مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (4) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (4) 2016

قدرة بعض العزلات الفطرية المحلية على إنتاج أنزيم الليباز وتحديد الظروف المثلى لإنتاجه من *Penicilliumdevirsum*

الدكتورة ســـناء ســـارة*

(تاريخ الإيداع 23 / 2 / 2016. قبل للنشر في 28 / 8 / 2016)

□ ملخّص □

تمّ الكشف عن قابلية العزلات الفطري ـة المحليـة الآتية :*Aspergillus niger*، *Alternariaalternata*، *Fusariumoxysporum*، *Fusarium solani* و *Penicilliumdevirsum*،على إنتاج أنزيم الليباز باستخدام الوسط الصلب المحتوي على مادة *Triputyrin*. تميّز الفطر *P.devirsum* بنشاطه الأنزيمي على بقية الفطور، بينما فشل الفطر *A.alternata* في إنتاج الليباز . ثمّ أجريّ اختبار كمي باستخدام الوسط السائل لتحديد الظروف المثلى (المصدر الكربوني وتركيزه، فترة الحضن، درجة الحرارة، *pH* الوسط، المصدر النيتروجيني) لأفضل نمو للفطر *P. devirsum* ولأفضل إنتاج لأنزيم الليباز. فتبين أنّ زيت الذرة هو الأفضل كمصدر كربوني لنمو الفطر بعد *5* أيام من الحضن، إذ بلغت الكتلة الحيوية *(15.99 g/L)*وبلغت فعالية الليباز *(67.43%)*. وقد حقق زيت الذرة بتركيز *2%* أفضل كتلة حيوية *(17.83g/L)*وأفضل فعالية لأنزيم الليباز *(72.78%)*. وحققت درجة الحرارة *34°C* أعلى كتلة حيوية *(18.94 g/L)* وأفضل فعالية للأنزيم*(76.16%)*، وكانت *pH=7.0*هي المثلى لنمو الفطر بكتلة حيوية *(21.87 g/L)*وبفعالية أنزيمية *(82.93%)*. في حين أعطى المصدر النتروجيني ببتون أكبر قيمة للكتلة الحيوية *(27.08 g/L)* وأقصى فعالية للأنزيم *(88.12%)*، وذلك في الشروط المثلى التي تمّ التوصّل إليها في هذه الدراسة.

الكلمات المفتاحية: ليباز،فطور، *P.devirsum*

*مدّرسة – قسم علم الحياة الحيوانية – كلية العلوم – جامعة تشـرين – اللاذقية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (38) العدد (4) 2016
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (38) No. (4) 2016

The ability of some local fungal isolates in enzyme lipase production and determine optimal growth conditions for its production By Penisillium devirsum

Dr. Sanaa Sara*

(Received 23 / 2 / 2016. Accepted 28 / 8 /2016)

□ ABSTRACT □

It wasdetected for the ability of a local fungus A.niger, A.alternata, F.oxysporum, F.solaniandP.devirsum to produce the enzyme lipase in solidmedium including Triputyrin. The enzymic activity of P.devirsum fungus is distinction from other fungus, while the fungus A.alternata failed to produce the lipase. Then they tested quantitatively using a liquid center to determine the best conditions for best growth to fungus P.devirsum and for best produce to enzyme lipase. It indicates that corn oil is the best carbonic source for growth of fungus after 5 days of incubation, as biomass reached(15.99g/L) and effective of lipase (67.43%).And it found that the concentration of 2% of the corn oil has achieved best biomass
(17.83g/L) and best production of enzyme lipase effectively(72.78%). Temperature 34 c° achieved the highest biomass (18.94g/L) and best production of enzyme lipase (76.16%), and pH =7 was the best for the growth of fungus in biomass reached (21.87g/L) and production of lipase effectively (82.93%). While the nitrogenic source gave peptone biggest value to biomass (27.08 g/L) and highest production for enzyme (88.12%) in optimal conditions reached.

Key words: Lipase, Fungi, P.devirsum

* **Assistant Professor, Department of Zoology, Faculty of Science Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

تعرّف الأنزيمات *Enzymes*بأنها عبارة عن بروتينات تصنعها الخلايا الحية لتقوم بتسريع التفاعلات الكيميائية في ظروف الخلية دون أن تستهلك. ولقد ازدادت الأهمية الصناعية للأنزيمات بشكل واضح خلال الفترة الأخيرة، فحظيّ أنزيم الليباز*Lipase* بأهمية كبيرة كونه أظهر خصائص مهمة في التطبيقات الصناعية. يستخدم الليباز، في الوقت الحاضر، في الصناعات الدوائية لتقدير الغليسيريدات الثلاثية *Triglycerides*في الدم، وفي علاج بعض الأمراض الهضمية *[1]*. كما يستخدم في الصناعات الغذائية، كصناعة الأجبان وتحضير بدائل زبدة الكاكاو، وصناعة المعجنات وتحسين النكهة*[2]*. إضافة إلى استخدامه في صناعة المنظفات لإزالة البقع الدهنية وفي صناعة مستحضرات التجميل، وصناعة الورق لإزالة الشحوم الثلاثية والشموع الموجودة في عجينة الورق الخام*[3]*. يعمل الليباز، ذو التسمية المنهجية *Triacyl glycerol hydrolases(EC.3.1.1.3)*، على تحليل الروابط الاستيرية للغليسيريدات الثلاثية بوجود الماء (حلمهة) إلى أحماض دهنية وغليسيرول*Glycerol Fat acid [4]*. يعد الليباز أنزيم خارجي، ثابت حرارياً، ويوجد في جميع أنسجة الحيوانات وخاصةً في القناة الهضمية، وفي بذور وثمار النباتات، أما الأحياء الدقيقة فتفرزه إلى وسط النمو *[5]*. إنّ الحصول على الأنزيمات من المصادر الحيوانية والنباتية يواجه عدد من المشاكل منها قلة المردود، بحيث لا تسد حاجة السوق المحلية *[6]*، وصعوبة استخلاصها وتنقيتها لأنها أنزيمات داخل خلوية، لذا ركّزت الدراسات العلمية مؤخراً على استخدام الأحياء الدقيقة، كمصدر تجاري لإنتاج الأنزيمات، وكذلك البروتين الخام، نظراً لسرعة نموها ولإنتاجها الوفير ولسهولة عزل المنتج من أوساط النمو *[7]*، إذ تستطيع الجراثيم وبعض الخمائر والفطور إنتاج العديد من الأنزيمات بغزارة،خلال ملامستها لمادة التفاعل *Substrate[8]*، والليباز أحد هذه الأنزيمات التي تنتجها الفطور*[9]*،غير أنّ اختلاف ظروف الوسط الزرعي، وعوامل النمو، من عزلة فطرية إلى أخرى، ينعكس على كفاءة الفطور في إنتاجها لأنزيم الليباز*[10]*. كما أنّ التباينات الوراثية بين الفطور تؤدي إلى اختلاف في قدرتها على إنتاج الأنزيم، بالإضافة إلى أنّ التركيب الوراثي،للنوع الفطري الواحد، يتأثر بالتغيرات البيئية، التي تنعكس على صفاته المظهرية *Phonetype[11]*. لذا توجهت الأنظار لتنمية الفطور، ودراسة قدرتها على إنتاج أنزيم الليباز، بشروط نمو مختلفة،كفترة الحضن، ودرجة الحرارة، ودرجة الـ *pH*..... .علماً أنّ لكل أنزيم درجة حرارة معينة،ودرجة *pH* معينة،يعمل عندها بالشكل الأمثل، وإنّدرجة الـ *pH* تؤثر على نمو الكائنات الحية الدقيقة، وعلى إنتاج المواد الاستقلابية المختلفة*[12]*.كماإنّ النتروجين من العناصر الأساسية لبناء الخلايا حيث يدخل في بناء الأحماض النووية والبروتينات. وتشير الدراسات إلى أنّ المصادر النتروجينية تستغل، بشكل أفضل من غيرها، من قبل نوع معيّن من الأحياء الدقيقة.

أهمية البحث وأهدافه:

تنبع أهمية البحث في أنه يسلط الضوء على دور الفطور في إنتاج أنزيم الليباز، نظراً للأهمية الاقتصادية لهذا الأنزيم، ولندرة الدراسات، التي تتعلق بإنتاجه من الفطور، في سوريا.أما الهدف فهو تحديد أفضل فطر محلي لإنتاج أنزيم الليباز ،فضلاً عن تحديد الظروف المثلى(مصدر كربوني وتركيزه، فترة الحضن، درجة الحرارة، درجة الحموضة، والمصدر النيتروجيني)،للحصول على أفضل كتلة حيوية لفطر *P.devirsum*، وأفضل فعالية لأنزيم الليبازالمنتج من هذا الفطر، آملين أن يكون هذا البحث خطوة على طريق إنتاج الليبازمن الفطور محلياً.

المواد وطرائق البحث*Materials and methodes of search*:

1) **الحصول على العزلات الفطرية:** تمّ الحصول على العزلات الفطريةالآتية: *Aspergillus niger*،*Alternariaalternata*،*Fusariumoxysporum*، *Fusarium solani* و *Penisilliumdevirsum*من مخبر البحث العلمي في كلية العلوم – قسم النبات/جامعة تشرين. عزلت جميع العينات الفطرية من المحيط الجذري لنبات القمح *Triticumaestivum L.* على عمق *5 -10 cm*. تمت مقارنة صفات الفطريات مع المراجع التصنيفية *(15,14,13)*. حفظتعينة نقية لكل منها ضمن أنبوب اختبار بشكل مائلفي البراد عند درجة حرارة *4°C*، وتمّ تجديد العينات كل أسبوعين للمحافظة على حيوية الفطور وفعاليتها.

2) **الكشف عن إفراز أنزيم الليباز باستخدام طريقة تحلل ثلاثي البيوترين *Tributyrin*:**

أجري اختبار نوعي باستخدام الوسط الصلب الخاص بالكشف عن قابلية الفطور لإنتاج أنزيم الليباز، حيث اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل*Cruick shank[16]* باستخدام وسط تحلل ثلاثي البيوترين، والذي يتكون من المواد الآتية (غ/ لترمن الماءالمقطر): *3* غ مستخلص الخميرة *Yeast extract*، *5* غ ببتون *pepton*، *20* غ آغار *Agar* و *10* مل *Tri butyrin*.حضرّ الوسـط بإذابة جميع المواد، باستثناء ثلاثي البيوترين، في كمية من الماء المقطر باستخدام خلاط مغناطيسي ثمّ أكمل الحجم إلى *1* لتر، وضبط *pH* الوسط عند الدرجة *pH=5.8*،وعقّم الوسط بجهاز*Autoclave* عند الدرجة*121°C*وضغط*1* بارلمدة *20* دقيقة، أما ثلاثي البيوترين فقد عقّم على انفراد في قنينة زجاجية. برّد وسط الكشف وصُبّ في أطباق بتري معقمة، ثمّ وزعت مادة ثلاثي البيوترين المعقمة بالتساوي على الأطباق وتركت حتى التصلب، وذلك بواقع ثلاث مكررات لكل عينة.ثم أضيف لكل طبق قرص من المستعمرة الفطرية المدروسة بقطر*5mm*وبعمر أسبوع، وحضنت الأطباق عند الدرجة *28±1°C* لمدة *5* أيام، بعدها سحبت الأطباق من الحاضنة. وتمّ الكشف عن قابلية الفطر لإنتاج أنزيم الليباز بدلالة قطر الهالة الرائقة المتكونة حول المستعمرة الفطرية النامية،الأمر الذي يشير إلى تحلل ثلاثي البيوترين بوساطة أنزيم الليباز المفرز إلى الوسط الصلب، وتكوّن حمض البيوتريك الذائب في الماء. قيس قطر الهالةالمتكوّنة حول المستعمرة الفطريةلكل منها، وقطر نمو المستعمرة الفطرية، وتمّ حساب قابلية الفطر على إنتاج الأنزيم (حيز النشاط) من العلاقة الآتية:

$$\text{قابلية الفطر على إنتاج الليباز} = \frac{\text{قطر هالة التحلل (ملم)}}{\text{قطر المستعمرة الفطرية (ملم)}}$$

3) **تحضير وسط الاستنبات الخاص بالإنتاج:** استخدم الوسط الغذائي الخاص بإنتاج الليباز والموصوف من قبل *Chen[17]* والمتكون من المواد الآتية(غ/لتر منالماء المقطر): *5* غ *Pepton*، *1* غ $(NH_4)_2SO_4$، *1* غ K_2HPO_4، *1* غ $MgSO_4 . 7H_2O$.تم إذابة جميع مكونات الوسط في الماء المقطر المعقم، ثمّ أضيف المصدر الكربوني إلى مكونات الوسط الغذائي وهو أحد الزيوت النباتية (زيت زيتون، زيت دوار الشمس، زيت الذرة)،بتركيز *1%*، وضبط *pH* الوسط عند الدرجة *5.8*، وزّع الوسط المحضّر في دوارق حجم *250 mL* بواقع *50 mL*في كل دورق وبمعدل ثلاث مكررات لكل معاملة، سدت الدوارق بإحكام بسدادات قطنية ثم غلفت بأوراق الألمنيوم وعقمت بالأتوغلاف لمدة *20* دقيقة وتركت تبرد. لقحت محتويات كل دورقبقرص من مستعمرة الفطر بقطر *5mm* وبعمر أسبوع. حضنت الدوارق بعد التلقيح على هزازة ضمن حاضنة عند الدرجة *28±1°C*بمعدل *150* هزّة/دقيقة، ثم سحبت الدوارق من الحاضنة بعد سبعة أيام.

-فلدراسة تأثير فترة الحضن على نمو الفطر *P. devirsum* وعلى فعالية أنزيم الليباز، ولتحديد أفضل مصدر كربوني، استخدم الوسط الزرعي الخاص بالإنتاج، ثمّ أضيف إلى مكونات الوسط الغذائي أحد الزيوت النباتية (زيت زيتون، زيت دوار الشمس، زيت الذرة)، بتركيز *1%*، وبنسبة حجم : حجم، بصفته مصدر كربوني لإنتاج الأنزيم من الفطر المدروس، وحدّدت كل من الكتلة الحيوية الجافة للفطر وفعالية الليباز المنتج، خلال فترات مختلفة من الحضن تراوحت من*(2-9)* أيام، بدرجة حرارة *28 ± 1°C* و *pH=5.8*.

-ولدراسة تأثير تراكيز مختلفة من زيت الذرة على نمو الفطر وعلى فعالية الأنزيم المنتجأضيف زيت الذرة إلى وسط إنتاج الأنزيمبالتراكيز الآتية: *(3%,2.5%,2%,1.5%,1%)*، وحضنت خمسة أيام بدرجة حرارة *28 ±1 °C* و*pH = 5.8*.

-حددت درجة الحرارة المثلى لإنتاج أنزيم الليباز، بحضن وسط الإنتاج مدة *5* أيام (المثلى في دراستنا)،باستخدام زيت الذرة كمصدر كربوني بتركيز *2%* (المثلى في دراستنا)، ودرجة حموضة *pH=5.8*، ضمن مجال من درجات الحرارة يتراوح من *22°C* إلى *49°C* بفارق *3* درجات.

-حددت درجة حموضة الوسط على إنتاج الليباز، ضمن مجال *pH* يتراوح ما بين *(5.0-9.0)* بفارق نصف درجة، وذلك بعد *5* أيام من الحضن بدرجة حرارة *34 ±1°C*(المثلى في دراستنا)، وبوجود زيت الذرة كمصدر كربونيبتركيز *2%*.

-لتحديد المصدر النتروجيني الأفضل، تمّ استخدام مصادر نيتروجينية مختلفة أضيفت إلى وسط النمو اعتماداً على نسبة محتوى النتروجين فيها، وهي: كبريتات الأمونيوم، نترات الأمونيوم، كلور الأمونيوم، نترات الصوديوم، اليوريا، الببتون، وفوسفات أحادية الأمونيوم، وذلك في الشروط المثلى التي توصلنا إليها في هذه الدراسة.

4) **تقدير وزن الكتلة الحيوية الجافة:** بعد انتهاء مدة الحضن سحبت الدوارق من الحاضنة وفصلت الكتلة الحيوية عن المستخلص الأنزيمي بترشيح محتوى كل دورق باستخدام أوراق ترشيح من نوع *Whatman (No. 1)* مجففة وموزونة مسبقاً ومثبتة على قمع بوخنر *BauchnerFunel*مجهز بمفرغ هوائي كهربائي، وبعد انتهاء عملية الترشيح جففت أوراق الترشيح الحاملة للكتلة الحيوية في فرن كهربائي عند الدرجة *70°C*لمدة *24* ساعة. استخدم الراشح المحتوي على الليباز فيما بعد لقياس فعالية أنزيم الليباز المنتج من الفطر، أما ورق الترشيح وما عليه من مزرعة فطرية فقد تمّ نقعه بالأسيتون، ثمّ رشحّ مرّة أخرى على نفس أوراق الترشيح، أهمل هذا الراشح وجففت أوراق الترشيح هذه بنفس الطريقة السابقة. ومن ثمّ قيست الكتلة الحيوية بحساب فارق الوزنين باستخدام ميزان حساس.

5) **قياس فعالية الليباز *Lipase*:**أخذ الراشح وأجريت عليه عملية طرد مركزي بسرعة *1000* دورة/الدقيقة لمدة *5* دقائق *[18]*، للتخلص من بقايا الفطر والمواد غير الذائبة. ثمّ قسّم الراشح إلى جزئين، غليّ جزء منه لفترة قصيرة، بهدف تحطيم الأنزيم واستخدامه في التجربة كشاهد، واستعمل الجزء الآخر لتقدير فعالية الليباز. وفي حال عدم استخدام الراشح المحتوي على الأنزيممباشرةً، أضيف له بنزوات الصوديوم *(1g/L)*لإيقاف نمو الفطور، وحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة *4° C*لحين الاستخدام. ولقياس الفعالية استخدمتطريقة *Chartrain[19]* التي تعتمد على تفاعل *5* مل من مستحلب زيت الزيتون مع *2%*بولي فينول الكحول مجنسة بخلاط سريع في الدرجة *4°C* مدة *15* دقيقة. وأضيف إليها *3* مل محلول موقي *Tric-HCl(0.1 M)*و*1*مل *$CaCl_2$(0.1M)* وضبطت درجة حموضة الوسط على *pH= 8.0*، ثم أضيف *1* مل من الرشاحة المحتوية على الأنزيم الخام، وحضنت الأنابيب في درجة حرارة *35 ±1°C* لمدة نصف ساعة، بعدها أوقف التفاعل بإضافة *20* مل من الأسيتون والإيتانول بنسبة *(1:1)* حجماً.

حضّر الشاهد بنفس الخطوات السابقة بدون إضافة الأنزيم، وحضّر شاهد آخر مع إضافة الأنزيم المفكك بالحرارة. قيست الأحماض الدهنية الناتجة عن التفاعل باستخدام طريقة المعايرة *Titration* الموصوفة من قبل *Kamini[20]* والتي تعتمد على معايرة الأحماض الدهنية المتحررة بفعل أنزيم الليباز ضمن محلول *Na OH* ذو التركيز *0.05M* وإضافة مشعر الفينول فتالئين، والتي عُبّر عنها بالواحدة الأنزيمية *Unite* والتي عرّفها *Chen[17]* على أنها كمية الأنزيم التي تحرر ميكرومول واحد من الأحماض الدهنية الحرّة *(FFA)* خلال دقيقة واحدة تحت ظروف طريقة العمل. وقورنت بكمية الليباز المعياري من شركة *light – Koch* الألمانية رقم *3465* (*50* وحدة/ملغ)، وذلك ضمن شروط التجربة السابقة وفقاً لما يأتي:

$$\text{فعالية الليباز المدروس \%} = \frac{\text{عدد ميكرومولات FFA لأنزيم الليباز المدروس}}{\text{عدد ميكرومولات FFA لأنزيم الليباز المعياري}} \times 100$$

تمّ استخدام البرنامج الإحصائي *spss* (الحزم الإحصائية للعلوم الاجتماعية) من آجل التحليل وتحقيق الأهداف الموضوعة في إطار هذا البحث، كما تمّ استخدام مستوى الدلالة *(5%)* يقابلها مستوى ثقة *(95%)* لتفسير نتائج الدراسة. واستخدمت طريقة المربعات الصغرى لاستنتاج المعادلة التي تربط بين العوامل المدروسة وكل من الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية، واستخدم معامل التحديد لتحديد نسب التأثير والمقارنة فيما بين العوامل.

نفذ البحث في مخابر كلية العلوم ومعهد البيئة / جامعة تشرين، في الفترة الواقعة بين *2015/2/15* و*2015/8/15*.

النتائج والمناقشة:

تحديد كفاءة العزلات المدروسة لإنتاج الليباز باستخدام وسط تحلل مادة *Tributyrin*. لوحظ تمكّن الفطور الأربعة*A.niger*، *F.oxysporum*، *F.solani* و *P. devirsum* من إزالة عتمة الوسط وتشكيل هالة شفافة حول المستعمرة الفطرية لكل منها ، نتيجة تحلل مادة *Tributyrin* بوساطة أنزيم الليباز المفرز من هذه الفطور إلى الوسط وتحرير حمض البيوتريك الذائب في الماء، بينما الفطر *A.alternata* لم يتمكّن من إزالة عتمة الوسط دلالة على عدم إفرازه لأنزيم الليباز (جدول *1*). ونلاحظ تميّز الفطر *P.devirsum* بقدرته على إنتاج الأنزيم، حيث بلغ قطر هالة التحلل حول مستعمرته الفطرية *(39.7 mm ±0.08)*، تلاه الفطر *F.solani*، إذ بلغ قطر هالة التحلل حول مستعمرته الفطرية *(30.9 mm ±0.04)*، في حين بلغ قطر هالة التحلل حول مستعمرة كل من *A.niger* و *F.oxysporum* *(23.4 mm ±0.23)* و *(19.2 mm ± 0.12)* على التوالي. تشير هذه النتائج إلى وجود اختلافات واضحة في كفاءة العزلات الفطرية المختلفة على إنتاج الليباز في الوسط الصلب بعد *5* أيام من الحضن وبدرجة حرارة *28 ±1°C*. ويعزى هذا الاختلاف لعدة أسباب هي: التباينات الوراثية فيما بينها *[21]*، أو عدم كفاية فترة الحضن لتحفيز الفطر على إنتاج الإنزيم، أو عدم قدرة الفطر على استغلال وسط الاستنبات، أو عدم ملائمة *pH* الوسط الزرعي لنمو الفطر *[10]*. وبالرغم من أنّ التركيب الوراثي لأي كائن حي يتصف بالثبات، غير أنّه يتأثر بتغيرات البيئة، والتي تنعكس على صفاته المظهرية *[11]*. تتشابه نتائج هذه الدراسة مع ما توصّل إليه المولى *[22]* بأنّ الفطور المعزولة من مصادر مختلفة تختلف في قابليتها على إفراز الليباز. وعلى ضوء النتائج اختيرت *P. diversum* كأفضل عزلة فطرية منتجة لأنزيم الليباز في التجارب اللاحقة.

الجدول *(1)*: كفاءة الفطور المدروسة لإنتاج الليباز على وسط تحلل *Tributyrin* بعد *5* أيام حضن بدرجة حرارة *28 ±1°C*.

الفطور	قطر هالة التحلل (ملم)	قدرة الفطر على إنتاج الليباز
A. niger	*23.4 ± 0.23*	*5.8 ± 0.02*
alternata A.	–	سالب
F. oxysporum	*19.2 ± 0.12*	*4.0 ± 0.11*
F. solani	*30.9 ±0.04*	*6.1 ±0.21*
P. devirsum	*39.7 ± 0.08*	*7.3 ± 0.43*

كل قيمة هي متوسط لثلاث مكررات، مضاف إليها الانحراف المعياري *(S.D)*

تأثير فترة الحضن على نمو الفطر *P. devirsum* وعلى مستوى إنتاج الليباز باستخدام مصادر كربونية مختلفة:

أظهرت نتائج الجدول*(2)* زيادة في الكتلة الحيوية الجافة وزيادة في إنتاج الليباز بازدياد فترة الحضن بدءاً من اليوم الثاني وحتى اليوم الخامس، بعدها بدأت بالتناقص مع استمرار فترة الحضن حتى اليوم التاسع وذلك لجميع المصادر الكربونية المستخدمة. كما تبين أنّ زيت الذرة هو أفضل مصدر كربوني لنمو الفطر ولإنتاج الليباز، إذ بلغت أعلى قيمة للكتلة الحيوية الجافة باستخدام زيت الذرة في اليوم الخامس من الحضن *(15.99±0.01 g/L)*، وبلغت الفعالية الأنزيمية أقصاها *(67.43±0.02%)*. في حين أعطت الزيوت الأخرى كتلة حيوية جافة أقل وفعالية أقل مما أعطى زيت الذرة في اليوم الخامس من الحضن، إذ بلغت الكتلة الحيوية للفطر باستخدام زيت الزيتون وزيت دوّار الشمس *(13.93±0.04 g/L)*و*(12.57±0.02 g/L)* على التوالي. أما الفعالية فقد بلغت *(63.61±0.04%)* و*(59.11±0.08%)* لكل منهما على التوالي.

جدول *(2)*: تأثير فترة الحضن، بدرجة حرارة *28 ±1°C* و *pH=5.8*،على الكتلة الحيويةللفطر *P. devirsum* وفعالية الليباز المنتج باستخدام مصادر كربونية مختلفة.

مدّة الحضن بالأيام	زيت دوّار الشمس		زيت الزيتون		زيت الذرة	
	الكتلة الحيوية الجافة *(g/L)*	الفعالية الأنزيمية *(%)*	الكتلة الحيوية الجافة *(g/L)*	الفعالية الأنزيمية *(%)*	الكتلة الحيوية الجافة *(g/L)*	الفعالية الأنزيمية *(%)*
2	3.48 ± 0.04	28.43 ± 0.03	4.82 ± 0.12	31.65 ± 0.19	5.02 ± 0.11	33.97 ± 0.07
3	5.96 ± 0.08	35.81 ± 0.11	6.86 ± 0.05	37.46 ± 0.13	8.75 ± 0.09	45.68 ± 0.08
4	8.43 ± 0.09	42.29 ± 0.15	9.97 ± 0.09	47.12 ± 0.09	13.23 ± 0.04	60.59 ± 0.04
5	12.57 ± 0.02	59.11 ± 0.08	13.93 ± 0.04	63.61 ± 0.04	15.99 ± 0.01	67.43 ± 0.02
6	10.17 ± 0.03	50.47 ± 0.04	12.18 ± 0.02	60.93 ± 0.06	13.39 ± 0.09	62.11 ±0.03
7	9.35 ± 0.07	46.03 ± 0.02	11.02 ± 0.08	57.38 ± 0.11	12.24 ± 0.04	60.43 ± 0.11
8	8.94 ± 0.15	44.52 ± 0.07	10.34 ± 0.03	51.43 ± 0.08	11.03 ± 0.11	56.32 ± 0.03
9	7.86 ± 0.01	40.12 ± 0.04	9.46 ± 0.06	45.21 ± 0.03	10.67 ± 0.08	51.62 ± 0.05
P	0.009*	0.018*	0.006*	0.004*	0.011*	0.002*

كل قيمة هي متوسط لثلاث مكررات، مضاف إليها الانحراف المعياري *(S.D)*حيث أنّ: *P*– المعنوية، *– تدل على وجود فروق معنوية.

كما لوحظ وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية *(P< 0.05)* بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية للمصادر الكربونية الثلاثة تحت تأثير عامل الزمن(الجدول *2*). وبالمقارنة بين نسب تأثير فترة الحضن على الكتلة الحيوية (معامل التحديد R^2) باستخدام الزيوت الثلاث (الجدول *3*) لوحظ أنّ أعلى نسبة تأثير لفترة الحضن على إنتاج الكتلة الحيوية للفطر كانت باستخدام زيت الزيتون *(86.7%)* تليها زيت دوّار الشمس *(84.5%)* ومن ثمّ زيت الذرة *(83.4%)*. أما بالمقارنة بين نسب تأثير فترة الحضن على الفعالية الأنزيمية باستخدام الزيوت الثلاث، لوحظ أنّ أعلى نسبة تأثير لفترة الحضن على فعالية الليباز كانت باستخدام زيت الذرة *(92.2%)* تليها زيت الزيتون *(89.6%)* ومن ثمّ زيت دوّار الشمس *(79.8%)*.

الجدول *(3)*: يوضّح معادلة الارتباط المناسبة لكل عامل وقيمة معامل التحديد الموافقة.

المصدر	العامل	معادلة الارتباط	معامل التّحديد R^2
زيت دوار الشمس	الكتلة الحيوية	$-5.49+5.311T-0.433T^2$	*84.5%*
	الفعالية الأنزيمية	$-2.63+18.07T-1.5T^2$	*79.8%*
زيت الزيتون	الكتلة الحيوية	$-4.99+5.61T-0.46T^2$	*86.7%*
	الفعالية الأنزيمية	$-9.31+22.55T-1.85T^2$	*89.6%*
زيت الذرة	الكتلة الحيوية	$-5.63+6.68T-0.56T^2$	*83.4%*
	الفعالية الأنزيمية	$-2.5+22.31T-1.84T^2$	*92.2%*

إنّ ازدياد الكتلة الحيوية، التي تعكس نمو الفطر في وسط الاستنبات، مع استمرار الحضن حتى اليوم الخامس يدل على أنّ *5*أيام حضن هي فترة كافية لنمو الفطر *P.devircum* وللحصول على أعلى إنتاجية لأنزيم الليباز، حيث أنّ الفطر يحتاج لمدة زمنية ليتأقلم مع الوسط الغذائي وليبدأ بالنمو وإفراز الليبازالمحلمه للزيوت. وأنّ تدرج انخفاض الكتلة الحيوية مع استمرار الحضن دليل على استهلاك المغذيات ونفاذها من الوسط، بالإضافة إلى تراكم مواد الأيض السامة التي تؤدي إلى موت الخلايا وتحللها *[23]*.توصّل *Abbas* وزملائه *[7]* عندما استخدم عدّة عزلات فطرية معزولة من التربة إلى اختلاف هذه العزلات في قابليتها على إنتاج الليباز باستخدام أنواع مختلفة من الزيوت. كما بيّنت*Maia* وزملائها *[24]* أنّ كل من زيت السمسم وزيت الذرة هما الأفضل كمصادر كربونية لتنمية الفطر *F.solani* وإنتاج أنزيم الليباز، وإنّ إنتاج الليباز يتغيّر تبعاً لنقاوة الزيت. أما *Ogundero[25]*فقد توصّل إلى أنّ أقصى فعالية لأنزيم الليباز سجلت في اليوم السابع من الحضن لفطر *Humicolagrisea*.وبناءً على النتائج التي توصّلنا إليها استخدم زيت الذرة كمصدر كربوني وحضنت العينات لمدة خمس أيام في التجارب اللاحقة.

تأثير تراكيز مختلفة من زيت الذرة على نمو الفطر وإنتاج أنزيم الليباز: يتضح من خلال نتائج الجدول *(4)* استمرار نمو الفطر وازديادفعالية الليباز بازدياد تركيز زيت الذرة حتى التركيز *2%*، إذ بلغت قيمة الكتلة الحيوية *(17.83±0.11 g/L)* وبلغت فعالية الليباز *(72.78±0.04%)*، ثمّ اتجهت كل منهما إلى النقصان مع استمرار ازدياد تركيز الزيت فبلغت الكتلة الحيوية *(10.32±0.08g/L)* والفعالية *(40.65±0.03%)* عند تركيز *3%*. فتركيز الزيت المناسب لأعلى كتلة حيوية ولأعلى فعالية أنزيمية هو *2 g/L*.

جدول *(4)*: تأثير تراكيز مختلفة من زيت الذرة على الكتلة الحيوية للفطر *P. devirsum*
وعلى فعالية الأنزيم المنتج،بعد *5* أيام من الحضن بدرجة حرارة *28°C ±1* و *pH=5.8*.

تركيز زيت الذرة %	الكتلة الحيوية *(g/L)*	الفعالية الأنزيمية %
1	15.99 ± 0.01	67.43 ± 0.02 %
1.5	16.28 ± 0.02	70.18 ± 0.09 %
2	17.83 ± 0.11	72.78 ± 0.04 %
2.5	14.04 ± 0.06	65.17 ± 0.08 %
3	10.32 ± 0.08	40.65 ± 0.03 %
P	0.04*	0.04*

كل قيمة هي متوسط لثلاث مكررات، مضاف إليها الانحراف المعياري *(S.D)*
حيث أنّ: *P* – المعنوية، *– تدل على وجود فروق معنوية.

ولوحظ وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية *(P< 0.05)* بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية تحت تأثير تركيز زيت الذرة (الجدول *4*)، ولدى دراسة نسبة تأثير تركيز زيت الذرة على الكتلة الحيوية (معامل التحديد *R2*) لوحظ أنّها تساوي *(93.4%)*، في حين نسبة تأثيره على الفعالية الأنزيمية هي *(95.8%)*، (الجدول *5*).إنّ انخفاض قيمة الكتلة الحيوية في حال التراكيز المنخفضة تعود إلى أنّ هذه الكمية من الزيت غير كافية لنمو جيد للفطر. أما سبب انخفاض فعالية الليباز مع ازدياد تركيز الزيت هو نتيجة تثبيط الليباز بالأحماض الدهنية الحرّة (التثبيط الرجعي بنواتج التفاعل) *[26]*. وهذه النتائج تتوافق مع ما توصّل إليه *Long [27]* إذ بيّن أنّ تركيز *2%* من زيت الذرة هو الأفضل للحصول على أعلى إنتاجية لأنزيم الليباز من الفطر *A.flavus*. وبناء على هذه النتائج أضيف زيت الذرة بتركيز *2%* في التجارب اللاحقة.

الجدول *(5)*: معادلة الارتباط المناسبة لكل عامل وقيمة معامل التحديد الموافقة.

العامل	المعادلة	التحديدمعامل R^2
الكتلة الحيوية	$6.96 + 12.55Z - 3.82Z^2$	*93.4%*
الفعالية الأنزيمية	$21.92 + 62.29Z - 18.5Z^2$	*95.8%*

تحديد درجة الحرارة المثلى لإنتاج أنزيم الليباز: أظهرت نتائج الجدول *(6)* ازدياد الكتلة الحيوية الجافة للفطر وازدياد فعالية الليباز تدريجياً بازدياد درجة حرارة الحضن حتى الدرجة *34°C*، والتي بلغت عندها الكتلة الحيوية أعلاها *(18.94±0.06 g/L)* وبلغت فعالية الليباز أقصاها *(76.16±011 %)*. ثمّ انخفضت الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية تدريجياً مع استمرار ارتفاع درجة حرارة الحضن حتى الدرجة *49°C*، إذ بلغت الكتلة الحيوية *(3.28±0.09g/L)* والفعالية *(11.63±0.02%)*، فدرجة الحرارة المثلى الموافقة لأعلى كتلة حيوية ولأعلى فعالية أنزيمية هي *34°C*، وإنّ انخفاض درجة الحرارة أو ارتفاعها عن المثلى يؤدي إلى تباطؤ في نمو الفطور ومن ثمّ انخفاض في إنتاجية أنزيم الليباز ونشاطه.

جدول(*6*): تأثير درجة الحرارة على الكتلة الحيوية للفطر *P.devirsum*،وفعالية الليباز المنتج، بعد *5* أيام حضن و*pH=5.8* وبتركيز *2%* من زيت الذرة.

درجة الحرارة°C	الكتلة الحيوية الجافة *(g/L)*	الفعالية الأنزيمية *(%)*
22	9.73±0.05	40.36±0.06
25	11.18 ± 0.06	53.41 ±0.09
28	15.83 ± 0.11	72.78 ± 0.14
31	17.12 ± 0.16	74.84 ± 0.04
34	**18.94 ± 0.06**	**76.16 ± 0.11**
37	16.84 ± 0.09	73.03 ± 0.18
40	14.67 ± 0.11	66.31± 0.02
43	9.32 ± 0.18	48.35 ± 0.06
46	7.75 ± 0.02	30.78 ± 0.12
49	3.28 ± 0.09	11.63 ± 0.02
P	0*	0*

كل قيمة هي متوسط لثلاث مكررات، مضاف إليها الانحراف المعياري *(S.D)*

حيث أنّ: *P* – المعنوية، *– تدل على وجود فروق معنوية.

ولوحظ وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية *(P< 0.05)* بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية تحت تأثير درجة حرارة الحضن (الجدول *6*)، وأنّ نسبة تأثير عامل درجة الحرارة على الكتلة الحيوية تساوي *(94.4%)*، بينما نسبة تأثيره على الفعالية الأنزيمية هي *(98.8%)* (الجدول *7*). فقد بيّنت إحدى الدراسات بأنّ درجة الحرارة المثلى لنمو عزلات الجنس *Pseudomonas spp.* المعزولة من تربة ملوثة بالزيت ولإنتاج الليباز تعادل *30°C[28]*، بينما الجراثيم ذاتها المعزولة من مياه الصرف الصحي لمعمل تعليب الأسماك استطاعت النمو في درجة حرارة *50°C[29]*. وبناء على نتائجنا حضنت العينات في التجارب اللاحقة عند الدرجة *34°C*.

الجدول *(7)*: معادلة الارتباط المناسبة لكل عامل وقيمة معامل التحديد الموافقة.

العامل	المعادلة	معامل التحديد R^2
الكتلة الحيوية	$-52.37 + 4.16C - 0.062C^2$	*94.4%*
الفعالية الأنزيمية	$-234.46 + 18.6C - 0.28C^2$	*98.8%*

تحديد درجة الـ*pH*المثلى لإنتاج الليباز:يتضح من خلال نتائج الجدول *(8)* ازدياد معدلنمو الفطر بازدياد *pH* الوسط إلى حد معين بعدها تراجع نمو الفطر مع ازدياد قيمة *pH* حتى الدرجة *9.0*. فبلغت الكتلة الحيوية الجافة للفطر أقصاها *(21.87±0.08 g/L)* عند درجة الـ *pH=7.0*، كما تحققت أعلى فعالية لأنزيم الليباز*(82.93±0.03%)* ثمّ اتجهت كل من الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية نحو النقصان مع ازدياد قيمة *pH* الوسط لتصل الكتلة الحيوية *(8.25±0.20 g/L)* عند الدرجة *pH=9.0* والفعالية الأنزيمية *(40.23±0.11%)*، فدرجة *pH* المثلى لأعلى كتلة حيوية ولأعلى فعالية أنزيمية هي *7.0*، وهذا يؤكد على أنّ درجة حموضة الوسط لها دور فعّال في نمو الفطر وفي إنتاج الأنزيم.

الجدول(*8*): تأثير درجة *pH* الوسط على الكتلة الحيوية للفطر *P.devirsum*، وعلى فعالية الليباز المنتج، بعد *5* أيام من الحضن بدرجة حرارة *34 ±1°C* وبتركيز *2%* من زيت الذرة.

pH	الكتلة الحيوية الجافة (g/L)	الفعالية الأنزيمية (%)
5.0	7.20±0.06	30.89±0.12
5.5	16.48 ±0.15	54.91 ±0.09
6.0	18.98 ±0.04	70.06 ±0.12
6.5	20.32 ±0.07	75.24 ±0.13
7.0	**21.87±0.08**	**82.93±0.03**
7.5	20.05 ±0.16	76.13 ±0.03
8.0	18.44 ±0.12	67.28 ±0.09
8.5	10.29 ±0.08	52.31 ±0.01
9.0	8.25 ±0.20	40.23 ±0.11
P	0*	0*

كل قيمة هي متوسط لثلاث مكررات، مضاف إليها الانحراف المعياري *(S.D)*

حيث أنّ: *P* – المعنوية، *– تدل على وجود فروق معنوية .

كما ولوحظ وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية *(P<0.05)* بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية تحت تأثير درجة الحموضة، وأنّ نسبة تأثير درجة الحموضة *pH* على الكتلة الحيوية تساوي *(93.1%)*، في حين نسبة تأثيرها على الفعالية الأنزيمية هي *(97.7%)*، (الجدول *9*).

يمكن تفسير هذه النتائج بأنّ درجة حموضة الوسط تؤثر على سلوك وفعالية الأنزيمات، حيث أنّ الأنزيمات مواد بروتينية يعتمد نشاطها على وجود بعض المجموعات الأمينية والكربوكسيلية في بروتين الأنزيم بدرجة معينة من التأين، فإنّ أي تغيير في درجة *pH* ستتأثر به المراكز الفعّالة للأنزيم وبالتالي ينخفض نشاطه. كما أنّ القيم المرتفعة والمنخفضة من درجة *pH* تؤثر على الطبيعية البروتينية للأنزيم، وبالتالي تؤدي إلى خفض فعالية الأنزيم المنتج *[30]*. هذه النتائج متقاربة مع *Cornellis[31]* في بحثه حول أنزيم الليباز المنتج من جراثيم *P. aeruginosa* المعزولة من تربة ملوّثة بالزيت، حيث بيّن أنّ *pH=7.5* هي المثلى لعمل الأنزيم. في حين بيّنت *Lin [32]* أنّ فعالية الليباز العظمى كانت عند درجة حموضة تراوحت ما بين *(6–10)*.

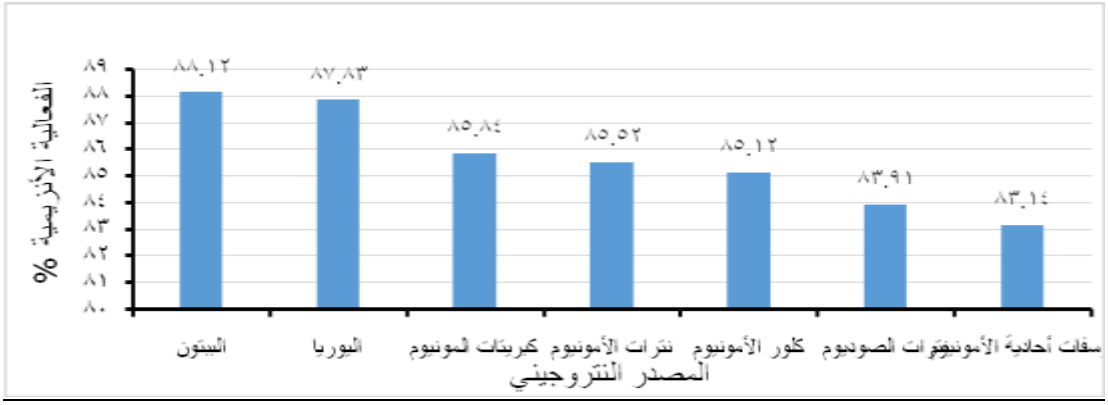
الجدول *(9)*: معادلة الارتباط المناسبة لكل عامل وقيمة معامل التحديد الموافقة.

العامل	المعادلة	معامل التحديد R^2
الكتلة الحيوية	$-145.12+48.15P-3.48P^2$	*93.1%*
الفعالية الأنزيمية	$-475.14+157.72P-11.3P^2$	*97.7%*

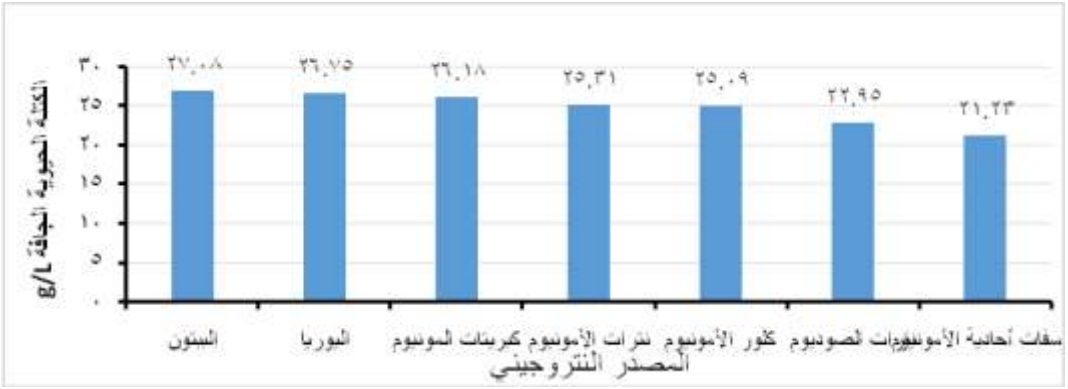
تأثير مصادر نيتروجينية مختلفة على نمو الفطر *P.devirsum* وفعالية الليباز المنتج: بينت النتائج إنّ إضافة مصدر نتروجيني إلى وسط النمو يؤدى إلى رفع قيمة كل من الكتلة الحيوية للفطر وإنتاجية أنزيم الليباز، ولكن بنسب مختلفة. فالببتون كان الأفضل من بين المصادر النتروجينية المستخدمة، إذ بلغت الكتلة الحيوية للفطر أقصاها

(27.08±0.21 g/L) وبلغت فعاليةالليباز أفضلها *(88.12±0.08%)*، يليه اليوريا بكتلة حيوية *(26.75±0.09 g/L)* وبفعاليةأنزيمية *(87.83±0.19%)*.أما أقل قيمة تحققت عند استخدام فوسفات أحادية الأمونيوم، مقارنةً بالمصادر النتروجينية الأخرى، إذ بلغت الكتلة الحيوية *(21.23±0.15 g/L)* وبلغت فعالية الليباز*(83.14±0.03%)*، كما هو موضّح في المخططين (*1* و *2*). كما لوحظ وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية *(P<0.05)* بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية تحت تأثير المصدر النتروجيني المستخدم.

أشارت الدراسات إلى أنّ المصادر النتروجينية تستغل، بشكل أفضل من غيرها، من قبل نوع معيّن من الأحياء الدقيقة. فقد توصّل *Miadenoska[33]* إلى أنّ كبريتات الأمونيوم هي الأفضل من بين المصادر النتروجينية لتنمية عزلة الفطر *Geotrichumcandidum* باستخدام زيت دوار الشمس كمصدر كربوني، وإنّ انتخاب المصدر النتروجيني يعتمد على الكائن المجهري المستخدم. وتوصّل *Ogundero[25]* إلى أنّ كبريتات الأمونيوم هي أفضل مصدر نتروجيني لتنمية الفطر *P.aurqntiogriseum* ولإنتاج الليباز.



المخطط *(1)*: تأثير مصادر نتروجينية مختلفة على فعالية الليباز المنتج من الفطر *P.devirsum*
بعد *5* أيام من الحضن بدرجة حرارة *34 ±1°C*، تركيز *2%* من زيت الذرة و *pH=7.0*.



المخطط *(2)*: تأثير مصادر نتروجينية مختلفة على الكتلة الحيوية لفطر *P.devirsum*،
بعد*5* أيام من الحضن بدرجة حرارة *34 ±1°C*، تركيز *2%* من زيت الذرة و *pH=7.0*.

الاستنتاجات والتوصيات:

1. تمّ الكشف عن كفاءة الأنواع الفطرية الأتية: *A.niger*، *F.oxysporum*، *F.solani*، *P.devirsum*، *A.alternata* على إنتاج الليباز، فتميّز الفطر *P.devirsum* بنشاطه الأنزيمي على بقية الفطور، بينما فشل الفطر *A.alternata* في إنتاج الأنزيم.

2. حددت الشروط المثلى لإنتاج أفضل كتلة حيوية للفطر *P. devirsum* وأفضل فعالية لأنزيم الليباز المنتج، فتبين أنّ خمسة أيام هي فترة الحضن المثالية بوجود زيت الذرة،بتركيز *2%*،ودرجة حرارة *34°C*، و *pH = 7.0*، حيث بلغت الكتلة الحيوية للفطر *(21.87 g/L)* وبلغت فعالية أنزيم الليباز *(82.93%)*.

3. تبين أن إضافة مصدر نتروجيني إلى وسط الإنتاج (مستخدمين الشروط المثلى التي تمّ التوصل إليها في دراستنا)، يزيد من نمو الفطر ومن إنتاج الأنزيم، وإنّ الببتون هو الأفضل كمصدر نتروجيني، حيث بلغت الكتلة الحيوية للفطر *(27.08 g/L)* وبلغت الفعالية الأنزيمية *(88.12%)*.

4. نسبة تأثير الشروط المدروسة (فترة الحضن،وتركيز الزيت، ودرجة الحرارة، و *pH*) على الفعالية الأنزيمية أكبر من نسبة تأثيرها على الكتلة الحيوية للفطر.

اعتماداً على نتائج البحث نوصي أن تكون الدراسات القادمة مكملة له وتتعلق بالإنتاج الحيوي لأنزيم الليباز من خلال تنمية الفطور على المخلفات الزراعية والصناعية الرخيصة الثمن باستخدام المخمرات الصناعية، ومن ثمّ تنقيتها على المستوى التجاري بهدف استخدامها في بعض الصناعات.

المراجع:

1. SNELLUMAN,EA. and COLWELL,RR. Acinetobacter lipase; molecular biology, biochemical properties and piotechnological potential. J. Industrial Microbiol and Biotechnol, 2004, 31(9): 391-400.

2. LIMA,V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P. and FONTANA,J.D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by Penicilliumaurantiogriseum. Foot Technol. Biotechnol.,2003, 41(20:105-110.

3. JAEGER,K.E.; LIEBETON, K.; ZONTA, A. SCHIMOSSEK,K. and REETZ,M.T. Biotechnologecal application of Pseudomonas aeruginosa lipase: efficient kinetic resolution of amines and alcohols. APPL. Microb. Biotechnol.,1996, 46: 99-105.

4. SHAFEI,M.S. and ABD - ELSLAM,I.S. Natural and microbial products chemistry department. National Research center (NRC), Ddokki,Cairo.Egypt,2005.

5. PANDY,A.; SOCOOL,CR. and MITCHELL, D.A.New developments in solid state fermentation: I-bioprocesse and products. Pros. Biochem., 2000, 35: 1153-1169.

6. BENJAMIN,A.; PANDEY,C.R.; SOCOOL,P.; NIGAM,N. and KRIEGER,V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol. APLL. Biochem.,1999, (29): 119-131.

7. ABBAS,H.H.; DEYRIS,V. and COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from Mucor spp. Strain isolated from plam fruit. Enzyme Micob.,2002, 31:968-975.

8. AGRIOS, G. N. ,Plant pathology. Newyork. Academic press, 1997.

9. CARDENAS,J.; ALVAREZ,E.; CASTRO - ALVARAZ,M-S.; SANCHEZ - MONTERO,J-M.; VALMA -SEDA,M. ; ELSON,SW. and SINISTERRAJ-V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast Lipase.J.Mol.Catal.B: Enzyme, 2001, 14: 11-23.

10. IKRAM- UL- H.; MUHAMMAD, M. J.;TEHAMINA, S. K. ; and ZAFAR, S. Cotton saccharifying activity of cellulose production by co- culture of Aspergillus niger and Trichoderma viride. Agriculture waster, 2005, 11: 105-113.

11. ELANDER,R.P. and CHNG,L.T. Microbial culture selection. In Microbial Technology. Vol.2 (eds. Peppler,H.J. and Prelman,D.) Academic Press. NewYork, 1979.

12. السوّاح، محمود محمد عوض الله. الأنزيمات الميكروبية. دار النيل للطباعة. المكتبة العصرية، المنصورة، *2002*.

13. GONSALVES, K. A. and FERREIRA, A.S., Fusarium oxysporum. Crop Knowledge master, University of Hawii, 1993, 1-3.

14. WALTER, M.; JAKLITSC, G. J.; SARAH, L.; BING, S. L., Hypocrearufa / Trichoderma viride: a ressessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. Stud Mycol USA, 2006, 56,1: 135-177.

15.ELLIS, M.B., Dematianceoushypomycetes. Common wealth mycological Institute. kew, surrey, England. 1971, 608 pp.

16.CRUICK SHANK, R.; DUGUID, J.P.; MARMION,B.P. and SWAIN, R.H.A. The practice of medical microbiology. T. and A. Constable Ltd., Edinburgh. Medicaln microbiology 12th, ed, V2. 1975.

17.CHEN, J.; ISHII,T. ; SHIMURA,S. ; KIRIMURA,K. and USAMI,S. Lipase production by Trichosporonfermentants Wu-C12 anewly isolated yeast. J.Ferment. Bioeng,1992, 73 (5): 412-414.

18.KAMINI,N.R.; MALA,J.G.S. and PUVANKRISHNAN,R. Lipase production frome Aspergillus niger by solid state fermentation using solid gingelly oil cake. Process biochemistry, 1998, 33(5): 505-511.

19.CHARTRAIN,M.; KATZ,L.; MARCIN,C.; THIEN,M.; SMITH,S.; FISHER,F.; GOKLEN,K.; SOLMON,P.;BRIX,T.; PRICE,K. and GREASHAM,R. Purification and characterization of a novebioconverting lipase from Pseudomonas aeruginosa MB 5001. Enzyme Microb. Technol. 1993.15:75-80.

20. KAMINI,N.R.; MALA,J.G.S.and PUVANKRISHNAN,R. Production and characterization of an extracellular lipase frome Aspergillus niger. Ind. J. Microbiol, 1997, 37: 85-89.

21.KHAN, M. M. H.;ALI, S.;RAZI, A. F. and ALZAM,M. Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into celulase enzyme. Environmental Science and Health part b,2007, 42:381-386.

22. المولى، زكريا سامي عبد الرزاق أحمد. التحري عن عزلة فطرية منتجة لأنزيم الليباز من ثمار الزيتون. مطبعة الموصل–العراق، *2003*.

23. عبد الوهاب خميس الصميدعي، طه. تأثير فترات مختلفة من التحضين ومصادر كربونية مختلفة في إنتاج أنزيم البيتا–كلوكوسايديس بوساطة عزلة محلية للفطر *Trichoderma harzianum*. جامعة الموصل – العراق، *2004*.

24. MAIA,M.M.; HEASLY,A.; DEMORAIS,M.M.C.;MORAIS,M.A.; LEDINGHAM,W.M. and LIMA,J.L. Effect of culture condition on lipase production by Fusarium solani in batch fermentation. Bioresoucre Technology,2001, 76 (1): 23-27.

25. OGUNDERO,V.W. Lipase activity of thermophilic fungi from moldy groundnuts in Nigeria. Mycologia,1980, 72: 118- 126.

26. GARDILLO,M.A.; MONTESINOS,J.L.; CASSA,C.;VALERO,F.; LAFUENLO,J. and SOLA,C. Improving lipase production from Cardidarugosa by abiochemical engineering approch. CPL.,1998,93(1-2): 131-142.

27. LONG,K.Production, properties and application of mycelium bound lipase of alocally isolatedstrain of Aspergillus flavus Link. University Putra Malaysia.1997.

28. HONG,J.H.; KIM,J.; CHO,O.K.;CHO,K.S. and RYU,H.W. Characterization of a diesel- degrading bacterium, Pseudomonas aeruginosa IU5 isolated from oil-contaminated in Koorea. Spring Link Journal,2004.

29. MASSE.L.; KENNEDY,KJ.; CHOU,SP. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of the fat particles in slaughterhouse wastewater. J.Chem. Technol. Biotechnol.,2001,76: 629-235.

30. دلالي، باسل كامل.موضوعات مختارة في التكنولوجيا الحيوية. دار الكتب للطباعة والنشر، مطبعة جامعة الموصل، العراق، *1999*.

31. CORNELIS,P. Pseudomonas: Genomics and molecular biology, 1st ed. Caister Academic Press USA. 2008.

32. LIN,S.F.;CHIOU,C.M.;YEAH,C.M. and TSAI,Y.C. Puriffication and partial characterization of an alkaline lipase from pseudomonas alcaligenes F- III APPl.Enviorn. Microbiol.,1996,26:
1093-1095.

33. MIADENOSKA,J. and DIMITROVSKI,A. Lipase production by Geotrichum candidum-M2 .Vol.20,No.1,2001,39-43.