الإنتاج الحيوي لإنزيمات التحلل السليلوزي (cellulase) من الفطريات باستخدام طريقة SSF على مخلفات الصناعات النسيجية

سعد مدلول مهدي
جامعة بابل–كلية العلوم – قسم الكيمياء

زينه هادي عبيد
جامعة بابل–كلية العلوم – قسم علوم الحياة

(NJC)

(Received on 20/5/2008) **(Accepted for publication 26/10/2008)**

الخلاصة

استخدم الفطر *T.harzianum* المعزول من المبيد الحيوي biocout والفطر *A.nadulans* المعزول من تربة مزرعة نبات الطماطة، ونميت تلك العزلتين بظروف (30C° 4 days, pH = 5.2) على وسط PDA لغرض إنتاج إنزيمات التحلل السليلوزي cellulase ، والمتضمنة على ثلاث إنزيمات تعمل بصورة تعاونية لغرض إكمال التحلل السليلوزي . تم إنتاج إنزيمات التحلل السليلوزي بطريقة تخمرات الحالة الصلبة (SSF) باستخدام مخلفات القطن الصناعية (كمصدر كاربوني) ، وبعد استخلاص الراشح وعزله عن الكتلة الحيوية تم قياس مستوى تلك الإنزيمات .

أعطت نتائج الإنزيم endoglucanase تفوقا ملحوظا للفطر *T.harzianum* في اليوم السابع للتخمير بفعالية إنزيمية مقدارها 1.54U/ml فيما كانت قيمة الإنزيم ذاته لفطر *A.nadulans* 1.48U/ml وبمقدار فعالية كلية (15.4) و(14.8) / غم مصدر كاربوني للفطرين على التوالي .

وتخطت قدرة الفطر *T.harzianum* في إنتاج إنزيم exoglucanase حيث أعطى فعالية إنزيمية بمقدار 0.416U/ml في اليوم السابع للتخمير ، بينما كانت قيمة الإنزيم ذاته للفطر *A.nadulans* (0.159U/ml) ، إما قيم الفعالية الكلية فقد كانت (4.16) و(1.59) /غم مصدر كاربوني للفطرين على التوالي .

بينما تعددت قيم الفعالية الإنزيمية لإنزيم β-glucosidase للفطر *A.nadulans* على قيم الفطر *T.harzianum* حيث كانت قيم الفعالية الإنزيمية للفطرين (6.45U/ml) و(5.61U/ml) على التوالي ، ومقدار الفعالية الكلية (64.5) و(56.1) /غم مصدر كاربوني على التوالي .

Abstract

Two cellulolyltic fungi (*T.harzianum*) isolated from the Pesticide (biocout) And *(A.nadulans*) was isolated from a soil of tomato farm, were grew on PDA (4 days ,pH = 5.2 and 30C°),for cellulase production. Cellulase produced using SSF technology by incubation of cotton textile residues (carbon source).

Three type of cellulase were produced :

- Endoglucanase give high activity on the 7th day of incubation for *T.harzianum* (1.54 U/ml) , while *A.nadulans* give at the same day (1.48U/ml) , and they give total activity (15.4 and 14.8/gm carbon source) respectively.

- Exoglucanase give an observed highest activity for *T.harzianum* in the 7th day of incubation (0.416U/ml), while *A.nadulans* have (0.159U/ml) in the same day. Having total activity (4.16 and 1.59/gm carbon source) respectively.
- While β-glucosidase on the other hand , *A.nadulans* give an enzymatic activity higher than *T.harzianum* (6.45 and 5.61) U/ml respectively , and the total activity values for the two fungus
are (64.5 and 56.1) / gm carbon source.

المقدمة

يعد السليلوز البوليمر الحيوي الأكثر وفرة في الطبيعة والمنتج من عمليات البناء الضوئي في النبات والمنتج بكمية ١٠١٠ طن سنويا [1] ، وان الكتلة الحيوية للنباتات عالية السليلوز من المصادر مهمة في إنتاج (الوقود، الاغذية الحيوانية ،إضافة إلى تصنيع العديد من المواد الكيميائية المهمة)[2] ،حيث إن تحويل كتلة السليلوز الحيوية الى سكريات بسيطة بطرق التخمير باستخدام إنزيمات التحلل السليلوزي المشتقة من الإحياء المجهرية القادرة على التحلل السليلوزي من المقترحات المهمة لإنتاج الوقود البديل (الايثانول) ،إضافة الى التخلص من التلوث البيئي السليلوزي [3] .

يعد إنزيم cellulase معقد إنزيمي متكامل يعمل على تحليل السليلوز إلى وحدات مبسطة من السكريات المختزلة ، حيث سميت وحسب لجنة الإنزيمات التابعة للاتحاد العالمي للكيمياء الحياتية إلى[4] :

1. Endo – 1, 4- β-D-glucanase (Endo – 1, 4- β-D-glucan 4-glucanohydrolase) or CMCase. (E.C.3.2.1.4)
2. Exo – 1,4- β-D-glucanase

ويتضمن على إنزيمين

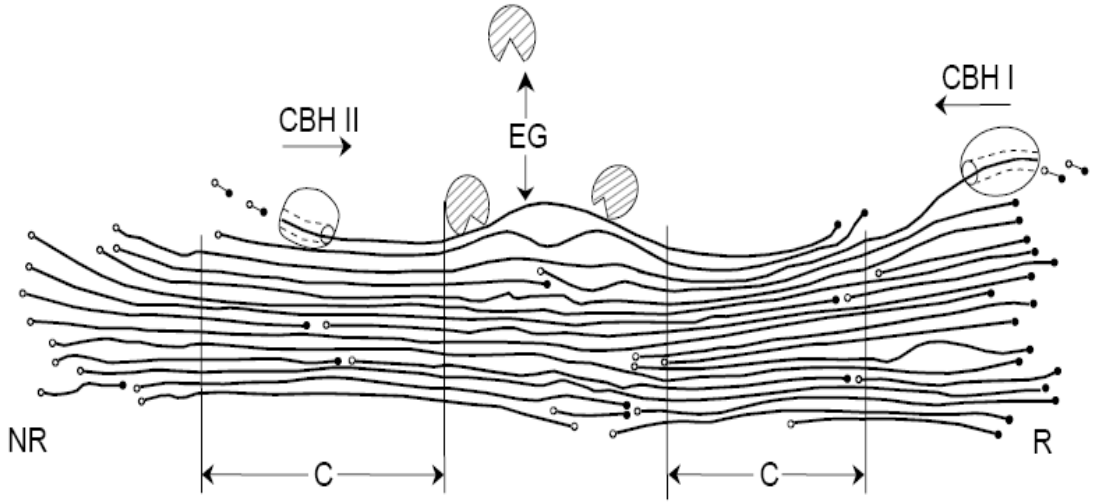
A- Exo-cellobiohydrolase (Exo-1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase)

والذي له التصنيف FPAase ويدعى بإنزيم الإنزيمي (E.C.3.2.1.91).

B- Exo- 1,4- β-D- glucosidase (Exo-1,4- β-D- glucose gluconohydrolase) (E.C.3.2.1.74)والذي له التصنيف الإنزيمي.

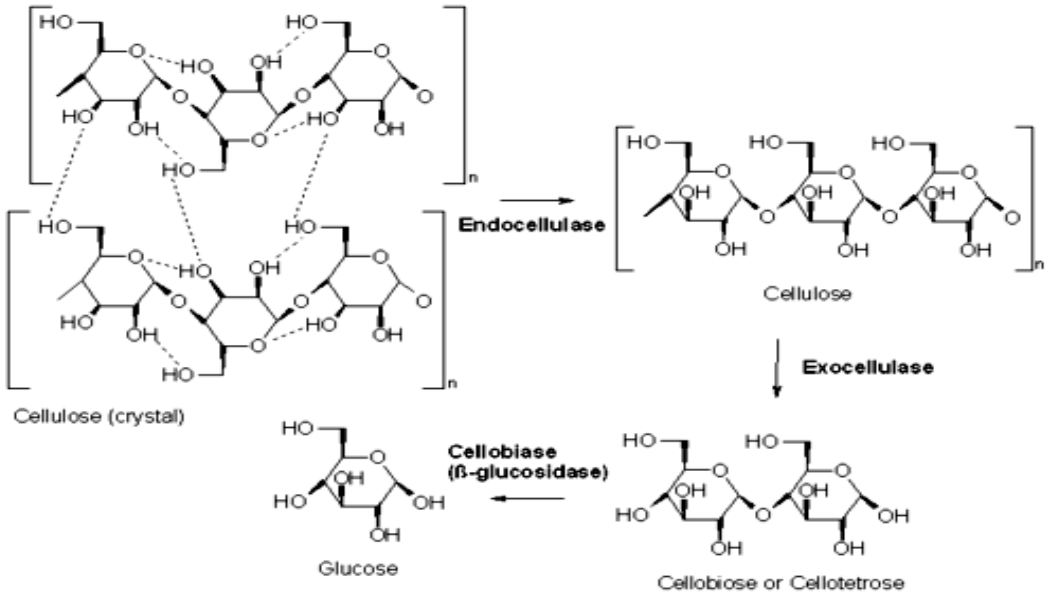
3. β –Glucosidase (β- D-glucoside glucohydrolase) ,(E.C.3.2.1.21) cellobiase والذي يدعى بإنزيم .

العديد من النظريات فسرت إلية التحلل السليلوزي خلال العمل التعاوني والتعاقبي (synergism) للإنزيمات لاكمال تحلل السليلوز إلى سكريات بسيطة مختزلة ، حيث أكدت أخر النظريات[5] على إلية عمل إنزيمات التحلل حيث يقوم endoglucanase لتبسيط السكر السليلوزي خلال فك الأواصر الداخلية للبوليمر منتجا سلاسل ذات نهايات جديدة ، بينما تقوم إنزيمات exoglucanase بالعمل على نهايات السلسلة محررة سكريات بسيطة ولا تكون سلاسل جديدة على سطح السليلوز ، حيث يقوم (CBH II) على تحرير سكر السلوبايوز الثنائي من النهايات غير المختزلة ، بينما يقوم إنزيم (CBH I) بتحرير ذات السكر من النهايات المختزلة ، إضافة لدور إنزيم exoglucanase للعمل في المناطق البلورية للسليلوز. بينما يأتي دور إنزيم – β Glucosidase والذي يحول السكر الثنائي (السلوبايوز) الى سكر الكلوكوز الأحادي. وان تلك الميكانيكية تعتمد على درجة تعاونية تلك الإنزيمات مع بعضها لتحلل السليلوز ، فهي تعتمد على نوع المصدر الكاربوني المستخدم [6] .



يشير الحرف C إلى المناطق البلورية للسليلوز، الدوائر الممتلئة (R) الى النهايات المختزلة ، الدوائر الفارغة(NR) إلى النهايات غير المختزل [6]

كما ويمكن توضيح إلية عمل الإنزيمات بالمخطط الأتي : –



يمكن إنتاج إنزيمات التحلل السليلوزي cellulase باستخدام طريقة تخمرات الحالة الصلبة (SSF) وذلك لسهولة العمل بها من خلال بساطة تركيب الأوساط وصغر حجومها وعدم تعقيد إلية عملها ، بالإضافة إلى أنها الطريقة المستمدة من التخمرات التي تحدث في الطبيعة ، والتي تحصل عند غياب الماء الحر. إضافة الى الكلفة الاقتصادية الواطئة لإنتاج عالي من المواد الايضية المطلوبة ، حيث إن إنتاج إنزيم cellulase[7] بطريقة SSF يكلف (0.2$/Kg) بينما إنتاجه بطريقة (LSF) يكلف (20$/Kg) ، وإن

الطريقة الثانية ذات محتو مائي عالي ومحدودة الإنتاج.

ووجد إن إنتاج إنزيم cellulase على بكتريا *B. icheniformis* بطريقةSSF أكثر بعشرين ضعف من إنتاجه بطريقة LSF [٨].

يعد إنتاج إنزيم التحلل السليلوزي cellulases على المصادر الكاربونية السليلوزية (المخلفات الزراعية والصناعية) من أهم الحلول للتخلص من التلوث السليلوزي والذي تتزايد قيمته سنويا نتيجة لتراكم تلك المخلفات ، حيث يمكن إنتاج الإنزيم من مخلفات مصانع الورق[٩] ومخلفات الصناعات النسيجية[١٠] والقطنية [١١] وبفعالية عالية ، إضافة الى إمكانية إنتاجه من المخلفات الزراعية [١٢،١٣] ،خلال تنمية تلك المخلفات في أوساط حيوية قادرة على إزالة أو تقليل ضرر ذلك المخلف بل والاستفادة منه حيويا لإنتاج مواد غذائية (كالأغذية الحيوانية) والتي هي نتاج الكتلة الحيوية للتخمرات وإنتاج ما تسمى بروتينات أحادية الخلية(SCP)[14]

تستخدم الإحياء المهجرية في إنتاج الإنزيمات والبروتينات إضافة إلى العديد من المواد الأولية والثانوية التي تدخل في الصناعات الغذائية والدوائية[15] ، إضافة لدورها التكاملي في الطبيعة في التخلص وإزالة المركبات قليلة الفائدة (والتي تشكل زيادتها تلوثا بيئيا) خلال تحويلها إلى مركبات ذات فائدة حيوية . حيث أمكن استخدام البكتريا والفطريات ويمكن إن تنتج من الخمائر والاعفان إضافة الى الاكتينومايسات.

يمكن للعديد من أنواع البكتريا أنتاج تلك الإنزيمات ، كبكتريا *B.Circulans* [16] والبكتريا اللاهوائية *C.Thermocelilum*[17] التي لها الثباتية الحرارية العالية إضافة الى فعاليتها في المدى ألحامضي (٥–٦)،وللإنتاج الواطئ للبكتريا ودورها المرضي العالي وصعوبة التعامل مع مخمراتها ، استعيض عنها بالفطريات لسهولة التعامل معها وإنتاجيتها العالية من المركبات المطلوبة(كالبروتينات والإنزيمات).

حيث أمكن للفطر *S.pulveruletum*[18] أنتاج إنزيم cellulase وعزل خمس أنواع من إنزيم endoglucanas(T_{3b},T_{3a},T_{2b},T_{2a},T_1) خلال تنمية الفطر على مسحوق السليلوز الصناعي . ويمكن لفطر *M.verrucaria* [19] أنتاج تلك الإنزيمات على ألياف القطن وبفعالية عالية .

إلا إن قدرة فطريات *Trichoderma* تعدت الكثير من الإحياء المهجرية في أنتاج إنزيمات التحلل السليلوزي ، حيث ازداد التوجه الصناعي الجديد نحوها لما فيها من سهوله في التعامل مع البوليمر السليلوزي واللكنوسليلوزي ، ومن أهم فطرياته *T.ressei* الذي يستخدم بكثير من معامل النسيج و القطن العالمية .وتستخدم فطريات *Aspergillus* في التحلل السليلوزي للكثير من المخلفات السليلوزية الصناعية والزراعية.

المواد وطرائق العمل

المصدر الكاربوني :

إن المصدر الكاربوني المعمول به في هذا البحث من المخلفات القطنية (السليلوزية) للشركة العامة للصناعات النسيجية في الحلة .

الفطر المستخدم في البحث :-

استخدم الفطران *T.harzianum*المعزول من المبيد الحيوي (biocout) و *A.nadulans* المعزول من مزرعة نباتية (مزرعة طماطة) ، وتم تنمية الفطريات لغرض الحصول على العالق السبوري على وسط PDA لمدة ٤ أيام وبدرجة حرارة ٣٠م° و pH=5.2 . وبعدها تم عمل العالق السبوري من إضافة ١٠ مل من وسط مندل المستخدم في الدراسة الحالية وإضافته إلى الإطباق الحاوية على الفطر ومن ثم التحريك في الهزاز لغرض مجانسة الطبق ، لغرض نقلها إلى مزارع الفطريات، وتحفظ عند ٤ م°.

وسط مندل المعدني ألزرعي: يعتبر من الأوساط المثالية لإنتاج إنزيمات التحلل السليلوزي (cellulases) حيث يتكون الوسط من إذابة المواد التالية في ١ لتر من الماء المقطر.

المادة	KH_2PO_4	$(NH_4)SO_4$	Urea	$MgSO_4.7H_2O$	$CaCl_2$	$FeSO_4.7H_2O$	$MnSO_4.H_2O$	$ZnSO_4.7H_2O$	CoCl2	peptone
gm/l	٢	١,٤	٠,٣	٠,٣	٠,٣	٠,٠٥	٠,٠١٦	٠,٠١٤	٠,٠٢	٠,٨

المزارع الفطرية :

تم العمل بطريقة تخمرات الحالة الصلبة (SSF) وضع ٢ غم من المصدر الكاربوني (المخلفات القطنية) ، في دورق مخروطي ذو حجم ٢٥٠ مل وأضيف له ٢٠ مل من وسط مندل الزرعي وعقمت باستخدام Autoclave بدرجة حرارة ١٢١م° وضغط ١ بار لمدة ١٠ دقائق وبعد التبريد تمت إضافة ٢% من العالق السبوري للفطرين *T.harzianum*و *A.nadulans* وأغلقت الدوارق بسدادات قطنية ونقلت في حاضنة ثابتة بدرجه حرارية ٣٠م°(وبواقع ثلاث مكررات لكل عينه) لغرض الابتداء بعملية التخمير بحيث يتم اخذ عينة بواقع دورق/ يوم طيلة الفترة التخميرية١٠ أيام.

استخلاص الإنزيمات من المزارع الفطرية :

تؤخذ الدوارق الحاوية على المزارع الفطرية ويضاف لها ٢٠ مل من الوسط الزرعي وينقل إلى الهزاز لغرض استخلاص الإنزيمات من الوسط الصلب ويتم تحريك الدوارق لمدة ٣٠ دقيقة ، بعدها يتم تصفية المستخلص من باقي العالق السبوري بواسطة الترشيح باستخدام ورق الترشيح (whatman No.1) ويليها طرد مركزي على 3000 دورة/دقيقة لمدة ١٠ دقائق.

تقدير الإنزيم Endoglucanase [20] :

يؤخذ ٤,٥ مل من محلول المادة المتفاعلة(Na-CMC) في أنبوبة اختبار (المحضرة بتركيز ٠,٥% في محلول المنظم سترات الصوديوم pH=5.2). ويضاف لها ٠,٥ مل من المستخلص الإنزيمي ، ويحضن في الحمام المائي لمدة ساعتين بدرجة حرارة ٤٥م°. ينقل بعدها ١مل من المحلول المحضون في أنبوبة أخرى ويضاف لها ٣ مل من محلول كاشف DNS المحضر بطريقة (Miller)[21] ، وتسخن الأنبوبة في حمام مائي مغلي لمدة ١٠ دقائق .برد المحلول إلى درجة حرارة الغرفة ثم يقاس الامتصاص عند الطول ألموجي 550nm باستخدام مطياف UV-Visible نوع spectronic .21D

تقدير الإنزيم Exoglucanase(FPase) [٢٠]:-

يؤخذ ٢ مل من المحلول سترات الصوديوم (pH=5.2) في أنبوبة اختبار، وقطعه من أوراق الترشيح Whatman No.1 بقياس (1X6 cm) مقطعة الى أجزاء صغيرة ، ويوضع ٢ مل من المستخلص الإنزيمي ويحكم إغلاق الغطاء ، وتحضن في حمام مائي بدرجة حرارة ٤٥م° لمدة ساعتين، ينقل بعدها ١مل من المحلول المحضون في أنبوبة أخرى ويضاف لها ٣ مل من محلول كاشف DNS المحضر بطريقة (Miller) ، وتسخن الأنبوبة في حمام مائي مغلي لمدة ١٠ دقائق وبعد التبريد يتم قياس امتصاصية المحلول عند الطول ألموجي 550nm .

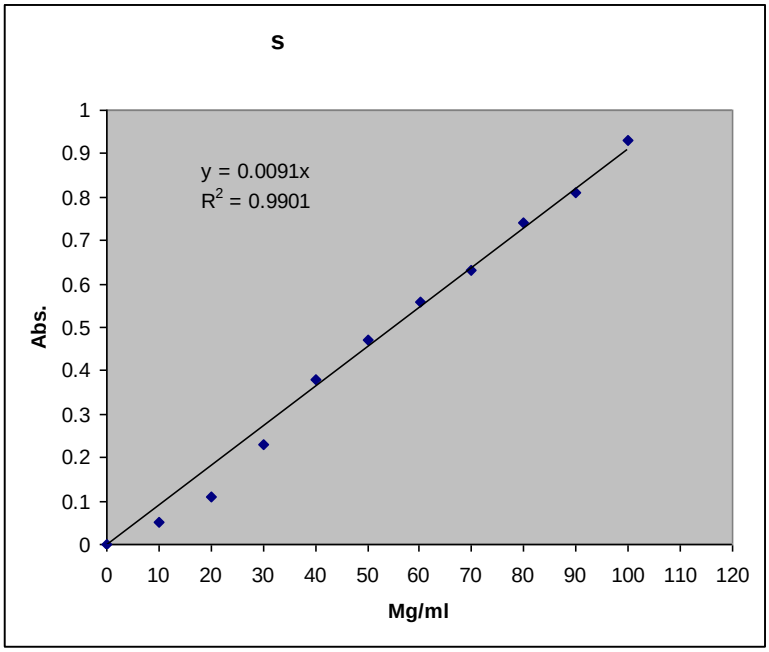
تقدير الإنزيم β- Glucosidase [٢٢] :-

يؤخذ ١ مل من المادة المتفاعلة (p- PNBG nitrophenyl- β-D-glucoside) بتركيز 10Mm (المحضرة من إذابة ٠,٣٠١٢٦ غم /١٠٠مل محلول سترات الصوديوم المنظم (pH=5.2) في أنبوبة اختبار، ويضاف إليه ١ مل

من محلول المستخلص الإنزيمي ، وتحضن في الحمام المائي لمدة ٣٠دقيقة بدرجة حرارة ٤٥م° وبعد ذلك ترفع الأنبوبة المحضونة،أضيف ٢ مل من كاربونات الصوديوم (1M) لغرض إيقاف التفاعل ويتم قراءة امتصاصية المحلول عند الطول الموجي 440nm .

المنحني القياسي لسكر الكلوكوز (glucose standard curve)

حضر المحلول السكري (100mg/100ml) لسكر الكلوكوز النقي .ومن ثم تم تحضير المحاليل التالية (10.20.30.40.50.60.70.80.90.100.)µg/ml بطريقة التخفيف ألمذيبي باستخدام الماء المقطر ، لغرض الحصول على المنحني القياسي للكلوكوز . اخذ ١مل من كل تركيز من التراكيز المحضرة أعلاه واضيف لها ٣مل من كاشف DNS . سخنت المحاليل لدرجة الغليان لمدة عشرة دقائق ثم بردت إلى درجة حرارة الغرفة . سجلت امتصاصية المحاليل كل على انفراد عند الطول الموجي 550nm وكما في الشكل ١.

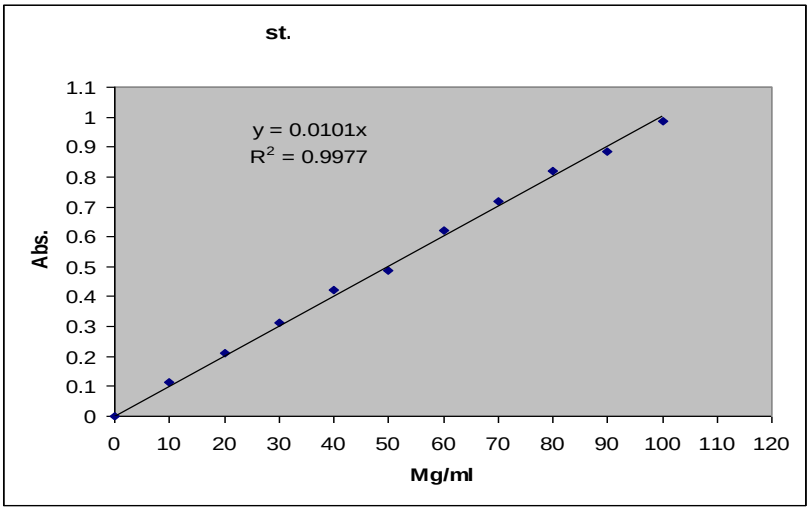


شكل (١) المنحني القياسي لسكر الكلوكوز

المنحني القياسي لمادة p- nitro phenol

حضر محلول قياسي من مادة p-nitro phenol بتركيز 5mM باستخدام تركيز 50mM من المحلول المنظم سترات الصوديوم pH 5.2 ومن ثم حضرت المحاليل التالية بطريقة التخفيف ألمذيبي (10, 20,30,40,50, 60, 70, 80, 90,100) µg/ml

واخذ ٢ مل من المحاليل المحضرة أعلاه وأضيف إليها ٢ مل من $1M\ Na_2CO_3$ وقيست الامتصاصية عند الطول الموجي 440nm ، باستخدام المحلول المرجع المتكون من ٢مل محلول منظم و ٢مل من كاربونات الصوديوم .

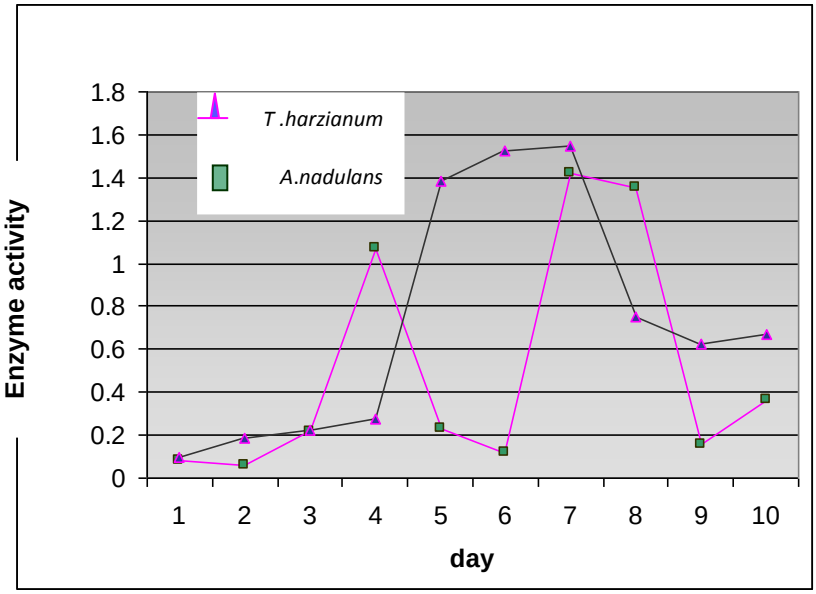


شكل (٢) المنحني القياسي لمادة ρ-nitro phenol

النتائج والمناقشة

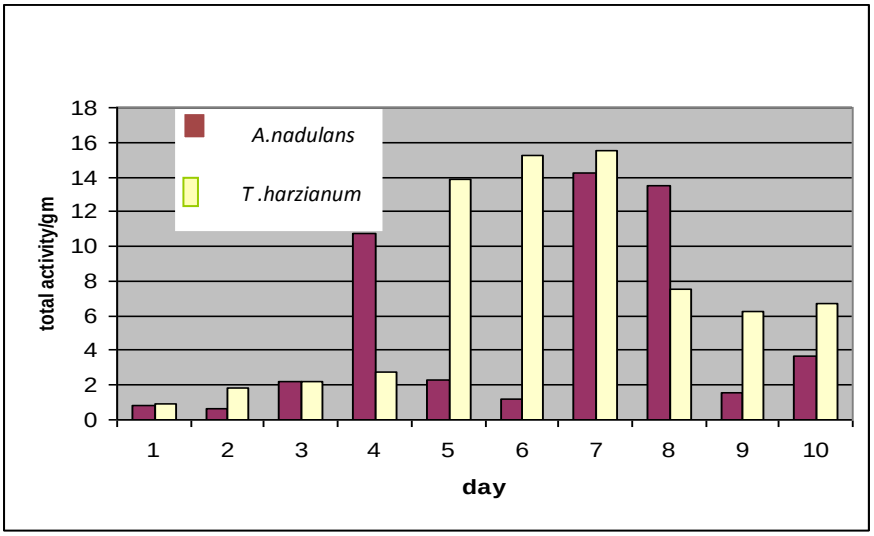
إنزيم endoglucanase (CMCase) :

بينت النتائج أدناه في الشكل (٣) امتلاك الفطر *T.harzianum* فعالية إنزيمية عالية لإنزيم endoglucanase(CMCase) في اليوم السابع من التخمير ، حيث أعطى فعالية 1.54U/ml في حين أعطى الفطر *A.nadulans* أعلى مقدار للفعالية الإنزيمية في يوم التخمير السابع 1.48U/ml .



شكل (٣) الفعالية الإنزيمية لإنزيم endoglucanase

فيما كانت نتائج قياس الفعالية الكلية لإنزيم endoglucanase أعلاها في اليوم السابع لتخمير الفطر *T.harzianum* بمقدار 15.4 /غم مصدر كاربوني وللفطر *A.nadulans* ١٤,٨ /غم مصدر كاربوني في يوم التخمير السابع.كما موضح في الشكل(٤).

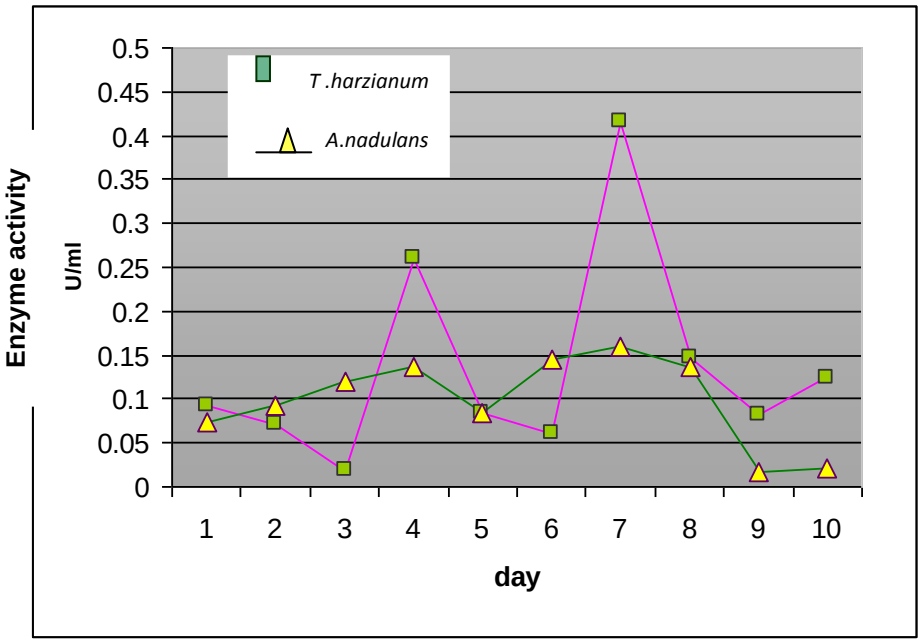


شكل (٤) الفعالية الكلية لإنزيم endoglucanase/غم مصدر كاربوني

امتازت فطريات *Trichoderma* في إنتاجها الإنزيمي العالي لإنزيم endoglucanase احد أهم إنزيمات المعقد السليلوزي cellulase والذي يقوم بدور الانقسام الأولي للسليلوز وتبسيط الجزيئة بصورة أعلى من نظيراتها *Aspergillus* ، حيث إشارة العديد من البحوث إلى قدرة فطريات *trichoderma*[23.24.25] العالية في انتاج إنزيمات cellulase من المخلفات السليلوزية الصناعية والزراعية.حيث أعطى الفطر *T.ressei*فعالية إنزيمية 4.8U/ml عند استخدام الكلوكوز كوسط غذائي ساند[٢٦] ، ويعطي الفطر *T.harzianum* فعالية إنزيمية بمقدار 3U/ml عند تخمير السليلوز بتركيز 10gm/l[27] .بينما أعطى الفطر *A.niger* فعالية إنزيمية 0.824U/ml عند استخدام اليوريا كمضاف نتروجيني غذائي[28] .

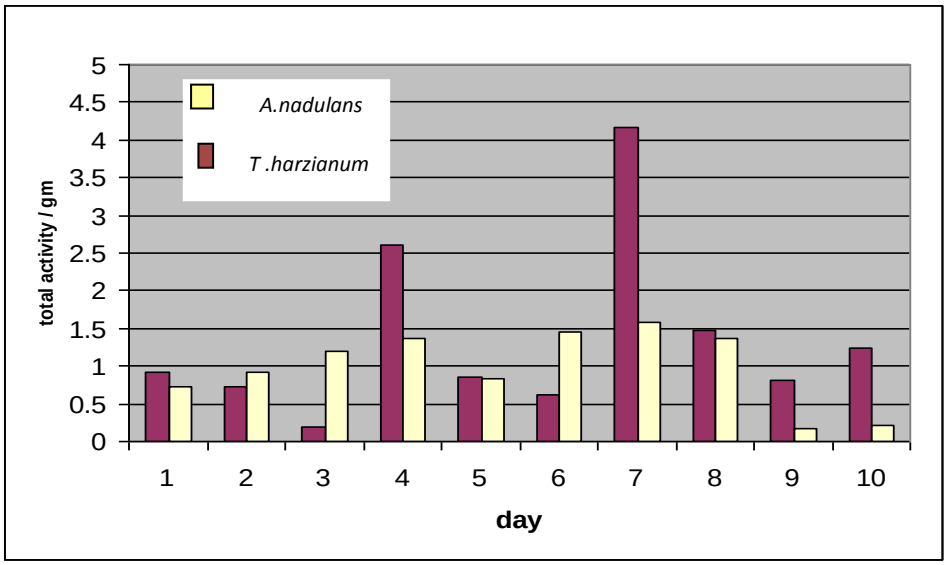
إنزيم exoglucanase(FPAse) :

امتاز الفطر *T.harzianum*في قدرته على إنتاج عالي من إنزيم exo-glucanase خلال إعطائه فعالية إنزيمية مقدارها 0.416U/ml في اليوم السابع للتخمير، بينما أعطى الفطر *A.nadulans* فعالية إنزيمية مقدارها 0.159U/ml في ذات يوم التخمير.



شكل (٥) الفعالية الإنزيمية لإنزيم exo-glucanase

فيما كانت قيم الفعالية الكلية لكل من الفطرين *T.harzianum* و *A.nadulans* (٤,١٦ و ١,٥٩) لكل غرام من المصدر الكاربوني وكما موضح في الشكل (٦).

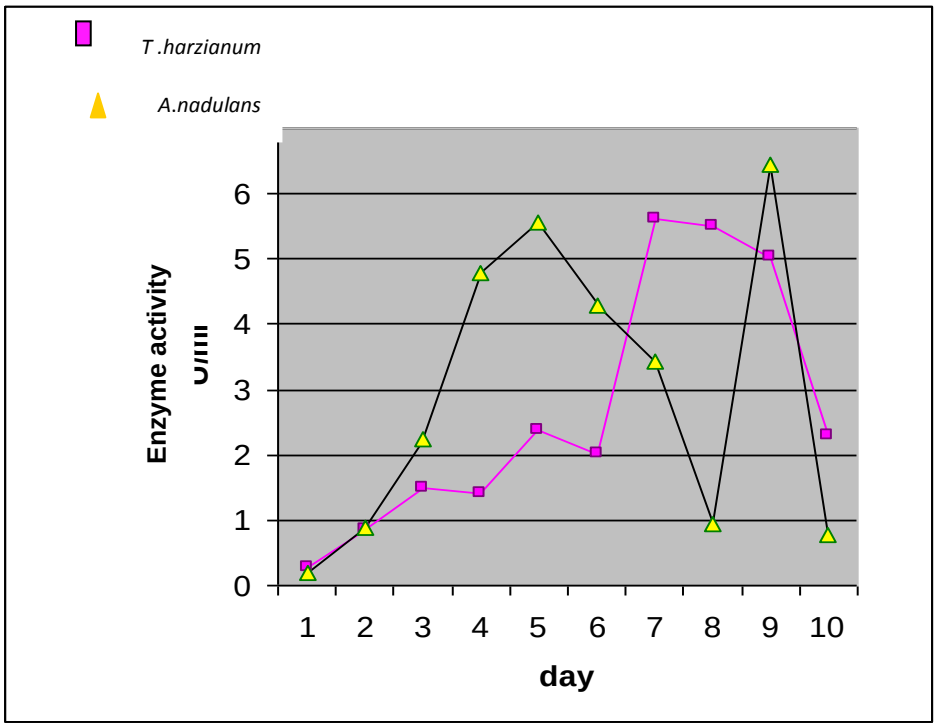


شكل (٦) الفعالية الكلية الإنزيمية لإنزيم exo-glucanase /غم مصدر كاربوني

اعتمدت العديد من البحوث على قيم هذا الإنزيم في أنتاج cellulase[29,30] ،تعد (إنزيمات) Exoglcanases من الإنزيمات المهمة في تحلل السليلوز من خلال إزالته للوحدات السكرية الكلوكوزية من النهايات غير المختزلة، حيث أعطى الفطران *T.ressei* [31] و *T.harzianum*[27] فعالية إنزيمية 0.40U/ml ، بينما أعطى الفطران (*A.niger* و *A.fumigatus* فعالية إنزيمية بمقدار 0.288U/ml (0.340U/ml على التوالي [٣٢] . ويمكن للبكتريا إنتاج هذا الإنزيم حيث أعطت بكتريا *Bacillus.spp* [30] فعالية خصوصية بمقدار (1.08IU/mg protein).

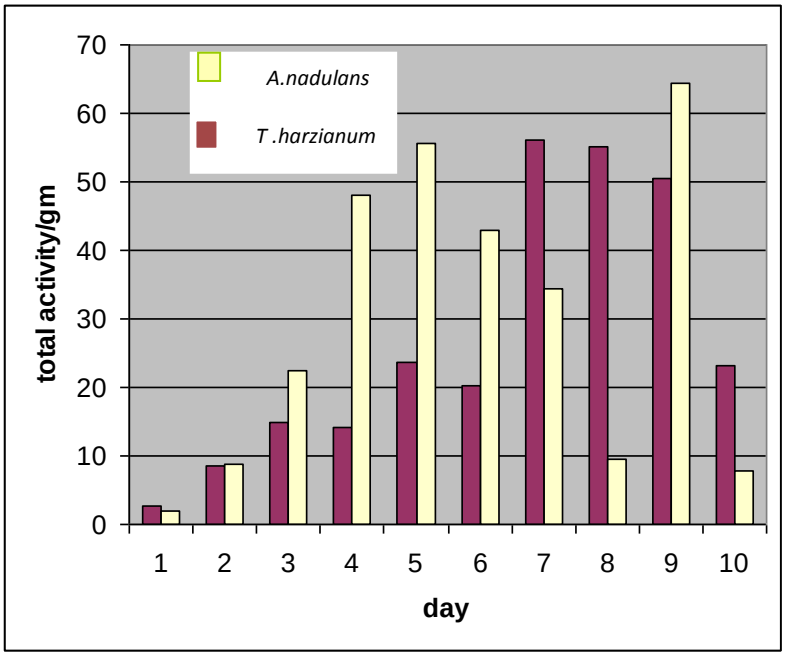
إنزيم β-glucosidase :

من خلال النتائج الموضحة في الشكل (٥) لوحظ تغلب الفطر *A.nadulans* في قدرته على إنتاج عالي من إنزيم β-glucosidase وبفعالية إنزيمية6.45U/ml في اليوم التاسع للتخمير ،بينما أعطى الفطر الأخر *T.harzianum* أعلى فعالية إنزيمية له في اليوم السابع للتخمير بمقدار 5.61U/ml ،يعمل هذا الإنزيم على تحلل (السلوبايوز والسلوترايوز إلى سكر الكلوكوز الأحادي).



شكل (٧) مقدار الفعالية الإنزيمية لإنزيم β-glucosidase

ووجد إن أعلى مقدار للفعالية الإنزيمية الكلية كانت بمقدار 64.5 /غم مصدر كاربوني للفطر *A.nadulans* في اليوم التاسع للتخمير، بينما امتلك الفطر *T.harzianum* في اليوم السابع للتخمير فعالية كلية بمقدار 56.1 /غم مصدر كاربوني وكما هو في الشكل. وهذا ما يؤكد إن عمل هذا الإنزيم يأتي بعد تحلل السليلوز من قبل إنزيمات (endo-exo glucanase) .



شكل (٨) الفعالية الكلية لإنزيم β-glucosidase /غم مصدر كاربوني

امتازت فطريات *Aspergillus* في الإنتاج الحيوي العالي لهذا الإنزيم كفطريات *A.niger* [٣٣] و *A.nadulans*[34] و *A. oryzae*[35] و *A. Terreus*[36]) أعلى من نظيراتها فطريات *trichoderma* [٣٧] وذلك لقدرتها العالية على تحليل السكريات قليلة التعدد الناتجة من تحلل السليلوز إلى سكريات أحادية مختزلة .

كما وأعطت نتائج الإنزيم ذاته لفطر *A.niveus* فعالية حيوية عالية بلغت أقصاها عند اليوم السادس للتخمير عند استخدام وسط مندل ألزرعي و اليوم الثامن عند استخدام وسط زابك ألزرعي [٣٨] ،فيما كان اليوم السابع للتخمير هو الأمثل عند استخدام الفطر *A.niger* ووجود وسط sanders الزرعي [٣٩] وبفعالية عالية . بينما كانت نتيجة الفطر *A.niger* [28] 1.32U/ml ويمكن إنتاجه باستخدام المزارع المختلطة للفطرين (*A.niger* &T.ressei) وبفعالية إنزيمية بلغت [40] 3.07U/ml في اليوم السابع للتخمير بطريقة LSF .

من هنا نرى بان الظروف الانتاجية المثلى للإنزيمات تعتمد على نوع الإحياء المهجرية المستخدمة والتقنية المعمول بها في البحث إضافة إلى نوع الوسط المستخدم ونسبة السليلوز في المصدر الكاربوني ، حيث تتغاير نسبة إنتاج الإنزيمات أو المواد الايضية المطلوبة حسب الطرق المتبعة لإنتاجها حيويا ، ومن الجدير بالذكر بان استخدام مزارع مختلطة mixed culture [٤٠] من الفطريات يساهم على إنتاجية عالية من المواد الايضية المطلوبة .

References :

1. S.chlesinger (***Biogeo chemistry***: an analysis of global change). Academic, San Diego. 1991. p. 443.
2. M.Bhat. ***Biotech. Adv***. 2000,**18**: 355.
3. B.Dale. ***Biotechnol. Prog***. 1999. **15**: 775
٤-R,Mulling, ***Enz. Microbiol. technol***,1985,**7**,586.
٥- B. Nidetzky, Hayn, M. Macarron, R. and W Steiner.***Biotechnol. Lett***. 1993,**15**, 71.
6- T, Teeri, ***TIBTEC*** 1997,**15**, 160

7-R.Tgerdy . ***J Sci. Ind. Res***. 1996, **55**,313
8- A. Archana, and T. Satyanarayana, ***Enzyme Microb. Technol***., 1997, **21**, 12
٩.H.Klozlawaski,A.Trozynska and T. Sokoski .***cielat .Przem.spoz***, 1976, **30**,311
١٠- T. Tzanov, J. Andreaus, G. Guebitz, and A. Paulo, ***Electronic J. Biotech***. 2003, **6**,3.
١١- K. Kleman, M. Aho, T. Teeri, and T. Kirk. ***Appl & Environ Microbiol***, 1996, **62** (8) 2883.
١٢- K.Singh, A K. Puniya and K.Singh, ***J.Sci & Indst. Res***, 1996,**55**(5),472.
١٣-A.Noon,***Aric.wastes***, 1986,**17**(3), 229.
١٤- دلالي ، باسل كامل " موضوعات مختارة في التكنولوجيا الحيوية (١٩٩٣).
١٥ – A. Pandey, , ***in Solid State Fermentation*** , Wiley Eastern Publishers, New Delhi, 1994. 3.
16- O.Thikhomirov,V.Stobve,andA.Klysov ,***Prikl.biokhem.microbiol***.1989.**25**(1),48.
17-G.Halliwell , and N.Halliwell , ***Biochem.Biopys.Acta***,1989.**922**(2),22.
18- K.Almin, K. Eriksson, and N. Pettersson, ***Eur.J.Biochem***, 1975, **51**, 207.
19- L.Trived, and K.Rao . ***Ind. J. Exp. Biol***.1980.**18** (3),240
20-M Mandels, R.Andreotii and C.Roche ***Biotechnol. Bioeng. Symp***. (1976) **6**, 21
21-G.Miller. ***Anal.chem***, 1959,**31,**426.
22-C.Kubick .***Eur.J.Appl .Microbiol. Biotechnol***. 198١,**13**,226.
23-Miettinen-Oinonen, Arja**..** ***VTT Publications Espoo*** 2004,550. 96
24- M. Boat, and S. Bhat. ***Biotechnol. Adv***.1997. **15**,583.620.
25- L. Berghem, and L.Pettersson, , ***Eur. J. Biochem*** 1973.**37**, 21.
26 – M.mandals and R.Anderotti, ***proc.biochem***,1978,7.
27- S .Rousses, M .Raimbault. ***Ann. Microbiol.***1982. **133B**: 465
28- G .Narasimha, A .Sridevi, , M .Subhosh and B. Rajasekhar , ***African Journal of Biotechnology*** , 2006**,5** (5), 472
29- T. OJUMU, B. SOLOMON, E. BETIKU, K. Stephen , and B. AMIGUN, ***African Journal of Biotechnology*** , 2003, **2** (6), 150
30 - X.Júlio, F.Plinhoand and A. Marco. ***Brazilian Journal of Microbiology*** 2002,**33**,213
31-M. Zolnorian, M. Hamidi, and R. Yazdanparast, Iran university (***abstract***).
32- . C. Immanuel, M. Akila, P. Iyappa, P. Esakkiraj, and A. Palavesam. ***The Internet Journal of Microbiology***. 2007. **3** , 1.
33 - H. Yeoh, , T.Tan, S.Chua, and G. Lim. ***J. Appl. Microbiol.Biotechnol***. 1988. **4**:425
34- P. Bagga, , D.Sandhu, and S.Sharma***.J. Appl. Bacteriol***. 1990. **68**:61
35- T. Buachidze, I. Tavobilov, N. Rodionova, and G. Kvesitadze. ***Appl. Biochem. Microbiol***. 1987. **23**:187
36- C.Riou, J. Salmon, M.Vallier, Z. Gunata, and P. Barre. ***Appl. Environ. Microbiol***. 1998.**64**,3607
37 - T. JUHÁSZ , ***Food Technol. Biotechnol***.2003,**41** (1) ,49
٣٨- **الحسن**،أميره محمد علي، " دراسة بعض خواص الإنزيم **β-glucosidase** المنتجة من الفطر *A.niveus* رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بابل **(١٩٩٦)**.
٣٩- **الحساني** ، سعد مدلول ، " دراسة في تشخيص الظروف المثلى لإنتاج الإنزيمات المحللة للسليلوز من الفطريات وأثرها على استهلاك السليلوز وإنتاج البروتين.رسالة ماجستير . كلية العلوم ، جامعة بابل **(٢٠٠٢)**.
٤0- T. Juhasz , K.kozma, Z. Szengyel and K Réczey,***Food Technol. Biotechnol***. 2003,**41** (1) 40.