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

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

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 أجراء الأختبار الأولي للعزلة على وسط آكار النشا تبين أن للعزلة كفاءة عالية في أنتاج أنزيم الكلوكواميليز Glycoamylase ، بعد أجراء أختبارات مختبرية متعددة لتحديد الظروف المثلى لأنتاج 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 أنتاج الأنزيم .

Abstract

The fungus *Aspergillus fumigatus* (Thermophilic fungi) isolate from Kerbala govermant , 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 tempreture 45c◦ and 6 pH , starch the best as carbon source and NH_3So_4 anitrogen sourse , so the inculation 15 mm were considerd as the best to produce enzyme.

المقدمة:

يعد أنزيم الأميليز Amylase أحد الأنزيمات المهمة جدا" حيث يقوم هذا الأنزيم بتكسير النشا الى سكر ، كما يعد هذا الأنزيم الخطوة الأولى في العمليات الكيميائية للهضم لتواجده في لعاب الأنسان (1).

تحتوي أطعمتنا بصورة عامة على كميات كبيرة من النشا مثل الرز Rice والبطاطا Potato و الخبز Bread والتي تعطي طعما" حلوا" خفيفا" في الفم عند المضغ بسبب تحول جزء منها الى سكريات بفعل عمل أنزيم الأميليز Amylase .

يصنف أنزيم الأميليز الى ثلاثة أنزيمات هي Amylase –α والأسم المرادف له (1,4-α-D-glycanohydrolase; glycogenase) ويعد هذا الأنزيم من الأنزيمات الفلزية Calcium metallo enzyme فهو غير قادر على القيام بعمله كاملا" بغياب الكالسيوم ويعمل هذا الأنزيم على تحطيم السلاسل الطويلة للكاربوهيدرات 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 فأن Amylase –α يقود الى عمل الأنزيم الثاني Amylase –β والأسم المرادف له (1,4-α-D-glycan maltohydrolase; Saccharogen amylase) يعمل هذا الأنزيم على النهايات غير المختزلة فيحفز التحلل المائي للأواصر الكلايكوسيدية الثانوية Second α- 1,4 glucosidic bond ، ومع الوقت فأن هذا الأنزيم يقسم النشا الى وحدات كلوكوز ثنائية (Malltose) (2).

الأنزيم الثالث Amylase -ɤ 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 α(1- 4) glucosidic linkages النهائية في النهايات غير المختزلة لل Amlase و Amylopectin محررا" الكلوكوز بمعنى آخر يحفز هذا الأنزيم التحلل المائي للمالتوز الى جزيئتين من الكلوكوز (3) .

الأميليزات من أول الأنزيمات التي عرفت بأهميتها في مجال التصنيع الغذائي حيث قام العديد من الباحثين بأستخلاصها من العديد من النباتات وخاصة الحبوب (4).

بالرغم من أمكانية الحصول على الانزيمات من مصادر متعددة مثل النبات Plant والحيوان Animals ولكن تعد الاحياء المجهرية مصدرا" أنزيميا" مهما" لايضاهى لكونها تحتاج الى مساحات محدودة في التربية والرعاية وأمكانية معالجتها وراثيا" (5).

بالأضافة الى سهولة ويسر الحصول على الأحياء المجهرية وسهولة التحكم بظروف النمو وأمكانية تنميتها على أوساط ذات كلفة واطئة وسهولة الاستخلاص ، كما تعد بعض السلالات ذات كفاءة عالية في أنتاج الأنزيمات (3)
وتعد الفطريات أحد أهم الأحياء المجهرية المنتجة للانزيمات مثل انزيم Cellulase و Protease و Amylase و Lipase (6).
نظرا" لأهمية هذا الأنزيم الحيوية وأهميته الصناعية هدفت هذه الدراسة الى :
1- دراسة أمكانية الفطر *Aspergillus fumigatus* المتحمل لدرجة الحرارة العالية والمعزول من البيئة المحلية في أنتاج أنزيم الكلوكواميليز Glycoamylase
2- دراسة بعض الظروف المزرعية لتثبيت الظروف المثلى لأنتاج الأنزيم .

المواد وطرائق العمل

أولا":عزل وتشخيص الفطر

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

ثانيا": تنمية وحفظ العزلة الفطرية

نميَّ 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 أختبار بشكل مائل وحفظت في الثلاجة بدرجة 4 – 8 مْ (9).

ثالثا": وسط آكار النشا

حضر الوسط بحسب طريقة (10) مع بعض التحوير من قبلنا وتضمن الوسط المواد التالية :2غم $NaNo_3$ ، 1غم $(NH_4)_2 (So_4)$ ، 1غم KH_2Po_4 ، 0.5 غم $Mg So_4.7H2o$ ، 0.5 غم KCl ، 0.5غم $CaCl_2$, 0.01 غم $FeSo_4.7H_2o$ ، 0.01 غم $CaSo_4.H_2o$ ، 0.005 غم $MnSo_4.H_2o$ ، 0.001غم $ZnSo_4.7\ H_2o$ ، 15 غم Agar ذوبت المكونات في لتر ماء مقطر وأضيف الى الوسط 5 غم من النشا Starch .

رابعا" : وسط إنتاج أنزيم الكلوكواميليز

استخدم عصير التمر الزهدي بعد تدعيمه بمصدر كربوني ونتروجيني وبعض الأملاح في أنتاج انزيم الكلوكواميليز من عزلة الفطر *Aspergillus fumigates* اذ تم اعداد العصير ، و قياس المحتوى الكلي للكربوهيدرات الموجودة في العصير تبعا" 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 عقمت بوساطة المؤصدة بدرجة حرارة 121م° لمدة 15 دقيقة وبعد أنتهاء عملية التعقيم أخرجت الدوارق وبردت الى درجة حرارة الغرفة لتهيئتها لعملية التلقيح .

خامسا": تهيئة بيئة النمو والحضن

1- تنشيط العزلة الفطرية : نشط الفطر على اطباق تحوي PDA مع ضبط الرقم الهيدروجيني pH الى 4.5على درجة حرارة 45 م° لمدة 7 أيام .
2- أختبار قدرة الفطر على أنتاج الأنزيم : تم أخذ لقاح من الفطر المنشط في الفقرة(خامسا"-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- أختبار الفعالية الأنزيمية للفطر : نقل قرص قطره 15 ملم من الفطرالمنشط النامي على وسط PDA الوارد في الفقرة (خامسا"-1) الى وسط الأنتاج الوارد في الفقرة رابعا" وحضنت النماذج في حاضنة ساكنة على درجة حرارة 45 م° ثم قيست الفعالية الأنزيمية.

سادسا": دراسة الظروف المزرعية المثلى لأنتاج أنزيم الكلوكواميليز من الفطر *A. fumigatus*

1-تحديد مدة الحضن : تمت متابعة أنتاج الأنزيم من الفطر *A. fumigatus* لفترة عشرة أيام حيث كان يسحب يوميا" 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 ° و50م°) لمعرفة تأثيرها في أنتاج 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 أنتاج 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 ، أضافة الى المعاملة الخالية من المصدر الكربوني) بتركيز 1% (وزن / حجم) لدراسة تأثيرها على أنتاج الأنزيم حضنت النماذج في حاضنة ساكنة لمدة أربعة أيام وبدرجة حرارة 45م° وبرقم هيدروجيني 3.

5- تأثير المصدر النتروجيني :اضيفت المصادر النتروجينية الأتية (كبريتات الأمونيوم و كلوريد الأمونيوم و يوريا و مستخلص الخميرة و أضافة الى المعاملة الخالية من المصدر النتروجيني) كلا" على حدة وبتركيز 0.2% لتحديد أفضلها في أنتاج الأنزيم وتحت الظروف الوارد ذكرها في أعلاه.

6-تحديد حجم اللقاح : لقحت الدوارق بقرص قطره (5، 10 ، 15 ،20، 25) ملم من الفطر وحضنت تحت الظروف السابق وضعها لتحديد حجم اللقاح الأمثل لأنتاج 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:

الفعالية الأنزيمية (وحدة/مل) = الأمتصاصية لمحلول الأنزيم / مدة الحضن x عامل التخفيف

النتائج والمناقشة

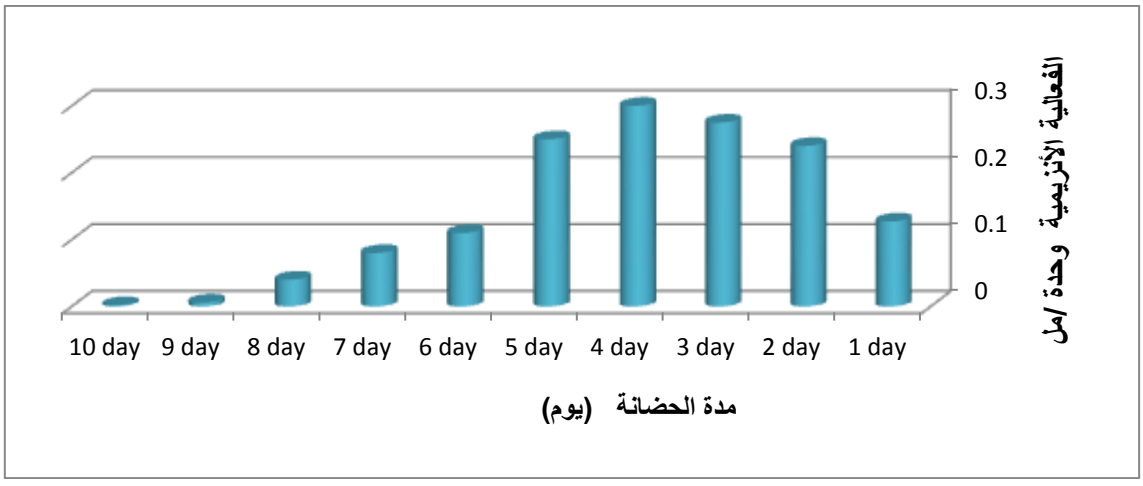
أولا": العزلة الفطرية

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 ماجاء به كل من (8;7) .

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

ثانيا":تأثير مدة الحضن للفطر *A.fumigatus* على أنتاجه لأنزيم الكلوكواميليز

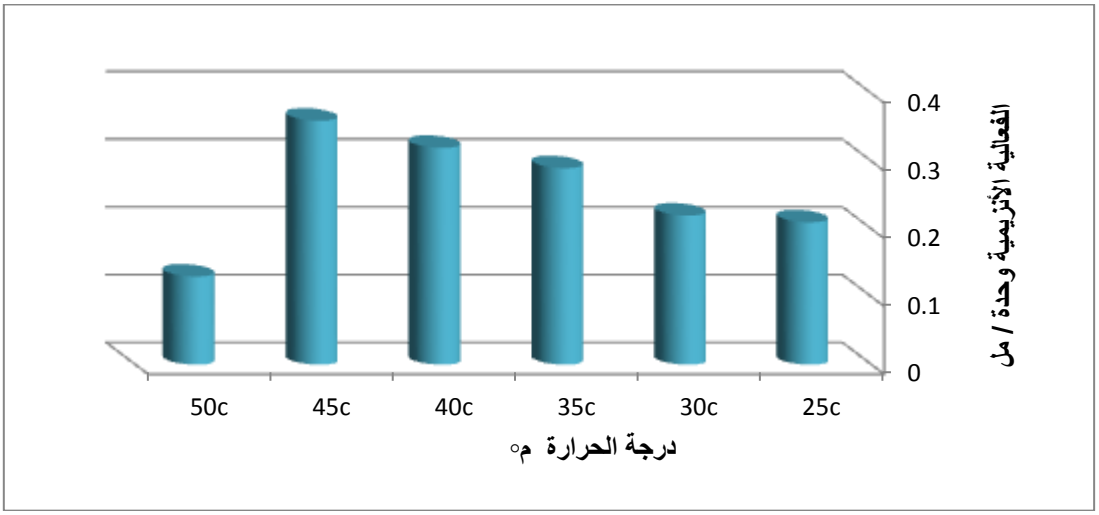
بينت النتائج أن أفضل أنتاجية لأنزيم الكلوكواميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus* كانت عند اليوم الرابع فقد بلغت الأنتاجية 0.3 وحدة / مل بينما بلغت 0.275 وحدة /مل و 0.240 وحدة / مل لكل من اليومين الثالث والثاني على التوالي كما بلغت في اليوم الأول 0.172 بدأت الفعالية بالتناقص أبتداء من اليوم السادس حتى وصلت الى ادنى مستوياتها في اليوم العاشر وكما موضح في الشكل (1) ، وهذه النتيجة متقاربة مع ماجاء به (14)حيث أعطت عزلة الفطر *Aspergillus oryzae* أعلى أنتاجية لأنزيم الكلوموأميليز بعد مرور 120 ساعة ،وأتفقت نتائجنا مع ماذكره (15) من أن أعلى أنتاجية 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 ماهو عليه في الأبواغ وبذلك يمكن تخليق البروتينات أسرع مما هو عليه في الابواغ كما أن أنتاج الأنزيمات يصل أقصاه في طور الثبات ثم ينخفض .



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

ثالثا": درجة الحرارة

كانت درجة الحرارة 45م° هي الدرجة المثلى في أنتاج أنزيم الكلوكوأميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus* حيث بلغت الفعالية 0.36 وحدة / مل بينما بلغت الفعالية (0.21 , 0. 22 , 0.29 , 0.32) لكل من الدرجات (25, 30 ,35 ,40) م°على التوالي بينما لوحظ أنخفاض كبير في الفعالية الى 0.13 وحدة / مل عند درجة حرارة 50م° الشكل (2) قد يعود سبب كون درجة 45م° أعطت أعلى كفاءة في الأنتاجية لكونها الدرجة المثلى لنمو الفطر بينما كانت الدرجات الأقل أقل أنتاجية لتباطئ النمو الفطري عند هذه الدرجات وبالتالي تأخر في تخليق الأنزيم وقلة في الأنتاجية كما أن أرتفاع درجة الحرارة عن 45م° أثر سلبا" 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)

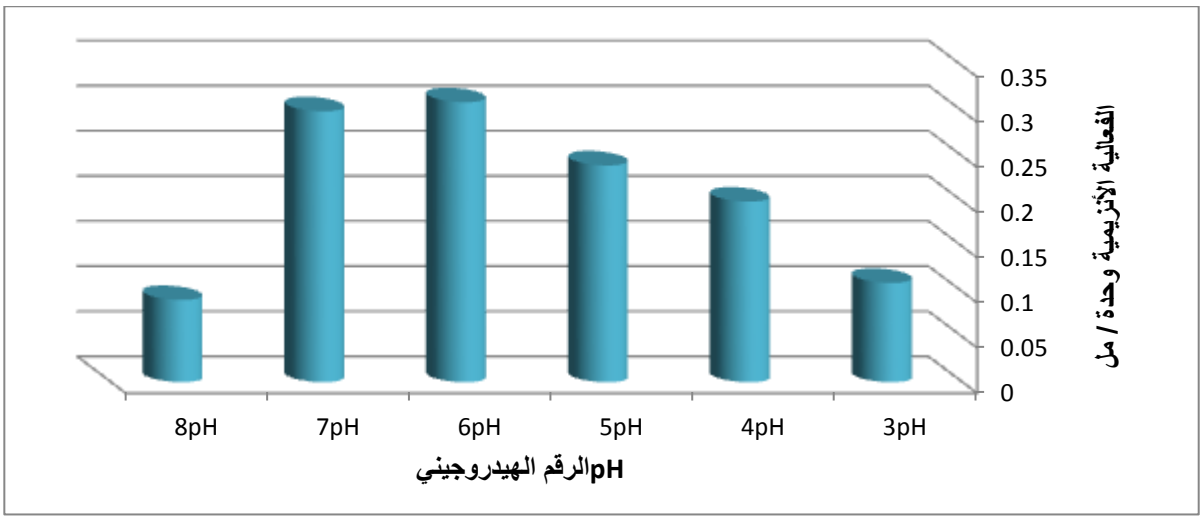


الشكل (2) تأثير درجة الحرارة على أنتاج أنزيم الكلوكواميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus*

رابعا": الرقم الهيدروجيني

كان الرقم الهيدروجيني 6 هو الرقم الأمثل في أنتاج أنزيم الكلوكوأميليز من عزلة الفطر *A.fumigatus* حيث بلغت الفعالية 0.31 وحدة / مل بينما بلغت 0.30 وحدة / مل عند الرقم7 في حين كانت الفعالية (0.24,0.20,0.11) لكل من الأرقام الهيدروجينية(5,4,3) وحدة / مل على التوالي ، بينما بلغت 0.091 وحدة / مل للرقم الهيدروجيني 8 نلاحظ أنخفاض 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 للأنتاج مع الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الأنزيم (18) ، وأن تغير الرقم الهيدروجيني يؤثر على الصفات الأيونية لجزيئة الأنزيم وعلى مكونات وسط التفاعل الأخرى (19).

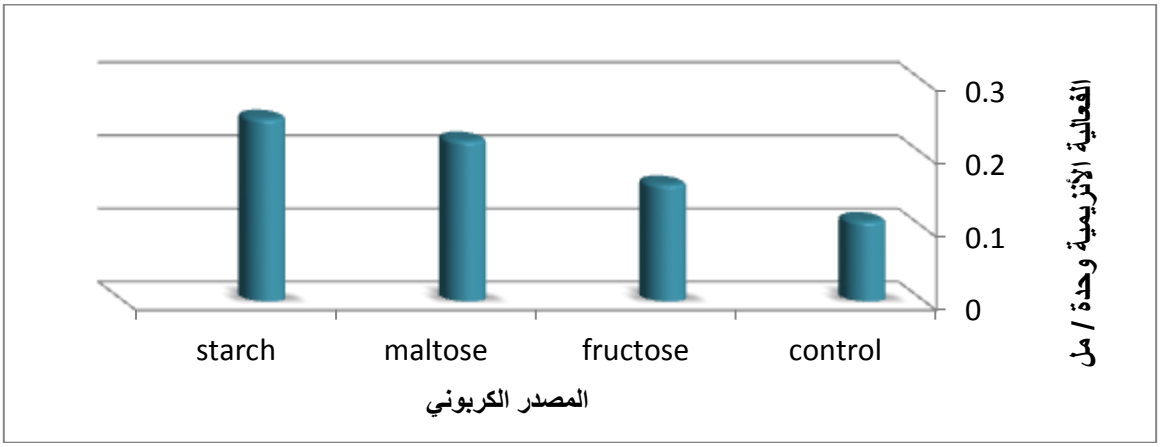
نتائجنا جاءت متقاربة مع ماجاء به (20) حيث بين أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لأنتاج الأنزيم كان 6.5 بينما كانت النتيجة مختلفة مع ماذكره (21) إذ كان الرقم الأمثل لأنتاجية الأنزيم 4.8 .



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

خامسا": المصدر الكربوني

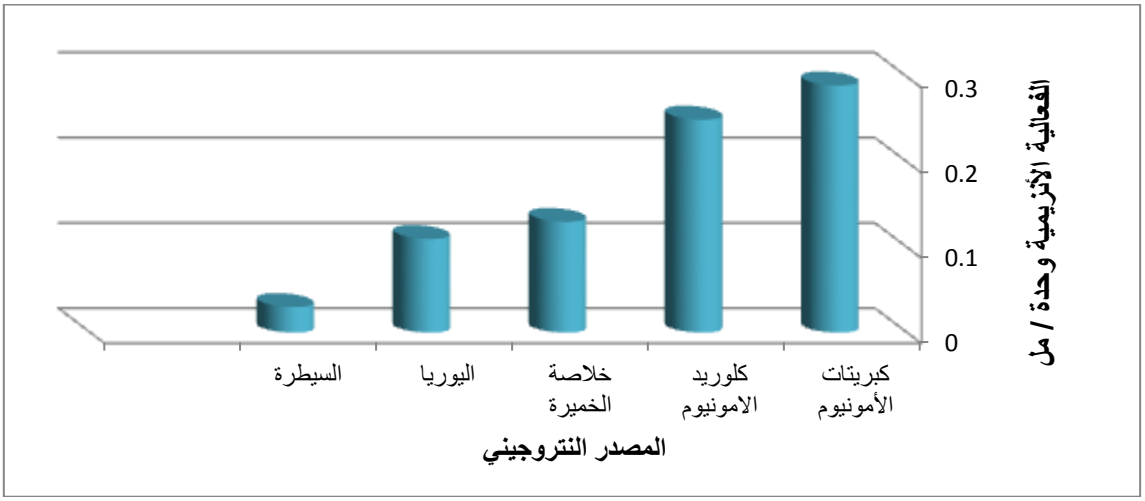
بينت النتائج أن النشا (starch) كان المصدر الكربوني الأمثل لأنتاج الأنزيم من عزلة الفطر *A.fumigatus* أذ بلغت الفعالية الأنزيمية 0.25 وحدة / مل تلاه المالتوز (maltose) وبفعالية قدرها 0.22 وحدة / مل ثم الفركتوز (fructose) بفعالية قدرها 0.16 وحدة / مل أما معاملة السيطرة (بدون مصدر كربوني) فقد بلغت الفعالية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



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

سادسا": المصدر النتروجيني

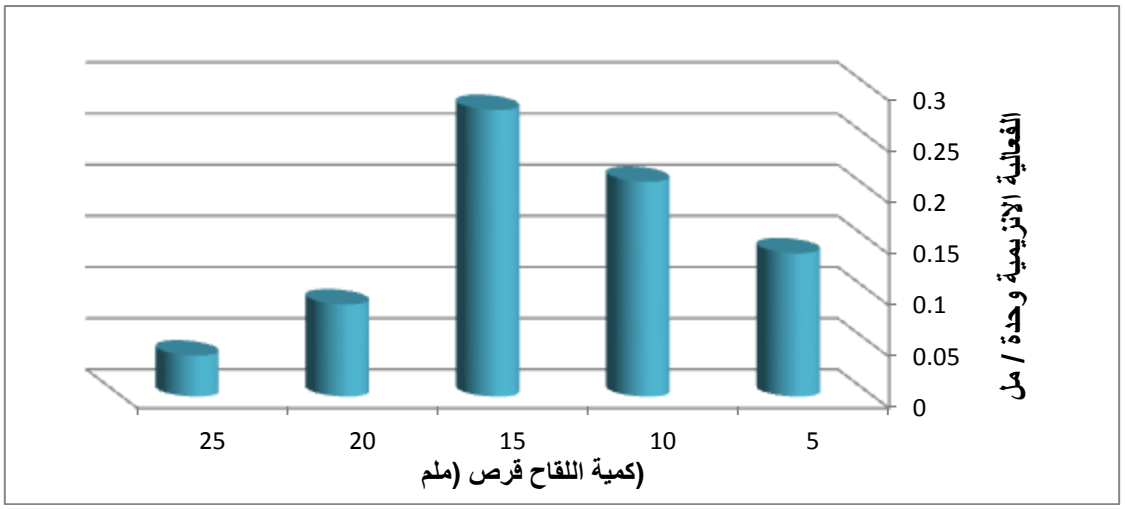
أوضحت النتائج أن كبريتات الأمونيوم كانت الأفضل كمصدر نتروجيني لأنتاج الأنزيم فقد بلغت الفعالية الأنزيمية 0.29 وحدة / مل تلاه كلوريد الأمونيوم بفعالية بلغت 0.25 وحدة / مل أنخفضت الفعالية الى (0.13 و 0.11) وحدة / مل لكل من خلاصة الخميرة واليوريا على التوالي بينما كانت الفعالية في أدنى مستوى لها في معاملة السيطرة (بدون مصدر نتروجيني) حيث بلغت0.03 الشكل(5)،هذه النتيجة جاءت متقاربة مع ماجاء به (15) أذ بين أن كبريتات الأمونيوم كانت الأفضل في أنتاج الأنزيم .



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

سابعا":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 10ملم و5 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 أزدادت بزيادة كمية اللقاح تصاعديا" حتى الوصول الى القرص بقطر 20 ملم أذ انخفضت الفعالية انخفاض مفاجئ وقد يعود السبب الى زيادة كمية اللقاح وأستنفاذ المادة الغذائية في وسط الأنتاج 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.) Shampan 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-galactosidese . 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).