycoamylase production from *Aspergillus niger* by using solid state fermentation. *Pak. J. Bot.*, 44(6): 2103-2110.
- 22) Demarco ,J.L and Felix ,C.R .(2002) Characterization of protease produced by *Tricoderma harzianum* isolste which controls cocoa plant witches ,broome disease .BMS Biochemi;3:3 .(article).