الجمهـــورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة فرحات عباس سطيف 1
كليـة علوم الطبيعة والحياة

Université Ferhat Abbes Sétif 1
Faculté des sciences de la
Nature et de la vie

N°...../SNV/**2020**

قسـم الميكروبيولوجيا

أطـــروحـــــة

مقدمة من طرف

نـــاصف هـــدى ســـارة

للحصول على شهادة

دكتـــوراه علـــوم

فرع: البيولــوجيـا

تخصص: ميكروبيولوجيا

الموضـــــــــوع

إنتاج الأنزيمات الحالة والنشاط المضاد للميكروبات والسمي الخلوي لمستخلصات فطر *Aspergillus oryzae* المعزول من سبخة البيضاء (سطيف)

قدمت يوم: **2021/04/07** أمام لجنة المناقشة المتكونة من:

الرئيس:	**أ.د. حـرزالله داود**	**أستاذ جـــامعة فـــرحات عبـــاس سطيـف-1-**
المشـرف :	**أ.د. بلحطاب رشيد**	**أستاذ جـــامعة فرحـــات عبـــاس سطيـف-1-**
الممتحنون:	**أ.د. دهيمات العيد**	**أستاذ جـــامعة الإخوة منتـوري قسنـــطينـة-1-**
	أ.د. غضبان مولـود	**أستاذ جـــامعة محـــمد بوضيـــاف المسيلـــة**
	د. هندل النـوي	**أستاذ محاضر أ جامعة محمد بوضياف المسيلـــة**
ضيف الشرف :	**أ.د لعروس العربي**	**أستـــاذ جـــامعة فـــرحات عبـــاس سطيـف-1-**

مخبر الميكروبيـــولوجيـا التطبيقيـــة

تشكـــــرات

إن الحمد لله نحمده و نشكره على نعمة القلم و نصيب العلم الذي وهبنا إياه، فبدونه ما كان لهذا العمل أن ينجز و لولاه ما كنا نجني ثمرة مجهودنا،

فله الحمد حتى يرضى و له الحمد إذا رضي.

أتقدم بفائق الشكر و التقدير إلى الأستاذ الفاضل

" بلحطـــاب رشيـــد" على إشرافه لي و مساعدته و توجيهاته و نصائحه النيرة .

وأشـكر جميع أعـضاء لـجنة المناقشة الذين قبـــلوا مناقشة هذا البـحث، الأستاذ: حرز الله داود، أستاذ بجامعة فرحات عباس سطيف 1 لقبوله ترأس اللجنة، والأساتذة الكرام : الأستاذ مولود غضبان والأستاذ هندل النوي ،أساتذة بجامعة المسيلة ، والأسـتاذ دهيمات العيد أستاذ بجامعة قسنطينة 1

كما أتقدم بفائق الشكر و التقدير إلى الأستاذ الدكتور لعروس العربي لتشريفه هذه المناقشة.

كما أتقدم بالشكر الخاص إلى التقنيين المخبريين لمركز البحث البيوتكنولوجي بقسنطينة

مركز الأبحاث الطبية الحيوية بجامعة غرناطة –إسبانيا.

معهد باستور – قسم علم الفيروسات– الجزائر العاصمة

مخبر علم الأحياء الدقيقة بجامعة نوشاتال بسويسرا

على مساعدتهم في إنجاز هذا البحث.

و أشكر جميع الأساتذة الذين أكرموا علينا بنصائحهم ومساعداتهم، وأخص بالذكرالأساتذة

سيليني علاوة، سيلسني حفصة ، نتصيب عائشة و جلال نجيحة .

جزاهم الله خيــرا...

الإهـــــداء

إلى أحب اثنين على قلبي ، يا أعز ما أملك في هذا الوجود

أمـي و أبـي .

إلى زوجي وابنتاي الأعزاء رهف وجدان و أفنان

إلى أخواي العزيزين صلاح الدين و هيثم و زوجتيهما وابنة أخي إلينا.

إلى كل أهلي و أقاربي دون استثناء..

هـدى سارة

الملخصات

الملـــخـــص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم قابلية فطر *Aspergillus oryzae* المعزول من تربة مالحة (سبخة البيضاء، ولاية سطيف) على إنتاج المستقلبات الثانوية ذات الأهمية البيوتكنولوجية. من بين ثلاث عزلات فطرية المتحصل عليها (S1، S2 و S3)، والتي أخضعت إلى إختبار النشاطية المضادة للبكتيريا، كانت العزلة (S1) والتي تم تحديد نمطها الوراثي بـ *A. oryzae* 18HG80، الأكثر نشاطا (التركيز الأدنى للتثبيط بين 7.28 و 21.81 ميكروغرام/مل). بالنسبة للنشاطية المضادة للفطريات الممرضة، كانت فعالية المستخلص للسلالة *A. oryzae* 18HG80، منخفضة إلى متوسطة (9.3% بالنسبة لـ *Alternaria solani*، 46% بالنسبة *Aspergillus flavus/* و 37% لـ *Fusarium oxysporum*). من جهة أخرى تم إختبار هذه السلالة من حيث قدرتها على إنتاج أنزيمات الليباز، الأميلاز والبروتياز، وقد أظهرت دراسة المقارنة لإنتاج الأنزيمات من خلال عمليتي التخمر الصلبة باستعمال نخالة القمح (SSF) و السائلة (SmF) أن الإنتاج كان أكثر في SSF مقارنة بـ Smf. كما شملت هذه الدراسة أيضا على تعريف الجزيئات الحيوية المفرزة من طرف السلالة *A. oryzae* 18HG80 باستعمال كروماتوغرافيا الطور الغازي مع طيف الكتلة (GC/MS)، حيث أظهرت النتائج أن الفطر ينتج بالدرجة الأولى حمضي السيكسينيك والكوجيك بنسبة 42.284% و24.845% على الترتيب بالنسبة لمستخلص التخمر في الحالة السائلة، أما بالنسبة للتخمر في الحالة الصلبة فكانت نسبة إنتاج الحمضين أكبر نوعا ما (48% و 25.097% على الترتيب). كما اوضحت التجارب المخبرية لدراسة النشاطية المضادة للفيروسات للمستخلص الفطري، أن هذا الأخير ليس له أي تأثير على فيروس Herpes simplex-2 (HSV-2)، أما بالنسبة لإختبار السمية الخلوية فلم يبد المستخلص الفطري أي سمية للخلايا المختبرة.

حددت بعض الظروف المثلى لإنتاج الجزيئات الحيوية ذات نشاطية مضادة للميكروبات. إذ تم الحصول على أعلى تثبيط في درجة حرارة 30°م، ودرجة أس هيدروجيني4 و 6 ، ومدة حضن 28 يوما. أما بالنسبة لإنتاج الأنزيمات باستعمال التخمر على وسط نخالة القمح الصلب، فقد تم الحصول على أعلى إنتاج للأنزيمات الثلاث في درجة حرارة 30°م ورطوبة بنسبة 100 % ، أما أفضل مصدر نيتروجيني وكربوني لنشاط أنزيمي الأميلاز والليباز هو نيترات الصوديوم و الغليسيرول على التوالي ، وحجم اللقاح 2 مل بالنسبة لأنزيم الأميلاز، أما بالنسبة لأنزيمي البروتياز والليباز فكان حجم اللقاح 1مل هو الأمثل.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus oryzae*، الجزيئات الحيوية، الأنزيمات الميكروبية، النشاطية المضادة للبكتيريا والفطريات، استخلاص المستقلبات الثانوية.

Abstract

This study was conducted to assess the susceptibility of *Aspergillus oryzae* isolated from saline soils (Sebkha El Bayda, Setif) to the production of secondary metabolites that have biotechnological importance, as among three fungal isolates (S1, S2 and S3), which were subjected to an anti-bacterial activity test with following disc diffusion method, after extracting its secondary metabolites using ethyl acetate, the isolate (S1) whose genotype was determined was A. oryzae 18HG80, was the most active either against positive gram bacteria or negative gram bacteria, or tested resistance bacteria) .MIC is between 7.28 and 21.81µg/ml. Antifungal activity, of *A. oryzae* 18HG80 was low to moderate (9.3% for *Alternaria solani*, 46% for *Aspergillus flavus* and 37% for *Fusarium oxysporum*). On the other hand, this strain was tested in terms of its ability to produce the extracellular enzymes, lipase, amylase and protease. The comparative study of enzyme production through two fermentation processes (SSF) and (SmF) showed that enzyme production was more in SSF compared with Smf. Metabolite profiles of the fungus revealed by gas chromatography mass spectrometry GC/MS, allowed to identify bioactive compounds, where butanedioic (succinic) acid and kojic acid were the major compounds with total percentage of 42,284% and 24,845% respectively in SmF, while for SSF, the percentage of acid production was somewhat greater (48% and 25.097%, respectively). Antiviral activity of the fungal extract showed that the latter had no effect on the Herpes simplex-2 (HSV-2) virus. As for cellular toxicity testing, the fungal extract did not show any toxicity to the tested cells.

Optimization of cultural conditions for the production of biomolecules with antimicrobial activity showed that the highest inhibition was obtained at 30 ° C, pH 4, 6, and incubation period of 28 days. As for the production of enzymes using SSF, the highest production of the three enzymes was obtained at a temperature of 30 ° C and 100% humidity. The best nitrogen source for the amylase and lipase activity was sodium nitrate, while the glycerol was the best carbon source for the production of amylase, and the size of the inoculum was 2 ml for amylase. As for protease and lipase , it was 1 ml.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, biomolecules, microbial enzymes, antibacterial and antifungal activity, extraction of secondary metabolites.

Résumé

Le but de cette étude est pour évaluer la capacité de champignon *Aspergillus oryzae* isolé à partir des sols salins (Sebkha el-Baida, Sétif) à la production de métabolites secondaires d'importance biotechnologique. Parmi les trois isolats fongiques obtenus (S1, S2 et S3), qui ont été soumis à un test d'activité antimicrobien, en suivant la méthode du disque de diffusion des extrait d'acétate d'éthyle, l'isolat (S1) dont le génotype a été déterminé était *A. oryzae* 18HG80, était le plus actif (CMI entre 7,28 et 21,81 µg / ml). L'activité antifongique, de l'extrait de la souche *A. oryzae* 18HG80 était faible à modérée (9,3% pour *Alternaria solani,* 46% pour *Aspergillus flavus* et 37% pour *Fusarium oxysporum*). D'autre part, cette souche a été testée en termes de sa capacité à produire des enzymes extracellulaires, lipase, amylase et protéase. L'étude comparative de la production d'enzyme à travers deux processus de fermentation solide utilisant du son de blé (SSF) et liquide (SmF) a montré que la production était supérieure pour SSF par rapport au Smf. Cette étude a également inclus la définition des biomolécules sécrétées par la souche *A. oryzae* 18HG80 en utilisant la chromatographie en phase gazeuse avec spectre de masse (GC / MS), où les résultats ont montré que le champignon produit principalement de l'acide succinique et du kojic de 42,284% et 24,845%, respectivement lorsque l'extrait de fermentation était à l'état liquide, alors que pour la fermentation à l'état solide, le rapport de production était légèrement supérieur (48% et 25,097%, respectivement). L'activité antivirale de l'extrait fongique a montré que ce dernier n'avait aucun effet sur le virus Herpès simplex-2 (HSV-2). Quant aux tests de toxicité cellulaire, l'extrait fongique n'a montré aucune toxicité pour les cellules testées.

Certaines conditions optimales ont été déterminés pour la production de biomolécules à activité antimicrobienne. L'inhibition la plus élevée a été obtenue à 30 ° C, pH 4, 6, et durée d'incubation de 28 jours. Quant à la production d'enzymes par fermentation solide, la production la plus élevée des trois enzymes a été obtenue à une température de 30 ° C et 100% d'humidité. La meilleure source d'azote et de carbone pour l'activité enzymatique de l'amylase et de la lipase est le nitrate de sodium et le glycérol, respectivement avec le volume d'inoculum est de 2 ml pour l'amylase. Quant aux enzymes protéase et lipase, le volume d'inoculum optimale était de 1 ml.

Mots-clés: *Aspergillus oryzae*, biomolécules, enzymes microbiennes, activité antibactérienne et antifongique, extraction des métabolites secondaires.

جدول المحتـــــــــويـــــــــات

قـــــائمة الأشكال

قـــــائمة الجداول

قـــــائمة المختصرات

مقـــــــدمة..... 1

الفصـــل I : مـــراجعة المصـــادر

I.1 . جنس *Aspergillus*.....3

I.1.1. فطر *Aspergillus oryzae* 3

I.1.1.1 . التصنيف.....5

I.1.1.2 الأهمية البيوتكنولوجية لفطر *A.oryzae*.....6

I.2 . الجزيئات الحيوية 8

I. 1.2. التصنيف والإنتاج..... 9

I.2.2. المصادر..... 11

I.2.2.1. الأنسجة النباتية.....12

I.2.2.2. الطحالب والطحالب الدقيقة 12

I . 2.2.3. الكائنات الحية الدقيقة (الفطريات).....13

I .3. الأنزيمات الميكروبية في التطبيقات البيوتكنولوجية..... 17

I.3.1. تعريف وخصائص عامة.....17

I.3.2. الكائنات الحية الدقيقة مصدر للأنزيمات ذات التطبيقات البيوتكنولوجية.....18

I.1.2.3. تطبيقات الأنزيمات الميكروبية.....20

I.4 . طـــرق التخـــمر..... 27

I. 1.4. التخمر في وسط سائل.....28

I.2.4. التخمر في وسط صلب.....28

I.1.2.4. إيجابيات وسلبيات التخمر على وسط صلب.....29

I. 2.2.4. تطبيقات التخمر على وسط صلب.....30

الفصـــل II : المـــواد والطـــرق

II.1 . تقديـــر النشاطية المضادة للميكروبات للعزلات الثلاث 35

II.1.1. استخلاص الجزيئات الحيوية..... 36

II.1.1.1. التخمر على وسط سائل (SmF) 36

II. 2.1. النشاطية المضادة للميكروبات للمستخلصات.....36

II.1.2.1. تقدير التركيز الادنى للتثبيط (MIC).....37

II.2.2.1. النشاطية المضادة للفطريات.....37

II.2. التشخيص الجزيئي للسلالة *A. oryzae S1* 39

II.1.2. استخلاص الحمض النووي.....38

II.2.2. تضخيم الحمض النووي بتقنية الـ PCR 39

II.3 . التحليلات الإحصائية 39

II.4 . تأثير بعض العوامل الفيسيولوجية على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات من طرف السلالة *A. oryzae* S1 40

II. 1.4. تأثير درجة الحرارة.....40

II.2.4. تأثير درجة الاس الهيدروجيني.....40

II.3.4. تأثير الملوحة.....40

II.4.4. تأثير مدة الحضن.....41

II.5 . مقارنة استخلاص الجزيئات الحيوية بين استعمال التخمر على وسط سائل و وسط صلب ... 41

II.1.5. التخمر على وسط سائل.....41

II.2.5. التخمر على وسط طبيعي صلب.....41

II.1.2.5. استخلاص الجزيئات الحيوية في تخمر الحالة الصلبة 42

II. 3.5. الكشف الأولي للمركبات الحيوية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC).....42

II. 4.5. تعريف الجزيئات الحيوية باستعمال كروماتوغرافيا الطور الغازي مع طيف الكتلة.....43

II.6 . تقييم السمية الخلوية للمستخلصات الفطرية..... 44

II. 1.6. الخواص المناعية لمستخلصات SSF و SmF على إنتاج أكسيد النيتريك في خلايا RAW264 44

II 2.6. اختبار السمية الخلوية في الزجاج لمستخلصات SSF و SmF في خلايا CaCo2.....45

II.7 . اختبار النشاطية المضادة للفيروسات 46

II.8 . النشاطيـــــة الأنزيميـــــة..... 47

II.1.8. التحري عن قدرة العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae* على إنتاج الأنزيمات المحللة 47

II.1.1.8. الأميلاز..... 47

II. 2.1.8. الليباز..... 48

II.8.3. البروتياز 48

II.8.2. إنتاج الأنزيمات باستعمال التخمرعلى وسط اصطناعي سائل والتخمر على وسط طبيعي صلب.....48

II. 8.1.2. إنتاج الأميلاز.....49

II.8.2.2. إنتاج البروتياز.....50

II.8.3.2. إنتاج الليباز.....51

II.9 . تحديد بعض الظروف المثلى لإنتاج أنزيمات الليباز،الأميلاز و البروتياز باستعمال التخمر في الحالة الصلبة (SSF)..... 52

II.9.1. تأثير درجة الحرارة.....52

II. 9.2. تأثير نسبة الرطوبة.....52

II. 9.3. تأثير حجم اللقاح.....53

II.9.4. تأثير نوع المصدر الكربوني والأزوتي.....53

الفصـــل III : النتـــــائج

III.1. تعريف العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae* 54

III.2 . إختبار النشاطية المضادة للميكروبات لمستخلصات الإيثيل أسيتات للعزلات الثلاث..... 55

III.3 . التشخيص الجزيئي للسلالة *A. oryzae* S1 58

III.4 .تأثير بعض العوامل الفيسيولوجية على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات من طرف السلالة *A. oryzae* 18HG80 59

III. 4.1. تأثير درجة الحرارة.....59

III. 2.4. تأثير درجة الأس الهيدروجيني.....60

III. 3.4. تأثير درجة الملوحة.....61

III.4.4. تأثير مدة الحضن..... 61

III.5 . مقارنة بين استخلاص الجزيئات الحيوية باستعمال التخمر في الوسط السائل والتخمر في الحالة الصلبة..... 63

III.1.5. الكشف الأولي للجزيئات الحيوية بواسطة TLC. 63

III.2.5. تعريف الجزيئات الحيوية بواسطة GC/MS.....65

III.6 . تقييم السمية الخلوية للمستخلصين SmF و SSF 75

III.7 . اختبار النشاطية المضادة للفيروسات 77

III.8 . النشاطيـــــة الأنزيميـــة 77

III.9. مقارنة إنتاج الأنزيمات باستعمال التخمر في وسط سائل (SmF) والتخمر في الحالة الصلبة (SSF).....79

III.10 . تحديد بعض الظروف المثلى لإنتاج أنزيمات الليباز، الأميلاز والبروتياز باستعمال التخمر الحالة الصلبة..... 80

III.1.10. تأثير نوع المصدر الكربوني والأزوتي.....80

III.2.10. تأثير درجة الحرارة.....82

III.3.10. تأثير حجم اللقاح.....83

III. 4.10. تأثير نسبة الرطوبة.....83

الفصـــل IV : المنـــــــاقشة

1.IV . النشاطية المضادة للميكروبات لفطر *A. oryzae* 86

2.IV . تأثير بعض العوامل على إنتاج الجزيئات الحيوية ذات النشاطية المضادة للميكروبات..... 88

3.IV . مقارنة استخلاص الجزيئات الحيوية بين استعمال تخمر الحالة السائلة (SmF) وتخمر الحالة الصلبة (SSF)..... 90

4.IV . دراسة سمية السلالة *A. oryzae* 18HG80..... 92

5.IV . النشاطية الأنزيميـة..... 94

6.IV . تحديد بعض الظروف المثلى لإنتاج أنزيمات الليباز، الأميلاز والبروتياز باستعمال التخمر الحالة الصلبة..... 96

الخـــاتمـــــــــة..... 102

المراجـــــــــع 104

الملحقـــــــــات..... 118

المنشور العلمـــــي

قـــائمة الأشكـــال

شكل 1 . أهم الخصائص المورفولوجية لفطر *Aspergillus sp.* 4
شكل 2. التركيبات العامة لمختلف المجموعات التي تنتمي إليها الجزيئات الحيوية. 10
شكل 3 . بنية بعض المركبات الطبيعية المعزولة من الفطريات ذات النشاط الضد ميكروبي. 15
شكل 4. تطبيـقات الأنزيمات الميكروبيـة. 20
شكل 5. مخطط قياس النمو الشعاعي للفطريات من خلال طريقة الزرع المزدوجة 38
شكل 6. مستعمرة *A. oryzae* منماة على وسط PDA عند درجة 30°م.....54
شكل 7. الرأس البوغية لفطر *A.oryzae* تحت المجهر 54
شكل 8. مقارنة بين متوسط قطر التثبيط لمستخلصات العزلات الثلاث على نمو مختلف الكائنات الحية الدقيقة الممرضة..... 56
شكل 9. اختبار النشاطية المضادة للميكروبات للعزلات الثلاث.....57
شكل 10. النشاطية المضادة للفطريات لفطر *A. oryzae*.....58
شكل 11. تأثير درجة الحرارة على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات 60
شكل 12 . تأثير الأس الهيدروجيني على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات.....61
شكل 13 . تأثير تركيز NaCl على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات 62
شكل 14. تأثير مدة الحضن على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات.....62
شكل 15 . نمو فطر *A. oryzae* 18HG80 بعد التخمر في الوسط السائل(SmF) ووسط نخالة القمح الصلب (SSF) 63
شكل 16 . فصل المركبات باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة تحت 365نانومتر (UV) 64
شكل 17. كروماتوغرام GC/MS لمستخلص فطر *A.oryzae* 18HG80 باستعمال تخمر الوسط السائل65
شكل 18. كروماتوغرام GC/MS لمستخلص فطر *A.oryzae* 18HG80 باستعمال تخمر الوسط الصلب.....; 66

شكل 19 . اختبار السمية الخلوية في الزجاج لمستخلصات SSF و SmF على خلايا Caco-2 75
شكل 20. الخواص المناعية لمستخلصات SSF و SmF على إنتاج أكسيد النيتريك في خلايا RAW 264 76
شكل 21. تأثير الاعتلال الخلوي للفيروس.....77
شكل 22. مقارنة نسبة الإنتاج الأنزيمي بين العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae* 78
شكل 23. النشاطية الأنزيمية لفطر *A. oryzae* 78
شكل 24. مقارنة إنتاج الأنزيمات بين استعمال التخمر السائل والتخمر الصلب 79
شكل 25. تأثير مصادر كربونية مختلفة على النشاطية الأنزيمية 81
شكل 26. تأثير مصادر نيتروجينية مختلفة على النشاطية الأنزيمية.....81
شكل 27. تأثير درجة الحرارة على نشاطية الأنزيمات 82
شكل 28. تأثير حجم اللقاح على النشاطية الأنزيمية 84
شكل 29. تأثير نسبة الرطوبة على النشاطية الأنزيمية 84

قـــائمة الجـــداول

جدول 1. الأنزيمات الصناعية ومصادرها من الكائنات الحية الدقيقة. 19

جدول 2. تطبيقات الأنزيمات الصناعـية ذات مصدر ميكروبي. 21

جدول 3. التطبيقات الصناعية للتخمر في الحالة الصلبة (SSF). 31

جدول 4. التراكيز الدنيا المثبطة لمستخلص الفطر *A.oryzae* S1 56

جدول5. التسلسل النكليوتيدي لنواتج PCR للعزلة *A. oryzae* 18HG80 ونسبة تطابقها مع السلالة المرجعية*A . oryzae* SVP01 رقم التسلسل (KP256849.1)..... 59

جدول 6 . قيم معامل الإنسياب (Rf) لمختلف البقع في الوسطين السائل والصلب..... 64

جدول 7. الجزيئات الحيوية التي تم تعريفها في مستخلص *A. oryzae* 18HG80 باستعمال التخمر في الوسط السائل SmF 66

جدول 8. الجزيئات الحيوية التي تم تعريفها في مستخلص *A. oryzae* 18HG80 باستعمال التخمر الحالة الصلبة SSF 72

قـائمـة المختـــصرات

ANOVA: Analyse of Variance
ATCC: American Type Collection Culture
CaCo-2: Human colon adenocarcinoma
DMSO: Diméthyl sulfoxide
DNSA: 3,5-dinitrosalicylic acid
ECRB: *E. coli* Resistant to bactericide
FAO: Food and Agriculture Organization
FBS/MEM: Fetal Bovine Serum/ Minimum Essential Media
FDA : Food and Drug Administration
GC/MS: Gas chromatography/ Mass Spectrometery
GRAS: Generally Recognized As Safe
GYP: Glucose Yeast extract Peptone agar
HEP-2 cells: Human Epithelial type **2**
IKI: Iodine-Potassium Iodide
LPS: Lipopolysaccharid
M ±SD: Mean ± Standard deviation
MEP: Methyl D-erythritol 4-phosphate pathway or non mevalonat pathway
MGM: Miniral Growth medium
MIC: Minimal inhibitory concentration
MRSA: Methicillin - Resistant *Staphyloccocus aureus*
MTT: 3,-4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyl Tetrazolium bromide
NRPS: Non Ribosomal Peptids Synthetase
PDA: Potato Dextrose Agar
PDB: Potato Dextrose Broth
RAW264: murine macrophage Cell line
Rf: Retention Factor
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
RT: Retention Time
SmF : Submerged Fermentation
SSF : Solid state Fermentation
TCA: TriChloro acetic Acid
TLC: Thin Layer Chromatography
UV: Ultra-Violet
WHO: World Health Organization
YES: Yeast extract saccharose

مقـــــــــدمـــــة

مقـــــدمـــة

تشغل التربة المالحة حوالي 7 % من مساحة اليابسة، و هي تتميز بخصائص فيزيائية وكيميائية غير ملائمة لنمو الكائنات الحية، إلا أن الأبحاث أظهرت أن بعض الكائنات الحية الدقيقة، و خاصة الفطريات قادرة على النمو و التكيف لمثل هذه الظروف، إذ ترجع هذه القدرة إلى تطوير مجموعة مختلفة من الآليات الفسيولوجية للتأقلم (Kogej *et al.*, 2005). تلعب الفطريات دورا أساسيا في صيانة و تسيير النظم البيئية التي تحيط بالإنسان كاستمرار الدورة الطبيعية، و ذلك بتحويل المواد العضوية الميتة إلى مواد قابلة للاستعمال عن طريق تحليلها بالأنزيمات المحررة بالوسط. و منذ وقت طويل يستغل الإنسان هذه القوة المحللة للفطريات لاستعمالها في شتى المجالات مثل صناعة الغذاء، إنتاج الأحماض و الكحول العضوية، المضادات الحيوية، البروتينات و غيرها (Schutyser، 2003).

تعرف مملكة الفطريات (Mycetae)، وخاصة منها الفطريات الخيطية، بأنها مصدر قيم للجزيئات الحيوية المتنوعة ذات الأهمية البيوتكنولوجية منذ اكتشاف البينيسيلين عام 1928 في الفطر *Penicillium notatum* (Al-Almaqtri and Fakih، 2019). ومنذ ذلك الوقت، تم الكشف على العديد من المستخلصات الفطرية و / أو المنتجات الخارج خلوية ذات نشاطية مضادة للميكروبات، والتي توفر مصدرًا غنيًا للتطبيقات العلاجية (Petit *et al.*,2009)، خاصة بعد ظهور المشاكل الصحية التي تهدد البشرية مثل ظهور و زيادة عدد البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية مثل بعض الأجناس (*Mycobacterium*، *Streptococcus* و *Staphylococcus*) مما دفع بالباحثين إلى البحث عن مصادر أخرى لجزيئات جديدة نشطة بيولوجيا تكون أكثر فعالية و أقل سمية و ضرر على البيئة (Qin *et al.*, 2011) .

الكائنات الحية الدقيقة هي المصدر المفضل للأنزيمات مقارنة مع النباتات أو الحيوانات، وهذا بفضل مزايا عديدة مثل الإنتاج السهل والفعال من حيث التكلفة والثبات (He *et al.*, 2019). يعد استخدام الأنزيمات في التحضيرات الغذائية عملية قديمة، ومع تقدم التكنولوجيا ، تم تطوير إنزيمات جديدة مع مجموعة واسعة من التطبيقات والخصوصية ولا يزال استكشاف مجالات التطبيق الجديدة متواصلا، حيث تدخل الأنزيمات في الوقت الحاضر في صناعات عديدة كصناعة المنظفات، الصناعات الصيدلانية و الأغذية والمنسوجات وغيرها.

تكمن الإنتاجية العالية والنوعية الجيدة لهذه الأنزيمات في استخدام السلالة الملائمة وظروف التنمية أو الإنتاج الأنسب. بما أن هذه الأنزيمات تستخدم في الصناعات المختلفة، أصبح الإنتاج الكمي الواسع لها شيئا أساسياً وجوهرياً في عالم الصناعة (Raveendran *et al.*, 2018).

يعتبر التحويل الحيوي للمخلفات الزراعية إحدى أهم العمليات التي تقوم بها الكائنات الحية الدقيقة نظرا لإيجابياتها، فمن جهة، تقلل من التلوث الذي تسببه هذه المخلفات، و من ناحية أخرى، إنتاج مواد ذات جودة عالية.

تم استخدام فطر *Aspergillus oryzae* في التخمرات التقليدية لإنتاج صلصة الصويا والميسو والدوشى لأكثر من عشرة قرون. ثم بعد ذلك تم تطوير تقنيات التخمر والمعالجة اللاحقة لـ *A. oryzae*. بالإضافة إلى ذلك ، تم إدراج *A. oryzae* على أنه "معترف به عمومًا على أنه آمن (GRAS)" من قبل إدارة الغذاء والدواء (FDA) ، وتم دعم سلامته من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO). وعليه، يستخدم *A. oryzae* أيضًا لإنتاج المستقلبات الأولية والثانوية. علاوة على ذلك ، فإن قدرته القوية على إنتاج إنزيمات مختلفة تجعله نموذجًا مثاليًا للبحث عن التعبير الجيني وإفراز البروتينات (He *et al.*, 2019).

أصبح اهتمام الباحثين بالكائنات الحية الدقيقة وتطبيقاتها، في الغذاء كمدعمات غذائية، وفي الصحة كمواد صيدلانية علاجية، وفي الصناعة كمواد تجميل ومنظفات وغيرها، متزايدا. بالإضافة إلى ذلك، اهتمام الباحثين أيضا بمشكلة الملوحة، وذلك بسبب تحول مناطق زراعية شاسعة سنويا إلى مناطق غير صالحة للزراعة. الهدف الأساسي من هذه الرسالة هو:

- دراسة الأهمية البيوتكنولوجية لسلالة جديدة لفطر *A. oryzae* المعزولة من سبخة البيضاء (منطقة حمام السخنة)، وذلك من خلال دراسة بعض النشاطيات البيولوجية للمستخلص الفطري.
- التعرف على أهم الجزيئات الحيوية.
- استخدام بعض المخلفات الزراعية مثل نخالة القمح ذات تكلفة قليلة كمصدر كربوني و نيتروجيني للفطر لإنتاج الجزيئات الحيوية والأنزيمات.
- تحديد بعض الظروف المثلى التي تزيد من الإنتاج.

الفصل I

مراجـــعة المصـــادر

1.I.جنس *Aspergillus*

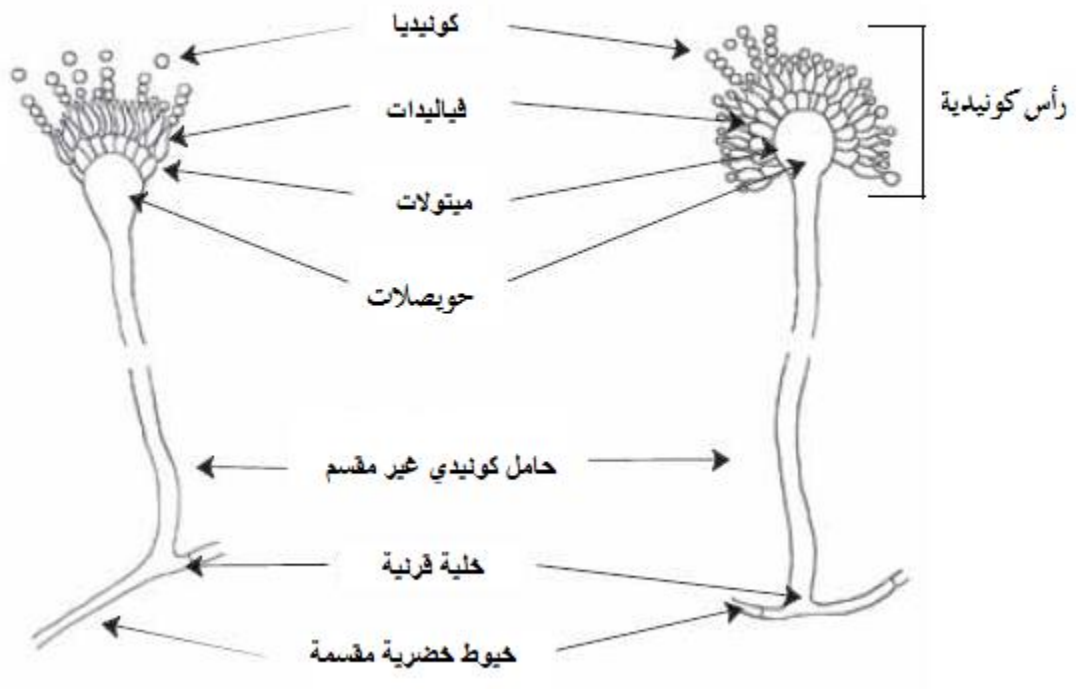
تعتبر Aspergilli مجموعة متنوعة من الفطريات الخيطية واسعة الانتشار والتي يتجاوز وجودها 200 سنة، ومن بين أكثر من 185 نوع منها لها تأثير على الإنسان صحيا واجتماعيا سواء كانت ممرضة أو ذات أهمية من حيث انتاجها لأنزيمات صناعية مثل فطريات *Aspergillus niger*، *A. oryzae*، *A. nidulans* .....إلخ (Al-Almaktri and fakih، 2019).

Aspergillus (Trichodermaceae) هو جنس من عائلة الفطريات الأسكية (Ascomycetous) التي تم عزلها من بيئات مختلفة (Hassan and Bakhiet,2017) ، مثل مختلف الأنسجة النباتية، الفطريات الداخلية (endophytes) و البيئات المائية (Monggoot *et al.*, 2018).

يعرف جنس *Aspergillus* في الحالة اللاجنسية على أنه من الفطريات الكونيدية من حيث إنتاجه لأعداد كبيرة من الأبواغ الكونيدية، التي تتميز بكونها وحيدة الخلية جافة وصغيرة الحجم، ويتم إنتاجها من جسم منتفخ يوجد في نهاية الحامل الكونيدي ويسمى بالرأس الكونيدية (اسماعيل خليل ابراهيم، 2008). ينتمي جنس *Aspergillus* إلى الفطريات الخيطية (Filamentous fungi)، وأغلب الأنواع التابعة له تكون رمية المعيشة (Saprophyt)، والبعض الأخر تكون انتهازية (Opportunistic) ممرضة للإنسان . تختلف أنواع جنس *Aspergillus* عن بعضها في الصفات المورفولوجية مثل شكل المستعمرات ولونها، لون الكونيدات والخيوط الفطرية، بالاضافة إلى الإختلاف في بعض الخصائص المجهرية مثل شكل وحجم الحويصلات (Vesicles) والفياليدات (Phialides) و الكونيدات (Conidia)، هذه الأخيرة تنتج على شكل سلاسل تنشأ من بنية مركزية بترتيب شعاعي وتظهر على شكل قالب يشبه مرشة الماء والتي تدعى باللاتينية *Aspergillum*، ومنها اشتق اسم *Aspergillus* أو الرشاشيات **(شكل1)** (ماهود السوداني ، 2015).

تصنف الكثير من الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* على أساس أن الطور الجنسي لها غير معروف مثل: *A. niger, A. fumigatus , A. flavus, A. parasiticus* و *A. oryzae* إذ أنها تمتلك تراكيب تكاثرية عقيمة مثل الأجسام الحجرية والخلايا الحاضنة (Hull cells) ، إلا ان بعضها تتكاثر جنسيا عن طريق الأبواغ الأسكية (ماهود السوداني ، 2015). يبدي جنس *Aspergillus* نموا سريعا على الأوساط الزراعية الكلاسيكية (جيلوز، مالت أو Saboraud) مضاف إليها مضادات حيوية، حيث يلاحظ بعد 48 ساعة من الحضن مستعمرات

بيضاء ذات ميسيليوم هوائي، وبعد 96 ساعة تتخذ هذه المستعمرات ألوان مميزة خاصة حسب كل نوع (أخضر، أسود، أصفر ...). ينمو فطر *Aspergillus* عموما في درجة حرارة تتراوح مابين 22 و 25 °م، إلا أن هناك بعض الأنواع محبة للحرارة مثل *A. fumigatus* الذي ينمو في درجة حرارة تتراوح مابين 37 و 40°م وأحيانا تصل إلى 57°م (Morin، 1994).



شكل 1 . أهم الخصائص المورفولوجية لفطر *Aspergillus sp.* (Tabuc, 2007) .

تستخدم بعض أنواع جنس *Aspergillus* لأغراض الصناعات الغذائية أو لإنتاج مواد أولية تستخدم في تصنيع الأغذية مثل حامض الستريك وغيرها من الأحماض العضوية الأخرى (اسماعيل خليل ابراهيم ، 2008)، إلا أن غالبية أنواع هذا الجنس هي من الأعفان الرمية، ومع ذلك فإن البعض منها مسبب للعديد من الأمراض للحيوان ، الإنسان والنبات. تعد الإصابة بالأنواع المختلفة لفطر *Aspergillus* من أكثر الإصابات الفطرية شيوعا والأكثر انتشارا، حيث تحدث الإصابة بها نتيجة لاستنشاق الأبواغ والتي تتمكن من الوصول إلى

الحويصلات الرئوية بأضعف تيار هوائي نتيجة لحجمها الصغير مؤدية بذلك إلى الإصابة بمرض الرشاشيات الرئوي plumonary aspergillosis (عبيد جاسم و فلاح عزيز، 2015). بالإضافة إلى ذلك، فالعديد منها لها القدرة على إنتاج المركبات السمية والتي تسمى بالسموم الفطرية mycotoxins مثل : aflatoxins, ochratoxins, gliotoxins, funagillin, helvolic acid (fumigacine), fumitermogin A و asphemolysine وغيرها (Al-Fakih and Almaqtri, 2019).

من جهة أخرى يقوم الباحثون بتطبيق واسع لجنس *Aspergillus* في العديد من المجالات الطبية والصيدلانية والتجميلية، وذلك لأنه مصدر للعديد من المستقلبات الثانوية ذات الأهمية البيوتكنولوجية (Li *et al.*, 2005)، مثل: (3-ميثيل بوتيل) -بيتيرولاكتون والذي يملك نشاطية مضادة للفطريات كذلك أسبيرجيليبيتيد و أستيلوتوكسين المضادة للفيروسات (Ma *et al.*, 2017 Y) ، بالإضافة إلى مركبات ذات نشاطية مضادة للأكسدة مثل: 2- هيدروكسي سيركيمات و إيزو اسبيلفينون E و اسبيلفينون E المضادات لداء السكري (Derui *et al.*, 2015)، مضادات السرطان مثل [4-(2- ميثوكسي فينيل)-1-بيبرازينيل] و (1- ميثيل1-4- اندول-3-يل) (He *et al.*, 2012) . إضافة إلى الأنزيمات مثل: الليباز، الفا أميلاز، البروتياز، وكذلك البروبيوتيك والمواد المخفضة للكولستيرول (statins) (Al-Fakih and Almaqtri، 2019).

I.1.1. فطر *Aspergillus oryzae*

I.1.1.1. التصنيف

يصنف نوع *Aspergillus oryzae* حسب Webster و Weber (2007) .

المملكة:	**Eucomycota**
الشعبة:	**Ascomycota**
الصف:	**Plectomycetes**
الرتبة:	**Eurotiales**
العائلة:	**Trichocomaceae**
الجنس:	***Aspergillus***
النوع:	***A.oryzae***

ينتمي فطر *A. oryzae* إلى مجموعة *A. flavus* وهو من الفطريات الخيطية الهوائية حيث يبدي في بداية نموه مستعمرات بيضاء اللون ثم تميل إلى اللون الأصفر المخضر، تكاثره الجنسي غير معروف ، إلا أن الأبواغ اللاجنسية (الكونيديا) تتشكل بسهولة في الهواء بقطر7 ميكرومتر. درجة الحرارة المثالية لنموه ما بين 26-36°م (Barbesgaard، 1992).

1.1.1 الأهمية البيوتكنولوجية لفطر *A.oryzae*

لأكثر من 2000 سنة استعمل فطر *A. oryzae* في إنتاج koji وهو مركب يحضر لانتاج صلصة الصويا في أوربا و أسيا، بالإضافة إلى ذلك فإن كلا من الفطر وإنزيماته يمكن استعمالها كمركبات غذائية باعتباره فطر غير ممرض (G RA S) من طرف منظمة الصحة العالمية و منظمة الأغذية والزراعة (WHO/ FAO). ونظرا لأمنه كذلك فهو يستعمل لإنتاج العديد من المستقلبات الأولية والثانوية ذات أهمية (He *et al.*, 2019). على مطلع القرن العشرين، استعمل *A.oryzae* لأول مرة كمصدر لإنزيم α-amylase، أول إنزيم منتج على السلم الصناعي من أجل الاستعمال الغذائي، و منذ ذلك الحين أصبح يستعمل في إنتاج العديد من الأنزيمات الأصلية و المصنعة (Heterologous enzymes) للإنتاج الغذائي. إلى حد الآن لم يعرف بأن *A.oryzae* ممرض، إلا أن بعض عزلاته قد تكون قادرة على إنتاج كميات ضئيلة من المستقلبات الثانوية ذات سمية منخفضة إلى متوسطة مثل:

3- β - nitro propionic acid ، Kojic acid و Cyclopiazonic acid، و يمكن التحكم في إنتاج هذه المركبات و الحد منها عن طريق استعمال ظروف مناسبة (Olempska، 2006). بالرغم من كون *A. oryzae* و *A. flavus* ينتميان لنفس المجموعة *Flavi* و تحت الجنس *Circumdati*، فإن *A. oryzae* يختلف عن *A. flavus* من

حيث عدم إنتاجه لسموم Aflatoxines. إلا أن الدراسات الحديثة أظهرت أن بعض عزلات هذا الفطر تملك مورثات بنيوية و تنظيمية تدخل في تصنيع Aflatoxines، إلا أن ذلك يتم تحت ظروف تحفيزية (Machida *et al.*,2005؛ Olempska ، 2006).

ترجع هذه المميزات إلى الطاقم الجيني للفطر، الذي وجد بأنه أكبر من الطاقم الجيني لكل من *A. fumigatus* و *A. nidulans* بحوالي 34% و 29 % على الترتيب. وهو يحتوي على تتابعات خاصة غنية بالمورثات المسؤولة عن الاستقلاب ، وخاصة التي تدخل في بناء المستقلبات الثانوية (أنزيمات الإماهة ، استقلاب الأحماض الأمينية و نواقل الأحماض الأمينية / سكريات) (Machida *et al.*, 2005). حديثا يستعمل *A.oryzae* كحامل (عائل) للتعبير الجيني لإنتاج البروتينات المعدلة وراثيا (Recombinant proteines) (Lui *et al.,* 2009) ، إذ تسمح هذه الآليات الجزيئية بتطوير استعمال فطر *A.oryzae* في إنتاج إنزيمات تجارية (Kitamoto *et al.,* 2005). كما أن التقدم الأخير في تكنولوجيا تسلسل الجيل التالي عزز البحث في الجينوم الوظيفي للفطر وهو مايساعد على التحسين الوراثي للسلالات التي تلعب دورا في عمليات التخمر (He *et al.*, 2019).

بالإضافة إلى ذلك يتميز *A.oryzae* بخصائص بيولوجية أساسية كالنمو الخيطي، وتشابك الميسيليوم، و البنيات التكاثرية اللاجنسية ، وتعدد الخلايا و التي لم تدرس في الفطريات وحيدة الخلية مثل : *Saccharomyces cerevisiae* (Kitamoto *et al.*, 2005) . تعتبر أنزيمات Cutinase مسؤولة عن إماهة و تحليل الحشوة الدهنية متعددة الأستر في النباتات (Cutin lipid polyester matrix)، و بالتالي يمكن استغلالها في إماهة الجزيئات متعددة الأستر الصغيرة مثل المواد البلاستيكية. وقد تم استخلاص هذه الأنزيمات من فطر *A.oryzae*، وأثبتت قدرتها على تحمل الدرجات العالية للحرارة التي تصل إلى 59°م مقارنة مع نفس الأنزيم المستخلص من فطر

Fusarium solani و التي كانت 56°م (Lui *et al.*, 2009).كما يستعمل كعامل بروبيوتيك في تغذية الدواجن (Lee *et al.*, 2006).

و من جهة أخرى فإن لفطر *A.oryzae* أهمية طبية و صيدلانية كبيرة ، نظرا لقدرته على انتاج مواد مضادة للفطريات مثل : Asperfuran و Oryzachlorin بالإضافة إلى Penicilline . هذه المميزات تدعم فكرة أن فطر *A. oryzae* هو الكائن الحي الدقيق المناسب لعمليات التخمر و الاستعمال في البيوتكنولوجيا الحديثة (Junichiro *et al.*, 2010).

2.I.الجزيئات الحيوية

تؤثر الجزيئات الحيوية ذات المصدر الطبيعي على حياة الإنسان، وخاصة في المجالين الصيدلاني والبيوتكنولوجي بصفة عامة (Vinale and Nicoletti، 2018) .

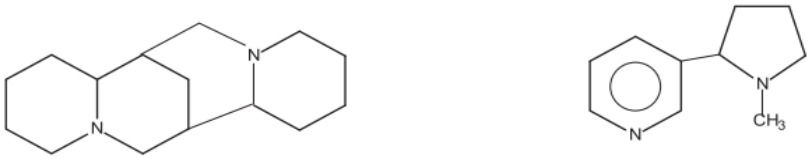
الجزيئات الحيوية النشطة هي عبارة عن مواد من أصل حيوي وهي تختلف وتتنوع حيث نجد: البكتيريوسينات (Bacteriocines)، بيبتيدات NRPS ، المضادات الحيوية...إلخ. وهي تختلف من نوع لأخر حسب طريقة تصنيعها ونشاطيتها (Essodolom، 2016). من جهة أخرى تعرف الجزيئات الحيوية النشطة حسب Guo *et al.* (2008) على أنها مواد عضوية طبيعية ذات أوزان جزيئية منخفضة، هذه المركبات تنتج من طرف كائنات حية ولها نشاطية مضادة لكائنات حية دقيقة عند تراكيز منخفضة.

يمكن تقسيم جميع مركبات النظام البيولوجي إلى مجموعتين كبيرتين: الاولى هي المستقلبات الأولية وهي عبارة عن مواد كيميائية تهدف إلى النمو والتطور مثل الكربوهيدرات والبروتينات والدهون، أما المجموعة الثانية فهي تشمل المستقلبات الثانوية والتي يتم انتاجها غالبا في مرحلة متأخرة من النمو، وليس لها أي وظيفة في النمو ،

ومن بين هاته المستقلبات بعض المواد التي تؤثر على الأنظمة الحيوية لكائنات حية أخرى وعليه جاءت تسمية هذه المركبات بالجزيئات الحيوية النشطة (Bioactive molecules) (Azmir *et al.*, 2013).

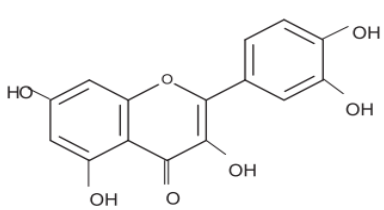
I.1.2. تصنيف و إنتاج الجزيئات الحيوية

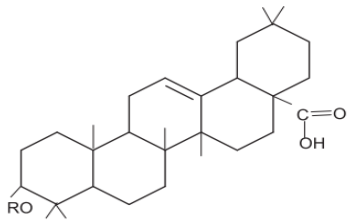
أظهرت العديد من الأبحاث أن الفطريات والبكتيريا وكذلك النباتات والبكتيريا الداخلية الخيطية للنباتات، بإمكانها أن تشكل مصدر لمختلف المركبات الطبيعية التي لها نشاطيات بيولوجية مختلفة: مضادة للميكروبات، للسرطان، للإلتهاب بالإضافة إلى مضادات للأكسدة (Zhao *et al.*, 2011). وعلى وجه العموم ومن خلال الأبحاث فقد وجد أن هذه المركبات تنتمي غالبا إلى التربنويدات (Terpenoids)، السترويدات (Steroids) ،كينونات (Quinones) ، الفينولات (Phenols) ، البيبتيدات (Peptides) ، المركبات الأليفاتية ، القلويدات (Alkaloids) ، Anthraquinones، Arylcoumarins، Ansamycins، Coumarins، Macrotetrolide، Macrolides، الفلافينويدات (Flavonoides) (Qin *et al.*, 2011 ; Azmir *et al.*, 2013) (شكل2).



القلويدات (alkaloids)

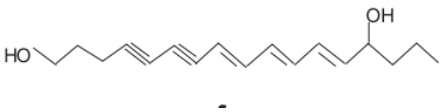
تربينات أحادية (monoterpenes) سيسكتيربينات (sesqueterpenes)

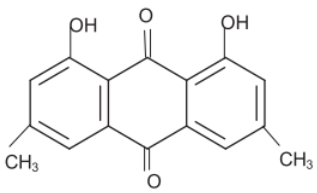




(triterpenes, saponins, steroid)

فلافونويدات (Flavonoid) تربينات ثلاثية، سابونينات، ستيرويدات





متعدد الأسيتيلان (polyacetylenes) متعدد السيتيدات (Polyketides)

شكل 2. التركيبات الكيميائية العامة لمختلف المجموعات التي تنتمي إليها الجزيئات الحيوية (Azmir *et al.*, 2013).

لا يزال تصنيف الجزيئات الحيوية النشطة في مجموعات مختلفة غير متناسق، بل يعتمد على تحديد تصنيف خاص مثلا: التصنيف حسب البناء الحيوي (Biosynthetic class) ، والذي يتم من خلاله وصف المسارات الحيوية، حيث هناك أربع مسارات أساسية لبناء الجزيئات الحيوية النشطة :

1- مسار حمض الشيكيميك Shikimic acid

2- مسار حمض المالونيك Malonic acid

3- مسار حمض الميفالونيك Mevalonic acid

4- مسار MEP أو مسار غير الميفالونات (non-mevalonate pathway)

فعلى سبيل المثال يتم إنتاج القلويدات عن طريق الأحماض الأمينية العطرية و الأليفاتية الناتجة من مسار حمض الشيكيميك. في حين تنتج المركبات الفينولية عبر مساري حمض الشيكيميك وحمض المالونيك. بينما يتم انتاج المركبات التربينية من مسار حمض الميفالويك (Azmir *et al.*, 2013).

I.2.1.مصادر الجزيئات الحيوية

تمت دراسة الجزيئات الحيوية مباشرة في الأنسجة الطبيعية المختلفة مثل : النباتات، الطحالب، الطحالب الدقيقة، البكتيريا والفطريات، وفي هذا الصدد أجريت العديد من الدراسات العلمية على هذه المركبات ومصادرها (Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013).

I.2.2.1 . الأنسجـــة النباتيــة

يعتمد البناء الحيوي للجزيئات الحيوية ذات أصل نباتي على فيسيولوجية ومرحلة نمو هذا النبات، وعليه يمكن تقسيم الجزيئات الحيوية النباتية إلى خمس مجموعات: البوليستيدات (Polyktides)، إيزوبرينويدات (Isoprenoides) ، القلويدات (Alkaloides)، Phenylpropanoides و Flavonoides. تستعمل هذه الجزيئات بشكل واسع في إنتاج المواد الصيدلانية، كما اقترح استعمالها كمضافات غذائية لزيادة القيمة الغذائية للأطعمة (Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013).

I.2.2.2. الطحالب والطحالب الدقيقة

تعتبر الطحالب مصدرا طبيعيا مثيرا للإهتمام لمركبات جديدة التي لها نشاطيات مضادة للأكسدة، ومضادة للميكروبات والفيروسات. تعيش هذه الكائنات في ظروف بيئية قاسية وعليها أن تتأقلم بشكل سريع، لذلك فهي تقوم بإنتاج مستقلبات ثانوية مختلفة ذات نشاطية بيولوجية تساهم في أليات الدفاع الطبيعي (Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013) .

تفرز الطحالب الدقيقة مجموعة واسعة من المركبات التي تستعمل كمركبات وظيفية بما في ذلك بعض الأصباغ المضادة للأكسدة مثل: Carotenoîdes ، Polyphenols، Flavonoids، Quercetin، Catechin ، Tiliroside و مشتقات الأحماض والبيبتيدات الثنائية (Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013). ومع ذلك ليس فقط وجود مركبات نشطة بيولوجيا يجعل الطحالب محط اهتمام الكثير من الباحثين، حيث تتميز كذلك بتنوعها الكبير وإمكانية نموها تحت ظروف بيئية مختلفة، ما يؤدي إلى إثراء وإنتاج مجموعة محددة من الجزيئات

الحيوية التي يمكن أن تكون مفيدة كجزء من الأدوية الجديدة أو المكملات الغذائية في الصناعات الصيدلانية والغذائية على الترتيب (Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013).

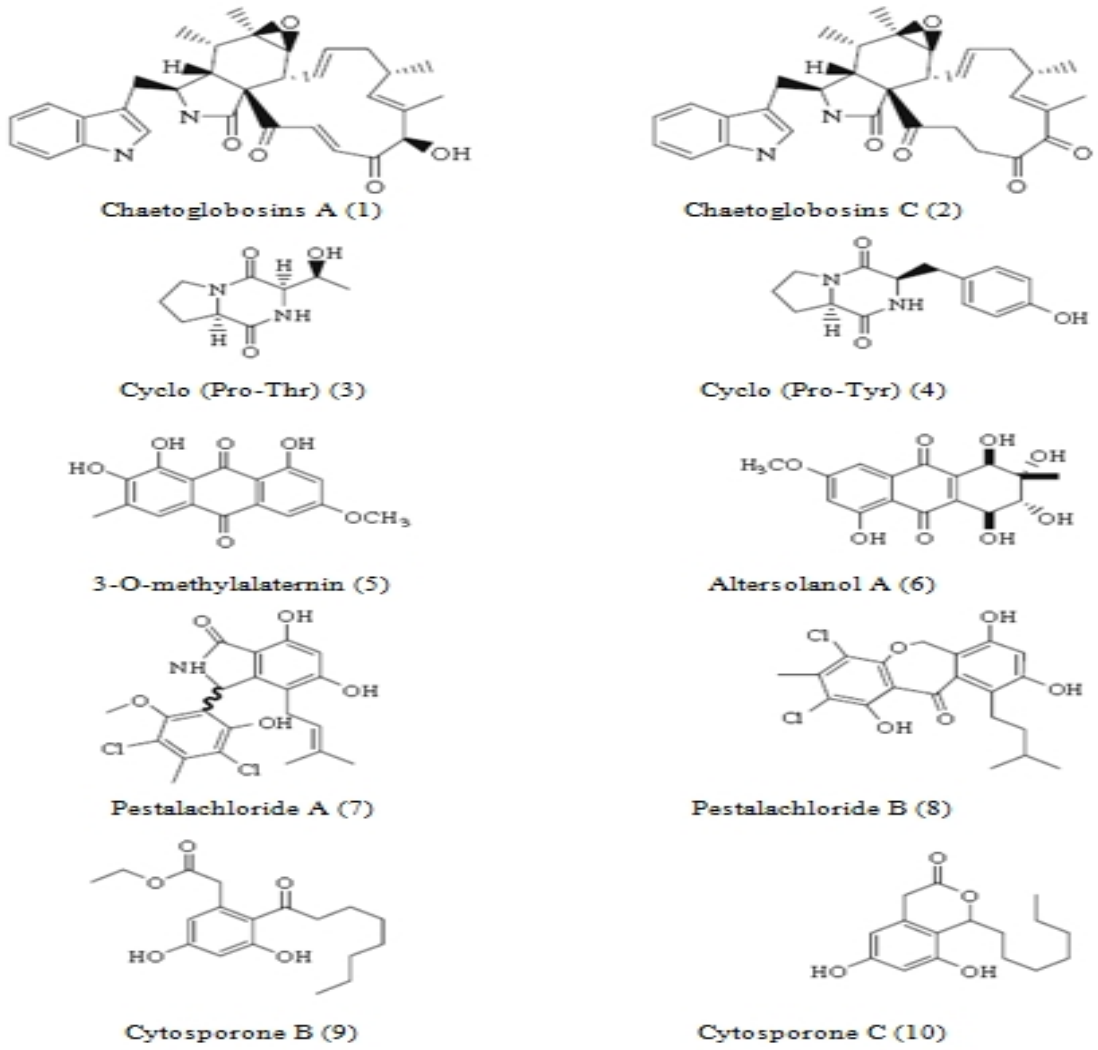
I.3.2.2. الكائنات الحية الدقيقة (الفطريات)

استعملت الكائنات الحية الدقيقة كمصدر لإنتاج الجزيئات الحيوية المختلفة، وهذا يشمل البكتيريا، البكتيريا الخيطية الداخلية و الفطريات (Kaur *et al.*, 2015)، وقد تم تعريف حوالي 23000 نوع من الجزيئات الحيوية الميكروبية الأصل والتي تم عزلها من مجموعات جد قليلة من الكائنات الحية الدقيقة (Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013) . يمكن استعمال هذه المركبات في الأغذية كمكملات غذائية، معززات للنكهات، مواد نسيجية، مواد حافظة، معدلات للحموضة ومثخنات. من أهم الجزيئات الحيوية المعزولة من البكتيريا : Isoprenoids مثل Carotenoids (β-carotene و lycopene) و Phenylpropanoids مثل مشتقات Stilbene (Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013).

يرجع الإستعمال الواسع للكائنات الحية الدقيقة في انتاج الجزيئات الحيوية النشطة مقارنة مع النباتات و الحيوانات إلى بساطة الحصول على إنتاج عالي بالإضافة إلى إمكانية المعالجة البيئية والجينية. وعلاوة على ذلك تعد الكائنات الحية الدقيقة مصدرا ممتازا لإنتاج العديد من المركبات المهمة التي يتم انتاجها فقط بكميات ضئيلة. (Joana Gil-Chávez *et al.*, 2013).

تعتبر الفطريات مصدرا تاريخيا مهما للمستقلبات الثانوية (Alvi and Baker، 2004) ، حيث أنها توفر مصدرا غنيا للمركبات ذات التطبيقات العلاجية بما في ذلك المضادات الحيوية والمضادات الفطرية والفيروسية. وجد أن العديد من الفطريات و/أو مستخلصاتها يتم استغلالها أيضا في إنتاج الأنزيمات والاحماض العضوية (Kaur *et*

al., 2015) . تم الحصول على عدة مضادات حيوية من الفطريات الداخلية للنباتات من بينها Cyclo (Pro- Thr) و Cyclo (Pro-Tyr) وهما نوعان جديدان من المضادات الحيوية البيبتيدية لهما نشاطية ضد بكتيرية (Cui *et al.*, 2008). كما أظهرت مجموعة من الأحماض الفينولية المتحصل عليها من الفطر الداخلي *Phoma sp.* نشاطية مضادة للبكتيريا موجبة الغرام (Hoffman *et al.*, 2008) . بالإضافة إلى كل من المركبين Altersolanol A و3-O-methylalaternin المنتجين من طرف الفطر الداخلي *Ampelomyces sp.* و اللذين أظهرا نشاطية مضادة للبكتيريا موجبة الغرام (Aly *et al* ., 2008). كما تم عزل نوعين من مضادات الفطريات تنتمي إلى عائلة Alkaloids، Chaetoglobsins A و Chaetoglobsins C من الفطر *Chaetomium globsum* (Qin *et al.*, 2011)، بالإضافة إلى بعض المضادات الحيوية التي تنتمي إلى المركبات الأليفاتية مثل: Cytosporone B و Cytosporone C المعزولة من الفطر *Phompsis sp.* (Li *et al.*, 2008) (**شكل 3**).



شكل 3 . بنية بعض المركبات الطبيعية المعزولة من الفطريات ذات النشاط الضد ميكروبي (Li *et al.*, 2008).

من جهة أخرى وفي ظل ظروف بيئية ملائمة من درجة الحرارة، الرطوبة، الأس الهيدروجيني وتركيب المادة ، يمكن للفطريات الخيطية إنتاج مستقلبات ثانوية سامة تسمى Mycotoxins. من بين المئات وأكثر السموم

الفطرية التي تم تعريفها هناك حوالي 30 نوع لها تأثير مهم على صحة الإنسان و الحيوان بسبب سميتها (Bennet وKlich ، 2003). تنتج هذه السموم خاصة من طرف السلالات التي تنتمي إلى الأجناس : *Aspergillus*، *Penicillium* و *Fusarium* (Tabuc, 2007). بعض المستقلبات الثانوية التي تنتجها بعض أنواع جنس *Aspergillus* عرفت باسم سموم Aflatoxins، وهي تعد من المركبات شديدة الخطورة بالنسبة لصحة الإنسان و الحيوان (Belhattab and Larous, 2008). ولقد حضت باهتمام الكثير من الباحثين منذ اكتشافها في أواخر عقد الستينات من القرن العشرين إلى يومنا هذا، مقارنة بالسموم الفطرية الاخرى . وإلى جانب ذلك فقد عملت هذه السموم على تقديم أداة فعالة بيد الباحثين لغرض دراسة الأمراض السرطانية نظرا لقدرتها على إحداث الأورام السرطانية عند دخولها إلى الجسم الحي (Almaktri and Al-fakih ,2019).

تملك العديد من أنواع *Aspergillus* القدرة على إنتاج العديد من المركبات ذات الاهمية الصناعية والصيدلانية من بينها: مشتقات البوتينوليد كعوامل مضادة للإلتهاب، Aurasperon H كمضادات سرطانية، Asperchondols A, B كمضادات بكتيرية (Lui *et al.*, 2017) ، Aspergivons A,B المضادة للسرطان والبكتيريا (Ma *et al.*, 2017 X)، بالإضافة إلى مضادات الميكروبات Aspochalasin B , D ومركب CJ-17.665 المعزول من فطر *Aspergillus ochraceus* والذي أبدى نشاطية مضادة للبكتيريا المقاومة *Staphylococcus aureus* (Almaktri and Al-fakih, 2019). بالإضافة إلى مضادات الفطريات – 3ˆ(3-methylbutyl)butyrolactone II، مضادات الفيروسات مثل: Aspergillipeptids و Asteltoxins (Ma *et al.*, 2017 X)، بالإضافة إلى مضادات الاكسدة 2- hydroxycircumdatic ومضاد السكري Isoaspulvinone E كلها مستمدة من *Aspergillus* (Almaktri and Al-fakih, 2019).

I.3 . الأنزيمات الميكروبية في التطبيقات البيوتكنولوجية

البيوتكنولوجيا هي أي تطبيق تقني يستعمل فيه الأنظمة الحيوية، سواء كانت خلايا الكائنات الحية، أو مشتقاتها مثل بعض المنتجات الخلوية كالبروتينات، والأنزيمات والأحماض العضوية و الفيتامينات...إلخ، في عمليات التصنيع لإنتاج العديد من المنتجات الحيوية أو تعديلها، والتي تكون في النهاية ذات فائدة للإنسان (Naz, 2015).

I.3.1. تعريـــــف وخصـــائـــص عامـــــة

الأنزيمات هي عبارة عن محفزات بيولوجية تسرع التفاعلات الكيميائية الحيوية ، و يمكن استخلاصها من الخلايا الحية واستخدامها لتحفيز مجموعة واسعة من التفاعلات المهمة بيوتكنولوجيا. الأنزيمات هي جزيئات كبيرة (Macromolecules) من البروتينات أو الحمض النووي الريبي RNA (Ribonucleic acid) وتسمى RNA المحفزة أو Ribozyme (Bataich، 2014). بالإضافة إلى كفاءتها العالية ، الأنزيمات هي محفزات جد نوعية حيث تكون خاصة بكل نوع ومادة تفاعل وهذا راجع لما يسمى بالموقع النشط (Gramner *et al.*, 2008). تأتي الأنزيمات الصناعية من مصادر نباتية ، حيوانية أو ميكروبية، ومع ذلك يبقى استخلاصها من النباتات والحيوانات محدود نظرا لصعوبة السيطرة عليها في الواقع ، وتتمثل أهم إيجابيات الأنزيمات الميكروبية في: الإنتاج المستقل عن القيود الموسمية و الجغرافية، إمكانية استخدام المواد الخام غير باهضة الثمن، زيادة مردود الإنتاج بشكل كبير عن طريق تحسين السلالات الميكروبية وتحسين ظروف الانتاج (Scriban، 1993).

لبعض الأنزيمات الميكروبية أهمية خاصة في العديد من المجالات الصناعية، ومن المعروف أنها هي الأفضل ويتم الحصول عليها من مختلف الكائنات الحية الدقيقة ، وعلى الرغم من اكتشافها في القرن العشرين، إلا أن الدراسات حول عزلها وتحديد مميزاتها وتطبيقها في الصناعة الحيوية (Bioindustry) في تقدم مستمر. وأصبح بالفعل استخدام العديد من الأنزيمات ذات مصدر ميكروبي في العديد من العمليات الصناعية المختلفة. من بين المميزات الخاصة للأنزيمات الميكروبية قدرة نشاطها في ظروف غير طبيعية خاصة درجة الحرارة و الحموضة، وبالتالي يتم تصنيف بعض الأنزيمات الميكروبية على أنها محبة للحرارة أو محبة للحموضة أو العكس. الكائنات الحية الدقيقة التي تمتلك أنظمة أنزيمية ثابتة حراريا والتي يمكن أن تعمل في درجات حرارة أعلى من المعتاد ستقلل من إمكانية التلوث الميكروبي في التفاعلات الصناعية لفترات طويلة (Robinson، 2015).

I. 2.3. الكائنات الحية الدقيقة مصدر للأنزيمات ذات تطبيقات بيوتكنولوجية

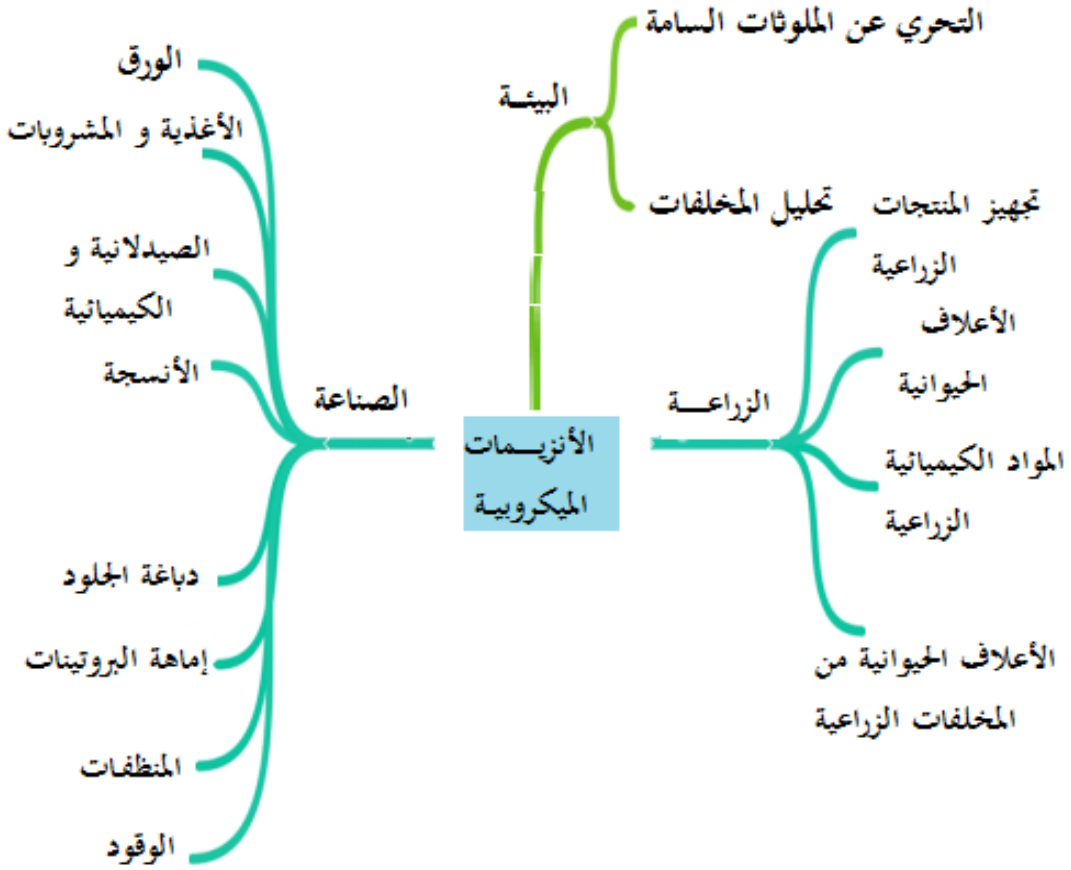
تستخدم البيوتكنولوجيا مجموعة واسعة من الأنزيمات التي يتم تصنيعها من طرف كائنات حية دقيقة تم تمييزها وتصميمها عن قصد وتحسينها لإنتاج أنزيمات ذات جودة عالية في التطبيقات الصناعية. وبالتالي تمت دراسة الأنزيمات الميكروبية لخصائصها المميزة ، ولقد سمحت تقنيات البيولوجيا الجزيئية الحديثة بتكييف الكائنات الحية الدقيقة المختارة، ليس فقط لإنتاج مردود عالي من الأنزيم ، وإنما لانتاج أنزيمات ذات خصائص مطلوبة مثلا: الثبات الحراري (Thermostability)، الاستقرار في الظروف الحمضية أو القاعدية والحفاظ على نشاطية الأنزيم تحت ظروف التفاعلات مثل وجود معادن أو مركبات أخرى (Robinson، 2015). بالإضافة إلى إمكانية زرع الكائنات الحية الدقيقة بكميات كبيرة في وقت قصير عن طريق عمليات التخمر و أيضا بسبب قابلية التلاعب بالجينات (جدول **1**) .

جدول 1. بعض الأنزيمات الصناعية ومصادرها من الكائنات الحية الدقيقة (Vittaladevaram، 2017).

المصدر	الأنزيم	الكائن الحي الدقيق
بكتيريا	Proteases Amylases Pencillinase	*Bacillus subtilis*
خمائر	Lactase Invertase	*Saccharomyces fragilis* *Saccharomyces cerevisiae*
فطريات خيطية	Proteases Amylases Catalase oxidase-Glucose Glucosidases Cellulase Dextrinase Pectinase Lipase	*Aspergillus niger* *Aspergillus oryzae* *Aspergillus niger* *Penicillium notatum* *Aspergillus flavus* *Aspergillus sp* *Penicillium sp* *Aspergillus niger* *Aspergillus niger*

I.1.2.3 . تطبيقات الأنزيمات الميكروبية

تستعمل الأنزيمات ذات مصدر ميكروبي على نطاق واسع في الصناعات مما يشمل: الجلود، الأطعمة، النسيج، مستحضرات التجميل، المنظفات والمواد الصيدلانية (شكل4 ؛ جدول 2) (Vittaladevaram، 2017).



شكل 4. تطبيـقات الأنزيمات الميكروبيـة (Vittaladevaram، 2017).

جدول 2. تطبيقات الأنزيمات الصناعــية ذات مصدر ميكروبي (Vittaladevaram، 2017).

الصناعة	الأنزيم	المصدر الميكروبي	التطبيقات
الصيدلة	Penicllin oxidase Streptokinase Collagenase Alpha-amylase Galactosidase	*Pencillium sp.* *Streptococci sp.* *Clostridium perfringens* *Bacillus sp.* *Acinetobacter*	مضاد للتخثر والأورام صناعة المضادات الحيوية
صناعة الخبز	Amylase Lipase Glucose oxidase Transglutaminase	*Bacillus sp.* *Candida lipolytica* *Penicillium purpurogenum* *Streptoverticillium sp*	تحسين نوعية الطحين زيادة طراوة العجينة و استقرارها
صناعة الألبان	Lactase Transglutaminase	*Lactobacillus sp.* *Streptoverticillium sp*	بلمرة البروتينات
صناعة المشروبات	Amylase Cellulase	*Bacillus sp.* *Clostridium sp.*	**إماهة النشاء**
صناعة الأغذية	Polygalacturonases Xylanase	*Aspergillus sp.,Bacillus sp.*	**هضم النشاء**

صناعة البوليميرات	Lipase Peroxidase	*Candida sp.* *Pseudomonas sp*	**تحضير البوليستير**
صناعة الورق	Xylanase Amlyase	*Bacillus sp*	**نقــاوة الورق وزيادة لبه**
دباغة الجلود	Proteases Lipase	*Bacillus sp.,* *Aspergillus sp.* *Candida sp*	**إزالة الشعر والنسيج المتبقي** **إزالـــة الدهـــون**
صناعة الأنسجة	Cutinase Collagenase Pectate lyase Amylase Laccase Catalase	*Pseudomonas sp.* *Clostridium histolyticum* *Bacillus sp.,* *Bacillus licheniformis* *Bacillus subtilis* *Aspergillus sp*	. إنتاج الأصبغة إنهاء صناعة الصوف والقطن

❖ إنزيم الأميلاز Amylase

أنزيمات الأميلاز هي أنزيمات محللة للنشاء، الأميلوز و الأميلوبكتين والمالتودكسترين، حيث لها القدرة على إماهة الروابط الغلوكوزيدية (1-4) α للسكريات المعقدة. تتواجد هذه الأنزيمات بشكل كبير في كل الكائنات الحية، ومعظمها هي أنزيمات معدنية حيث تحتاج إلى الكالسيوم من أجل نشاطها واستقرارها وكذلك من أجل نضجها (Raveendran *et al.*, 2018). يمكن تمييز ثلاثة أنواع من أنزيمات الأميلاز وهي :

- أميلاز (E.C. 3.2.1.1) وهي أنزيمات إماهة تشمل أكثر من 1700 أنزيم . يحفز هذا النوع من الأنزيمات تكسير الروابط (1-4) α للسكريات المعقدة وتحويلها إلى سكريات بسيطة (Martinelle، 1995).
- β- أميلاز (E.C. 3.2.1.2) تقوم هذه الأنزيمات بتحرير سكر المالتوز بالتتابع انطلاقا من النهاية غير المرجعة لجزيئة النشاء وجزيئة الأميلوبكتين، لكنه يمنع الروابط (1-6) في نقاط التفرع، وبالتالي يترك بقايا من الأميلوبكتين تسمى دكسترين ذو نهاية β (Martinelle، 1995).
- غليكوأميلاز (Glucoamylase أو Amyloglycosidase) (E.C.3.2.1.3) وهي أنزيمات محللة كليا للنشاء و الأميلوبكتين وتحويلها إلى جزيئات D–غلوكوز من أجل تشكيل سكر المالتوز. تستعمل هاته الأنزيمات تجاريا مع أنزيمات α –أميلاز من أجل إنتاج محلول شراب الدكستروز و D–غلوكوز البلوري (Martinelle، 1995).

لتوضيح الدور الهام الذي تساهم به الكائنات الحية الدقيقة في إنتاج الأنزيمات فيكفي أن نعلم أن خلية واحدة من بكتيريا تصنع داخلها حوالي 3000 نوع من البروتينات معظمها عبارة عن أنزيمات.

من أهم الكائنات الحية الدقيقة المنتجة لأنزيم الأميلاز بعض أنواع *Streptomyces*، *Bacillus subtilis*، *Klebsiella sp*، *Pseudomonas* ، *Clostridium*، *Rhizopus*، *Aspergillus*، *Monilia*، *Penicillium* و *Mucor*. إضافة إلى بعض الخمائر(Gupta *et al.*, 2003).

يمكن تمييز نوعين من أنزيمات الأميلاز : الفطرية والبكتيرية، إذ تختلف الأنزيمات الفطرية عن البكتيرية من حيث تثبيطها عن طريق درجة الحرارة ، قدرتها العالية على التسكير(saccarification) ودرجة حموضتها المثلى منخفضة (4-5) (Costes، 1982). البكتيريا المنتجة للأنزيمات عددها قليل نسبيا بالمقارنة مع الفطريات ، ومعظم البكتيريا المنتجة للأنزيمات التجارية تتبع الجنس الهوائي المكون للأبواغ وهو جنس *Bacillus* ولا يوجد من البكتيريا السالبة الغرام ماينتج الأنزيمات التجارية سوى البكتيريا *Klebsiella pneumoniae*، مما يعني ندرة الأنزيمات الخارجية في البكتيريا سالبة الغرام وزيادة تكلفتها وصعوبة الحصول عليها. أما بالنسبة للفطريات الخيطية المنتجة للأنزيمات التجارية فتشمل بشكل واسع الأجناس: *Rhizopus*، *Penicillium* و *Aspergillus*.

يستخدم أنزيم الأميلاز في صناعة الورق ، الغزل و النسيج وكذلك في صناعة الخبز، حيث يقوم بتحليل النشاء إلى سكر وبالتالي يمكن للخميرة أن تخمر الغلوكوز وتنتج كميات كبيرة من غاز CO_2 الذي يعطي الخبز الشكل الأسفنجي. كما يستعمل الأنزيم في صناعة الكحول وذلك بتحويل المواد النشوية إلى سكريات قابلة للتخمر، إضافة إلى ترويق عصير الفواكه من النشويات العالقة . كما يستعمل الأنزيم في بعض الصناعات الطبية والدوائية وإنتاج الغلوكوز الطبي. كما يستخدم الأنزيم في عمليات التنظيف الجاف بخلطه مع الأنزيمات المحللة للبروتينات في مساحيق التنظيف (Gupta *et al.*, 2003).

- **أنزيم البروتياز Protease**

تعتبر الأنزيمات المحللة للبروتينات من أنزيمات الإماهة (E.C. 3.4.2.1.2.4)، أي تقوم بتحليل البروتين إلى مواد أبسط في وجود الماء. تكون هذه الأنزيمات عموما على شكل Zymogene غير نشط (Pelmpont، 1995).

يمكن تصنيف أنزيمات البروتياز حسب درجة الأس الهيدروجيني حيث تكون النشاطية مثلى إلى: بروتياز حمضية، قاعدية و معتدلة (Kumar *et al.*, 2008)، كما يمكن أن تقسم حسب الموقع النشط إلى قسمين: أنزيمات البروتياز الداخلية endopeptidase، التي تقطع الروابط البيبتيدية داخل السلسلة، وأنزيمات البروتياز الخارجية exopeptidase التي تعمل على قطع الروابط انطلاقا من النهايات للسلسلة البيبتيدية (النهاية N أو C) (Raveendran *et al.*, 2018).

لأنزيمات البروتياز أهمية كبيرة في المجال الصناعي وهي تنتج من طرف العديد من الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا بما فيها: *B. subtilis*، *Serratia*، *Clostridium sporogenes*، *Bacillus niegaterium* ، وكذلك بعض الفطريات مثل: *Aspergillus*، *Mucor* و *Penicillium* (Sandhya *et al.*, 2005a). ومن أهم استعمالات الأنزيم في المجال الصناعي : صناعة المنظفات و الغراء، صناعة ودبغ الجلود لإزالة الصوف والشعر منها وتحسين جودتها، صناعة الحرير، صناعة بعض المستحضرات الطبية مثل إنتاج زيت كبد السمك ومراهم الحروق، تطرية اللحوم مما يزيد القدرة على هضمها وتقليل مدة الطهي، ترويق بعض المشروبات التي تتكون بها عكارة أثناء التخزين، بالإضافة إلى أن إضافة الأنزيم إلى العلف الحيواني يزيد من كفاءته الهضمية ، بالإضافة إلى استعماله في الصناعات الغذائية مثل صناعة الأجبان من خلال تحسين نكهتها وتسريع نضجها، تخمر اللحوم وترطيبها، تخثر الحليب وأيضا كمساعد للجهاز الهضمي. بالإضافة إلى استخدامها في تحسين نكهة البروتينات الغذائية وقيمتها وقابليتها للهضم، وكذلك تعديل خصائصها الوظيفية بما في ذلك التخثر والإستحلاب (Emulsification). كما تستخدم هذه الأنزيمات في صناعة الخبز من خلال تقليل مدة الخلط

وتوحيد العجين وتحسين الملمس والنكهة . كما تم استخدام البروتياز الحمضي المنتج من طرف *Aspergillus usamii* في تحسين الخصائص الوظيفية لغلوتين القمح . (Raveendran *et al.*, 2018).

❖ أنزيم الليباز Lipase

الليباز هي أنزيمات تحفز تحليل الدهون الثلاثية طويلة السلسلة إلى غليسيرول وأحماض دهنية حرة، وعلى عكس الاستيراز (Esterase) فإن أنزيم الليباز تكون نشطة فقط في حالة إدمصاصها على سطح ماء-زيت (Martinelle, 1995)، فهي موجودة بشكل طبيعي في المعدة والبنكرياس عند البشر والحيوانات من أجل هضم الدهون. كما تتواجد هاته الأنزيمات عند الكائنات الحية الدقيقة حيث تساهم تقريبا بنسبة 90% من السوق العالمية لإنتاج الليباز. (Raveendran *et al.*, 2018)، وتعتبر الفطريات من المصادر المفضلة في إنتاج الليباز لأن الأنزيمات الفطرية تفرز عموما خارج الخلية مما يسهل استخلاصها من وسط التخمر. من بين الفطريات الخيطية المستعملة بشكل واسع كمصادر لهذا الأنزيم جنس *Rhizopus*، *Mucor*، *Aspergillus*، *Penicillium*، *Fusarium* وخميرة *Geotricum geotrichum*، أما بالنسبة للبكتيريا فتعتبر الأجناس: *Bacillus* و *Staphylococcus genera* بالإضافة إلى جنس *Pseudomonas* من أهم البكتيريا المستعملة في إنتاج الليباز . وفي الواقع فإن إنزيمات الليباز الميكروبية لها مزايا، حيث أن عملية تصنيعها بسيطة مقارنة مع إنزيمات الليباز من أصل حيواني، ومن ناحية أخرى تتمتع بثبات عال من حيث درجة الحرارة (Fickers، 2008). يجد هذا الأنزيم تطبيقا واسعا في العديد من الصناعات بما في ذلك الوقود الحيوي والمنظفات والأعلاف الحيوانية، كما أنه يستخدم في معالجة الجلود والنسيج والورق (Raveendran *et al.*, 2018)، بالإضافة إلى صناعة المواد الغذائية والمشروبات، كما تجد الليباز تطبيقا رئيسيا في صناعات الألبان والخبز، حيث يمكنها تحسين النكهة

المميزة للجبن من خلال العمل على دهون الحليب لإنتاج أحماض دهنية حرة (Jooyendeh *et al.*, 2009) ، وبالتالي صنع أنواع مختلفة من الاجبان من مصادر مختلفة، على سبيل المثال: جبن رومانو وجبن الكومومبير باستخدام الليباز من أصل *Penicillium camemberti* وجبن الشيدار باستخدام *A. niger* أو *A. oryzae*.

تستخدم الليباز أيضا كعوامل لتحسين النكهة في الزبدة و السمن، وأيضا لإطالة المدة الإفتراضية لمختلف منتجات الخبز. بالإضافة إلى ذلك فقد تم تقدير الفينولات الوظيفية لتركيب مضادات الأكسدة الدهنية من أجل تطبيقاتها في صناعة زيت عباد الشمس باستخدام الليباز المنتج من طرف *Candida antarctica* و *Pseudomonas sp*، *Helvina lauginosa* و *Geotrichum candidum*. كما استخدم الليباز المثبت بنجاح لتحديد المبيدات الفوسفورية العضوية، ويمكن أيضا استخدامها في معالجة النفايات المختلفة التي يتم طرحها وإفرازها من الصناعات الغذائية (Raveendran *et al.*, 2018).

I.4. طـــرق التخــمر

التخمر هو عملية استخلاص الطاقة من تفاعلات الأكسدة- الاختزال للمركبات الكيميائية، والتي منها الكربوهيدرات، وباستخدام مستقبل إلكتروني ذاتي، والذي غالباً ما يكون مركب عضوي وذلك في الظروف اللاهوائية. تؤثر طبيعة التخمر سواء كانت صلبة أو سائلة على عدة جوانب من نمو الكائنات الحية الدقيقة وكذلك على إنتاج المواد ذات الأهمية (Sumantha et al., 2005).

1.4.I. التخمر في وسط سائل

يمكن اعتبار التخمر في وسط سائل (SmF) ، عملية لنمو الكائنات الحية الدقيقة في وسط سائل، والذي تكون فيه المغذيات مذابة، وقد استعمل هذا النوع من التخمر عادة في الإنتاج الصناعي للأنزيمات، لسهولة التحكم في ظروف وعوامل العملية مثل الأس الهيدروجيني، درجة الحرارة والتهوئة و الأكسجين الذائب وكذلك الرطوبة (Modhafar، 1998). عموما ما يكون هذا النوع من التخمرات سهلا في العمل بطريقة معقمة مقارنة مع التخمر الصلب، ويمكن تطبيقه بسهولة أكبر على المستوى الصناعي. إلا أن لهذه العملية عيوب من بينها ارتفاع تكاليف أوساط الزرع، خطر حدوث تلوث، طرح كمية كبيرة من النفايات السائلة، والتي يجب معالجتها (Singhania *et al.*, 2009).

2.4.I. التخمر في وسط صلب

يعرف التخمر في وسط صلب، (SSF)، عموما بنمو الكائنات الحية الدقيقة على الجزيئات الصلبة والرطبة في الغياب التام أو شبه التام للماء الحر، وهذه الحالة تضمن للكائنات الحية الدقيقة وخاصة الفطريات الخيطية وسط مماثل لبيئتها الطبيعية. بطريقة مبسطة، تنمو الكائنات الحية الدقيقة في نظام ثلاثي الأطوار: مادة صلبة، طور سائل مرتبط بها ومرحلة غازية محصورة في الجزيئات أو بينهما (Pandey *et al.*, 2000). يمكن أن تكون المادة الصلبة هي مصدر المغذيات و /أو كدعامة مشربة بالمغذيات المناسبة مما يسمح بنمو الكائنات الحية الدقيقة وإنتاج المستقلبات المرغوبة (Singhania *et al.*, 2009).

1.2.4.I. إيجابيات وسلبيات التخمر في وسط صلب

يستخدم الإنتاج الصناعي للأنزيمات والمستقلبات الأخرى كلا من عمليات التخمر السائلة والصلبة، ويعتمد قرار اختيار العملية الانسب على تكلفتها وكفاءتها . لذلك من المهم معرفة مزايا وعيوب تخمر الحالة الصلبة مقارنة مع الحالة السائلة وتشمل هذه المزايا:

- بساطة التقنية وانخفاض التكلفة، لأنها لا تتطلب معدات متطورة للتحكم الدائم في العوامل البيئية.
- غياب الماء الحر يسمح بانخفاض كبير في حجم المخمرات وتكاليف الطاقة اللازمة للتعقيم.
- التقليل من التلوث البكتيري الذي يتطلب مستويات عالية من الرطوبة للنمو.
- انخفاض التكاليف و الوقت المستهلك خلال عمليات الاستخلاص واسترجاع المنتجات.
- مردود أكبر وتهوئة أحسن.

إلا أن لهذا النوع من التخمرات سلبيات كذلك يمكن تلخيصها فيما يلي:

- صعوبة السيطرة على نسبة رطوبة المادة.
- تحتاج عناصر المخمر مثل الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة و الأكسجين المذاب إلى تحكم دقيق.
- التحريك المستمر للوسط يتلف الميسيليوم الفطري في كثير من الأحيان، مما يؤخر نموه وبالتالي نمو ضعيف للكائن الحي الدقيق (Aguilar *et al.,* 2008).

تؤثر العديد من العوامل على نمو ونشاط الكائنات الحية الدقيقة أثناء عملية التخمر في الحالة الصلبة، من بينها حجم الجزيئات والرطوبة والنشاط المائي التى تعد الأكثر أهمية. يعتمد اختيار المادة الركيزة على العديد من المعايير البيولوجية و الإقتصادية (التكلفة والوفرة)، وعليه توجه الاهتمام إلى المخلفات الزراعية بسبب

مزاياها خاصة بالنسبة للفطريات الخيطية التي يمكنها اختراق بنيتها الصلبة على عكس البكتيريا والخمائر التي تتميز بنمو سطحي (Singh and Pandey, 2009).

في الأونة الأخيرة شهد العالم الصناعي إعادة استعمال النفايات الناتجة عن الأنشطة الزراعية والصناعات الغذائية الزراعية. حيث تنقسم المخلفات الزراعية والصناعية المستخدمة في التخمر إلى ثلاث فئات: النشا (الكسافا، نخالة القمح، نخالة الأرز، بذور الحنطة السوداء، دقيق الذرة ودقيق الموز...)، الركائز السيليلوزية (قش القمح، الذرة، قصب الأرز، لب البنجر والخشب...) وتلك التي تحتوي على سكر قابل للذوبان (العنب، الذرة الرفيعة، نفايات الأناناس، قرون الخروب، لب القهوة وغيرها...) (Graminha *et al.*, 2008). أما بالنسبة للكائنات الحية الدقيقة المستعملة في هذا النوع من التخمرات فتشمل عموما الفطريات الخيطية مثل: *Aspergillus*، *Rhizopus*، *Alternaria*، *Fusarium* ، *Manilia*، *Mucor*، *Trichoderma* وبعض أنواع *Penicillium* (Manpreet *et al.*, 2005).

I.4.2.2. تطبيقات التخمر على وسط صلب

بصفة عامة تتعلق تطبيقات التخمر على وسط صلب بالتغذية البشرية والسماد والتصفية الحيوية للغازات ذات الرائحة الكريهة، وإنتاج الأطعمة الغنية بالبروتينات لتغذية الحيوانات، وكذلك إنتاج الأنزيمات والمستقلبات الحيوية الخاصة. يلخص الجدول 3 أهم التطبيقات الصناعية للتخمر في الحالة الصلبة (Singh and Pandey, 2009).

جدول 3. التطبيقات الصناعية للتخمر في الحالة الصلبة (SSF) (Singh and Pandey, 2009).

مجـــــال التطبيـــــق	الكائنات الحية الدقيقة المستعملة	المادة المستعملة في تخمر الحالة الصلبة (SSF)
الصنـاعة الصيدلانيـــــة		
مبيدات حشرية	*Bacillus thuringensis*	مخلفات الجوز الهندي
المضادات الحيوية		
البنيسيلين	*Penicillium chrysogenum*	القصب السكري.
سيفالوبيورين	*Cephalosporium armonium*	الشعير.
سيفاميسين C	*Streptomyces clamuligerus*	القمح مع بذور القطن.
تتراسيكلين	*S.viridifaciers*	بقايا البطاطا الحلوة.
أوكسيتتراسيكلين	*S.rimosus*	الذرة على قطعة خبز.
سيرفاكتين	*subtilis Bacillus*	بقايا فول الصويا.
سيكلوسبورين A	*Tolypocladium inflautum*	نخالة القمح
هرمـــونات النمو	*Fusarium moniliforme*	قصب السكر ونخالة
حمض الجيبريليك	*Gibberella fujikuroi*	القمح.
السموم الفطريـــة	*A. oryzae, A. panasitus*	نخالة القمح والذرة والأرز والفول
أفلاتوكسين	*A. ochraceus, Penicillium*	السوداني
أوكراتوكسين	*viridicatum, A. carbonarius*	
مضادات الفطريات	*Bacillus subtilis*	دقـــيق الذرة
	Collectotrichum truncatum	

إنتاج الأنزيمات		
غليكوأميلاز	*Aspergillus sp.*	فضلات الشاي والأرز ونخالة القمح.
ليباز	*A. niger, Candida rugosa, Penicillium restrictum*	كعكة السمسم، جوز الهند.
سيليلاز	*Bacillus subtilis, Aspergillus sp.*	مخلفات الفاكهة، كعكة زيت الصويا.
بكتيناز	*A. niger, Talaromyces flavus,*	مخلفات الحمضيات، نخالة الصويا والقمح والتفاح البكتين.
كزيليناز	*A. tamari, A. niger, Bacillus sp., Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei,*	أذن الذرة ، نخالة القمح ، قصب السكر ودقيق الصويا.
بروتياز	*A. niger, Mucor miehei, Rhizopus oligosporus,*	نخالة القمح.
فيتاز (Phytases)	*A. niger, A. ficuum, Mucor racemosus, Rhizopus oligosporus*	نخالة القمح ودقيق الصويا والذرة المسحوقة.
أميلاز	*Lentinula edodus, Bacillus licheniformis*	نخالة القمح.

المركبات العضوية		
حمض الستريك	*A. niger*	مسحوق القهوة والتفاح الأرض الحلوة ، أشجار الخروب اللحاء ، نفايات الأناناس ، الذرة. الكسافا ، معالجة نفايات الجزر.
حمض كوجيك	*A. oryzae*	
حمض اللبنيك	*R. oryzae , Lactobacillus casei*	قصب السكر بالطين ، الذرة الرفيعة.
حمض الأكساليك	*L. helveticus, L. paracasei Streptococcus thermophiles A.niger*	بطاطا حلوة
حمض الفوماريك	*Rhizopus arrhizus Rhizopus sp.*	قشر البرتقال، نشا الكسافا الخام.
حمض الغلوكونيك	*A niger.*	مستخلص التين ، الجلوكوز ، ثمار التين.
الإيثانول	*Saccharomyces cerevisiae Schwanniomyces castellii, Zymomonas mobilis, utilis, Torula utilis Candida*	البطاطا الحلوة أو الذرة الحلوة.
حمض الغاليك	*Aspergillus foetidus Rhizopus oryzae*	مزيج من المنتجات الزراعية الغنية بالتانينات (الدباغ).

الأطعمة المخمرة **تحسين التغذية** **بروتين التخصيب** **مركبات عطرية**	*A.orzyae, A. sojae* *Penicilium sp.* *Neurospora sitophila* *Bjerkandera adusta , Bacillus subtilis, Rhizopus oryzae, Ceratocystis fimbriata*	لحاء الثمار المختلفة. قشر البرغموت. لب بنجر السكر،نفايات الحمضيات. نخالة القمح ، فول الصويا المفروم.
مركبات أخرى فيتامين ب 12 و ب 6 ، الريبوفلافين ،الثيامين ، حمض النيكوتينيك نيكوتيناميد. العوامل الحيوية السطحية أصباغ حمراء. الكاروتينات	*Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Rhizopus oligosporus, R. arrhizus, R. stolonifer* *Bacillus subtilis* *Monascus purfureus* *Penicillium sp*	فول الصويا. بقايا ودبس السكر الزراعي الصناعي. قصب السكر القصب ، والشعير. دقيق الذرة

الفصل II

المـــــواد و الطـــــرق

المـــواد والطرق

سبخة البيضاء هي إحدى المستنقعات الطبيعية الملحية المؤقتة. تقع بين خطي عرض °35′35 شمالا وبين خطي طول °5′48 شرقا بالقرب من منطقة حمام السخنة (ولاية سطيف –الجزائر) ، تبلغ مساحتها حوالي 12.223 هكتار. تتميز التربة المحيطة بالموقع بكونها أقل ملوحة إلى مالحة ، قاعدية ذات تركيبة متدرجة صلصالية (Aliat, Kaabeche، 2013). تم الحصول على العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae* الموجهة لهذه الدراسة من سبخة البيضاء خلال دراسة الماجيستير على مستوى مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية جامعة فرحات عباس سطيف-1-. وقد تم تشخيصها بالاعتماد على الخصائص المظهرية والمجهرية. وتم حفظها في أوساط سائلة وصلبة (YES) في الثلاجة –20°م لحين الاستعمال.

II.1.تقديـــر النشاطية المضادة للميكروبات للعزلات الثلاث

يهدف هذا الإختبار إلى إظهار العزلة التي تملك نشاط ضد ميكروبي أكبر، والتي تنتقى فيما بعد ليتم التعرف ومواصلة العمل عليها في باقي النشاطات البيولوجية المراد اختبارها.

تم اختبار النشاطية المضادة للميكروبات على 6 أنواع بكتيرية ممرضة سالبة الغرام وهي: *Salmonella typhi* ATCC14028، *Salmonella typhimirium* ATCC13311، *Escherichia coli* ATCC25922، *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 ، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853، *E. coli* ATCC25923 مقاومة (ECRB) ، و 3 أنواع أخرى موجبة الغرام وهي:

Staphylococcus aureus ، *Bacillus cereus ATCC*10876, *Staphylococcus aureus ATCC*25923, *ATCC*43300 (MRSA) المقاومة للميثيسيلين، بالإضافة إلى الخميرة *Candida albicans* التي تم عزلها سريريا من المرضى و التعرف عليها على مستوى مخبر علم البكتيريا والطفيليات بالمستشفى الجامعي لولاية سطيف.

II.1.1. استخلاص الجزيئات الحيوية

II.1.1.1. التخمر على وسط سائل (SmF)

بهدف عزل الجزيئات الحيوية ذات النشاط البيولوجي الضد ميكروبي بالنسبة للعزلات الفطرية تم الاعتماد على طريقة كل من Sadrati *et al.* (2013) ، Chaudhary و Tripathy (2015) و Anand *et al*. (2016). حيث تم تحضير حواجل بسعة 250 مل بها 100مل من الوسط المعقم YES ، بعد ذلك يتم قطع قرص بقطر 6 ملم من كل مستعمرة نقية للعزلات الثلاث المدروسة (S1، S2، S3) ، منماة على وسط PDA لمدة 7 أيام . مراحل التجربة تمت في ظروف معقمة و بثلاث مكررات لكل سلالة. تحضن الدوارق في 30°م لمدة 7 أيام. بعد إنتهاء فترة الحضن تمت عملية الاستخلاص وفقا للمراحل التالية:

– يتم تجميد الميسيليوم مع الوسط عند –20°م لمدة 2-3 ساعات ، وبعد ذلك ، يتم سحقه ثم تجرى له عملية طرد مركزي بسرعة 15000 دورة في الدقيقة / 15 دقيقة.

– الجزء العلوي من الرشاحة المتحصل عليه بعد عملية الطرد المركزي يسترجع ليمزج بنفس الحجم من الإيثيل أسيتات (1:1) (ح:ح)، ترج العينات جيدا ثم تترك لعدة ساعات بهدف انفصال الطبقة العضوية عن الطبقة المائية.

– تبخر الطبقات العضوية حتى الجفاف عبر جهاز التبخير الدوراني عند 40 ± 1 °م ، ثم تذاب المستخلصات الخام الجافة في 50٪ DMSO (dimethylsulfoxyde) ، وتخزينها عند 4°م لحين استخدامها.

II.1.2. النشاطية المضادة للميكروبات للمستخلصات

تمت دراسة النشاطية المضادة للميكروبات لمستخلصات الإيثيل أسيتات المتحصل عليها من العزلات الثلاث بالاعتماد على طريقة الإنتشار على الوسط الصلب باستعمال الأقراص. حيث تم نشر المعلق البكتيري بتركيز 10^8 خلية/ مل ، ومعلق خميرة *C. albicans* بتركيز 10^6 خلية/مل على أطباق بتري تحتوي عل وسط Muller Hinton Agar ، ووسط Sabouraud على الترتيب . توضع أقراص ورقية (Whatman رقم 1) المحضرة والمعقمة سابقا على سطح الآجار ثم تبلل بحجم 15 ميكرولتر من المستخلص الفطري الخام لكل سلالة على حدة

بثلاث مكرارات. تحضن بعد ذلك الأطباق في 37 °م مدة 24 ساعة للعزلات البكتيرية و 48-72 ساعة بالنسبة للخميرة (Tripathy and Chaudhary,2015).

تحضر شواهد سلبية باستخدام نفس المذيب المستخدم لإذابة المستخلصات (DMSO 50%). تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات عن طريق قياس منطقة التثبيط حول الأقراص.

II.1.2.1. تقدير التركيز الأدنى للتثبيط (MIC)

بعد الحصول على نتائج النشاطية المضادة للميكروبات في وسط صلب، أردنا تحديد التركيز الأدنى للتثبيط (MIC) بطريقة التخفيف المصغر حسب Chaudhary و Tripathy (2015). حيث تستعمل صفيحة معقمة بها 96 بئر، وكمرحلة اولى يتم وضع 100µl من الوسط MH السائل للبكتيريا و وسط PDB للخميرة، انطلاقا من البئر رقم 2 للصفيحة حتى البئر رقم 11، ثم في البئر رقم 1 نضع 100µl من المستخلص الفطري المذاب في 5% DMSO ، يتم نقل 50µl من محلول البئر الأول حتى البئر رقم 9، البئر رقم 10 نعتبره كشاهد سلبي حيث لايحتوي على المستخلص، والبئر رقم 11 كشاهد موجب إذ لايحتوي على المعلق الميكروبي. في الأخير نضيف 25µl من المعلق البكتيري 10^7 x6 خلية/مل (*Bcillus cereus* ATCC10876، *S. aureus* ATCC25923 ، MRSA ATCC43300، *E. coli* ATCC25922، *P. aeruginosa* ATCC27853، *K. pneumoniae* ATCC700603)، ومعلق خميرة *C. albicans* 10^7 x7 خلية/مل. تحضن الصفيحة عند 37 °م لمدة 24 ساعة.بعد انتهاء فترة الحضن تقرء الصفيحة في جهاز خاص لقراءة البيانات. كانت البيانات متوسط لثلاث مكررات (Rahmoun *et al.*, 2012)

II.1.2.2. النشاطية المضادة للفطريات

تم اختبار النشاطية المضادة للفطريات للعزلة *A. oryzae* S1 مخبريا باتباع تقنية الزرع المزدوجة Rahman *et al.*, 2009)، على ثلاث فطريات ممرضة للنبات وهي: *Aspergillus flavus*، *Alternaria solani* و *Fusarium oxysporum*. والتي تم الحصول عليها من مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية لجامعة فرحات عباس سطيف-1-.

تعتمد الطريقة على زرع الفطر الممرض و فطر *A. oryzae* S1 في أطباق بتري تحتوي على وسط PDA بشكل منفصل ، ثم تحضن الأطباق عند 28 °م لمدة 5 أيام. بعد ذلك يتم قطع أقراص بقطر 6 مم للسلالة والممرضات الفطرية النباتية ، ويتم وضعها بشكل متقابل في نفس الطبق، على مسافة 5 سم بين الزوج الفطري ، و كشاهد وضع القرص الفطري لكل فطر ممرض في موقع واحد من الطبق. تحضن الأطباق عند 28°م لمدة 3-5 أيام (شكل5) (Rahman *et al.*, 2009). تم تحديد النمو الفطري من خلال إشعاع الفطريات الممرضة، وتم حساب نسبة التثبيط بالصيغة التالية:

نسبة التثبيط = [R1/ (R2 – R1)] x 100

حيث: R1 : نصف قطر الفطر المختبر في الطبق الشاهد.

R2 : نصف قطر الفطر المختبر في طبق المزرعة المزدوجة

- تم تصنيف نسبة التثبيط على مستوى فئة تثبيط النمو من نشاط مضاد للفطريات منخفض إلى مرتفع للغاية:

> 30٪ = منخفض ؛ 30-50٪ = معتدلة ؛ 50-70٪ = عالية ؛ ≤ 70٪ = مرتفع جدًا

شكل 5. مخطط قياس النمو الشعاعي للفطريات من خلال طريقة الزرع المزدوجة

R1: نصف قطر الفطر المختبر في الطبق الشاهد . R2 : نصف قطر الفطر المختبر في طبق المزرعة المزدوجة . T: الفطر المدروس، C: الفطر الممرض المختبر (Rahman et al., 2009).

II.2.التشخيص الجزيئي للعزلة *A. oryzae* S1

أجريت عملية التشخيص الجزيئي على مستوى مخبر علم الأحياء الدقيقة بجامعة نوشاتال بسويسرا، وفق العمليات التالية:

II.2.1. استخلاص الحمض النووي (DNA)

تم استخلاص الحمض النووي باستخدام مجموعة Quick-DNA ™ Fungal / Bacterial Zymo Research. ثم قياس تركيز الحمض النووي المستخرج من خلال جهاز قياس الفلور Qubit® 2.0 (Life Technologies) باستخدام المجموعة DsDNA BR Quant-iT حسب تعليمات الشركة المصنعة. كانت تراكيز الحمض النووي للعينة 39.3 نانوغرام / ميكرولتر. تخفف العينة لتركيز 2 نانوغرام/ميكرولتر من أجل التضخيم بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

II.2.2. تضخيم DNA بتقنية PCR (Polymerase Chain Reaction)

تم تضخيم عينة الحمض النووي غير المخففة والمخففة باستخدام إنزيم الوسم DNA Polymerase مع استعمال المنظم NEB Thermopol (New England Biolabs)، وكذلك باستخدام زوج من البادئات الداخلية العالمية (Internal Transcriped Spacer) ITS-1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS-4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). تتضمن تفاعلات التضخيم بتقنية PCR أولا على عملية دنترة (تمسخ) للـ DNA عند درجة حرارة 95°م مدة 5 دقائق ، و 30 دورة للتضخيم، ثم تمديد نهائي عند 68°م مدة 5 دقائق ، حيث كل دورة تضخيم تشمل عملية دنترة عند 95°م لمدة 30 ثانية ثم تلدين عند 55°م لمدة 30 ثانية، ثم تمديد عند 68°م مدة دقيقة. تفحص بعد ذلك نواتج التضخيم عن طريق الهجرة الكهربائية باستخدام 0.8% من هلام الأغاروز مصبوغ بإيثيديوم بروميد، وتلاحظ تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية. بعد عملية التضخيم تنقى العينة بتركيز 38.1 نانوغرام / ميكرولتر عن طريق ترشيح الصفائح الدقيقة وتجرى لها عملية التسلسل الجزيئي في GATCBiotech.

II.3.التحليلات الإحصائية

يعبر عن القيم المتحصل عليها بالمتوسط الحسابي (M) ± الانحراف المعياري (SD) ، حللت النتائج إحصائيا عن طريق اختبار one-way ANOVA) (باستعمال Graphpad Prism ®) المتبوع باختبارTukey لمقارنة متوسطات مناطق التثبيط بين مستخلصات السلالات. وكذلك المقارنة بين العزلات الثلاث. حيث اعتبر الفرق إحصائيا ذو معنى عند الدلالة 5% أي أن معامل التحديد ($p<0.05$).

II.4.تأثير بعض العوامل الفيسيولوجية على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات من طرف العزلة *A. oryzae* S1

لمعرفة تأثير بعض مالعوامل الفيسيولوجية على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات، أحدثت تغيرات في ظروف تنمية المستعمرة منها: درجة الحرارة، pH ، الملوحة ومدة الحضن. تلقح دوارق بها 100 مل من وسط YES بـ1 مل من معلق بوغي للفطر بتركيز 6.4×10^6 خلية/مل بثلاث مكررات، وللدلالة على درجة الإنتاج تتم عملية الإستخلاص ودراسة النشاطية المضادة للميكروبات (*E. coli*، *S. aureus* و *C. albicans*) بنفس الطريقة المذكورة سابقا.

II.4.1. تأثير درجة الحرارة

نمي الفطر كما ذكر سابقا على وسط YES، وحضنت الدوارق في درجات حرارة مختلفة : 25°م، 28°م ، 30 °م ، 35°م لمدة 7 أيام (Mathan *et al.*, 2013).

II.4.2. تأثير الأس الهيدروجيني pH

يتم تعديل الوسط بعدة قيم من pH هي 4، 6، 8 و11 ، و ذلك بإضافة 1N HCl، 1N NaOH. تعقم الدوارق في درجة 121°م مدة 15 دقيقة ، ثم تلقح وتحضن في درجة حرارة 30°م بثلاث مكررات لمدة 7 أيام (Mathan *et al.*, 2013).

II.4.3. تأثير الملوحة

لدراسة تأثير تركيز NaCl على إنتاج المركبات النشطة بيولوجيًا ، تمت تنمية الفطر بتراكيز مختلفة من NaCl (0.5M، 1M، 1.5M، 2M) ، بينما تم الاحتفاظ بالمعايير الأخرى عند المستوى الأمثل (Mathan *et al.*, 2013).

II.4.4. تأثير مدة الحضن

مع الحفاظ على الظروف الأخرى عند المستوى الأمثل ، حضن الفطر لمدة (7 أيام ، 14 يومًا ، 21 يومًا ثم شهرًا) ، ثم قدر إنتاج المستقلبات النشطة بيولوجيًا بعد كل فترة حضن (Mathan *et al.*, 2013).

II.5.مقارنة استخلاص الجزيئات الحيوية بين استعمال التخمر على وسط سائل و وسط صلب

II.5.1. التخمر على وسط سائل (SmF)

أجريت عملية التخمر والإستخلاص على وسط سائل بنفس الطريقة المذكورة سابقا باستعمال الوسط YES.

II.5.2. التخمر على وسط طبيعي صلب (SSF)

أصبح استعمال هذا النوع من التخمرات محط اهتمام و دراسة العديد من الباحثين بعد عدة استخدامات له في إنتاج الأنزيمات وبعض المواد، حيث يمتاز هذا النوع من التخمرات بمتطلبات طاقوية قليلة وإنتاج كميات قليلة جدا من المخلفات السائلة المضرة بالبيئة. تستعمل هذه الطريقة لإنتاج الأنزيمات من طرف الفطريات الخيطية، لأن مورفولوجية و فسيولوجية هذه الأعفان تمكنها من الاختراق و النمو في مختلف المركبات الطبيعية الصلبة، ويستعمل في هذا النوع من التخمر العديد من المخلفات الزراعية كمصادر للتغذية و كدعامة فيزيائية (Singh and Pandey, 2009).

استعمل في هذا التخمر عجينة نخالة القمح المحضرة حسب طريقة (Silvia *et al.*, 2013) ، حيث يتم وزن 10 غ من نخالة القمح في دوارق بسعة 250 مل و ترطب بنسبة 70% باستخدام محلول ملحي (الملحق رقم -8

2) ، تعقم الأوساط لمدة 15دقيقة ثم تلقح ب 1 مل من المعلق البوغي للفطر بتركيز 6.4 x 10^6 خلية/مل وتحضن في 30°م لمدة 28 يوم، ويتم فحص رطوبة وسط التخمر كل ثلاثة أيام وتعديلها إلى 70% بإضافة المحلول الملحي المعقم.

II.5.2.1. استخلاص الجزيئات الحيوية في تخمر الحالة الصلبة (SSF)

في نهاية التخمر ، تمزج عجينة التخمر مع الكتلة الحيوية بوجود 50 مل من الماء المقطر وترج لمدة 30 دقيقة. يتم بعد ذلك ترشيح كل المحتوى عبر قماش الشاش. تعالج الرشاحة مرة أخرى باستخدام 50 مل أخرى من الماء المقطر بنفس الطريقة ويعاد ترشيحها، ثم تجرى عملية طرد مركزي بسرعة 15000 دورة في الدقيقة / 15 دقيقة. يسترجع الجزء العلوي من الرشاحة المتحصل عليه بعد عملية الطرد المركزي و يمزج بنفس الحجم من الإيثيل أسيتات (1:1) (ح:ح)، ترج العينات جيدا ثم تترك لعدة ساعات بهدف انفصال الطبقة العضوية عن الطبقة المائية.

-أخيرا، تبخر الطبقات العضوية حتى الجفاف عبر جهاز التبخير الدوراني عند 40 ± 1 °م ، ثم تذاب المستخلصات الخام الجافة في 50% DMSO ، وتخزينها عند 4°م لحين استخدامها (Sadrati *et al.*, 2013 ; Anand *et al.*, 2016).

II.5.3. الكشف الأولي للمركبات الحيوية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

يعتبر هذا النوع من الكروماتوغرافيا إجراء بسيط وسريع، يستخدم للتعرف على مركب في خليط عند مقارنة معامل الإنسياب (Rf) لمركب مع Rf لمركب معروف (Sasidharan *et al.*, 2011).

استخدمت ألواح هلام سليكا (DC-Pet-Folien-Kieselgel with F indicator 254nm) (20x20 سنتيمتر) الجاهزة للاستعمال سمك (0.2 ملم) لفصل محتويات كل مستخلص على حدا (SmF و SSF). وذلك بوضع حجم 5 ميكرو لتر على خط الانطلاق الوهمي للألواح. تمت العملية تحت التجفيف الضعيف (باستعمال مجفف الشعر)، ثم أجريت الهجرة على مسافة 15سم في نظام الهجرة كلوروفورم:إيثيل أسيتات: حمض الفورميك بالنسب الحجمية (2:8:10) على التوالي. بعد الهجرة ترش الصفيحة بمحلول الفانيلين (0.2 غ فانيلين، 28 مل

ميثانول، 1مل حمض الكبريتيك) ، ثم تجفف في درجة حرارة 100°م لمدة 5 دقائق. تلاحظ الألوان و مواقع البقع في الضوء المرئي و تحت الأشعة فوق البنفسجية UV في طول الموجة 254 نانومتر و 365 نانومتر (Ndip and Seanego, 2012).

II.4.5. تعريف الجزيئات الحيوية بواسطة كروماتوغرافيا الطور الغازي مع طيف الكتلة (GC/MS)

كروماتوغرافيا الطور الغازي مع طيف الكتلة (GC-MS) يجمع بين تقنيتين قويتين لتوفير تحديد المركبات ذات حدود الكشف المنخفضة وإمكانية التحليل الكمي .يمكن أن تعمل تحاليل GC-MS على عينات سائلة وغازية وصلبة ، ولكن تقتصر في المقام الأول على المركبات المتطايرة وشبه المتطايرة.

أجري تحليل GC-MS لتعريف الجزيئات الحيوية للمستخلصين من كلا الوسطين السائل والصلب في مختبر مركز أبحاث التكنولوجيا الحيوية بقسنطينة (CRBt)، وفق طريقة Chaudhary و Tripathy (2015)، حيث تم استخدام العمود DB-5 (30 م × 0.25 مم × 1 ميكرومتر) المكون من 100٪ ثنائي ميثيل بوليسيلوكسان. يتم حقن الغاز الناقل(هيليوم) (99.999٪) بمعدل تدفق ثابت يبلغ 1 مل / دقيقة ، في جهاز GC-MS. درجة الحرارة المبرمجة: 110 °م – 2 دقيقة ثابتة ، حتى 200 °م بمعدل 10 °م / دقيقة – غير ثابتة ، حتى 280 °م بمعدل 5 °م / دقيقة – 9 دقائق ثابتة ، درجة حرارة الحاقن 250 °م ، إجمالي وقت التشغيل 36 دقيقة.

برنامج الطيف الكتلي: تم أخذ طيف الكتلة في eV70 ؛ الفاصل الزمني للمسح 0.5 ثانية، والأجزاء من 45 إلى 450 دالتون. إجمالي وقت تشغيل الطيف الكتلي هو 36 دقيقة.

تم تعريف الجزيئات الحيوية باستخدام قاعدة بيانات المركز (Database / NIST11.L) ، Data-base / W9N11.L.

- استخدمت نفس الأوساط بدون نمو الفطر كشواهد وتم إلغاء المركبات المتشابهة .

II.6.تقييم السمية الخلوية للمستخلصات الفطرية

أجري اختبار النشاطية السمية للمستخلصات الفطرية المتحصل عليها من التخمر على وسط سائل ووسط صلب SmF و SSF على التوالي، في مركز الأبحاث الطبية الحيوية بجامعة غرناطة –إسبانيا. أجري الاختبار على نوعين من الخلايا هي: الخلايا البالعة RAW264 و الخلايا الظهارية للأمعاء الدقيقة للإنسان Caco-2 باتباع طريقة Mosmann (1983).

II.6.1. مخبريا الخواص المناعية لمستخلصات SSF و SmF على إنتاج أكسيد النيتريك في خلايا RAW 264

يعد أكسيد النتريك Nitric oxide (NO) أحد أهم الجذور الحرة نظرا للدور الأساسي الذي يلعبه في العديد من العمليات الحيوية ، وهو كغيره من الجذورالحرة له استعداد كبير للتفاعل مع غيره من المركبات من أخطرها $O_2^{\cdot}$ وH_2O_2 لينتج عنه النترات (NO^{-2}) ، النتريت (NO^{-3}) و بيروكسي نتريت ($ONOO^-$) ،حيث يتسبب هذا الأخير في أكسدة مجاميع السيلفهيدريل، اللبيدات ، الأنزيمات، DNA ونترجة البواقي العطرية للبروتينات في الظروف الفسيولوجية مؤديا كل هذا إلى أضرار وسمية خلوية، كما قد تتسبب مركبات أخرى مشتقة من أكسيد النتريك مثل نيتروتيروزين في التدخل في عمليات الفسفرة/ إزالة الفسفرة وهي أحد أهم العمليات المنظمة لمختلف المسارات أو التغيير في وظيفة البروتينات) (Anugya *et al.*,2009).

* تم توفير خط الخلايا البالعة RAW 264 من قبل وحدة زراعة الخلايا بجامعة غرناطة بإسبانيا. تزرع الخلايا في وسط RPMI ، مضاف إليه 10٪ من مصل جنين بقري معطل (غير نشط) بالحرارة ، و L- الجلوتامين (2 ملي مول / لتر) ، البنسلين (100 وحدة / مل) وستربتوميسين (1 مغ / مل) مرطب وبوجود 5٪ CO_2 جوي في 37°م. تزرع الخلايا في صفيحة بها 96 بئر بكثافة 10^5 x5 خلية / بئر ، وتترك لتنمو حتى تشكل طبقة أحادية (mono layer) ، ثم تحضن مسبقًا لمدة ساعتين بتراكيز مختلفة من المستخلصات (50 و 100 ميكروغرام / مل) ، ثم يتم تحفيزها باستخدام الليبيدات عديدة السكريات (LPS) لبكتيريا *E. coli* 055 : B5 ؛(سيجما ، سانت لويس ، ميزوري ، الولايات المتحدة الأمريكية) بتركيز 100 نانوغرام / مل لمدة 24

ساعة. تم تحضير تراكيز المستخلص من محلول مخزون تم الحصول عليه عن طريق إذابة 20 مغ من كل مستخلص في خليط من وسط DMSO / RPMI (0.1 مل / 0.9 مل).

استخدمت الخلايا غير المنشطة و غير المحفزة والخلايا المحفزة بواسطة LPS كشواهد سلبية وإيجابية على التوالي. بعد فترة التحفيز ، تم جمع المواد الطافية وقياس مستويات النتريت بواسطة اختبار Greiss (1٪ Sulphanilamide (وزن/حجم) في 5٪ حمض فوسفوريك و 0.1٪ N-1-naphthyl-ethylenediamine (وزن/حجم) في الماء). يقاس امتصاص الأوساط عند طول الموجة 550 نانومتر على قارئ صفيحة MRX Dynex (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). تمثل النتائج في المنحنى الشاهد المقابل لحساب تراكيز النتريت كتحديد غير مباشر لإنتاج أكسيد النيتريك.

قدر تأثير المستخلصات على حيوية الخلية باستخدام صفيحة CellTiter 96 ® المائية، عن طريق تجربة التكاثر الخلوي (Promega، Madison، WI ، USA) باتباع طريقة الشركة المصنعة ، حيث تم إضافة محلول 3- (4،5-ثنائي ميثيل ثيازوليل2) -5- (3-كاربوكسي ميثوكسي فينيل) -2- (4-سلفوفينيل) -H2- رباعي زوليوم، لكل بئر وحضن لمدة 1-4 ساعات. تقاس امتصاصية الأوساط عند طول الموجة 490 نانومتر على قارئ صفيحة MRX Dynex (Dynex Technologies، Chantilly، VA، USA). وتحسب الحيوية الخلوية من قيمة الامتصاص ومقارنتها مع خلايا الشاهد غير المعالجة.

II.2.6. اختبار السمية الخلوية في الزجاج لمستخلصات SSF و SmF في خلايا Caco-2

يستخدم خط الخلايا الظهارية البشرية Caco-2 على نطاق واسع كنموذج للحاجز الظهاري المعوي. خط الخلايا Caco-2 مشتق في الأصل من سرطان القولون. ومع ذلك ، فإن أهم إيجابياته هو قدرته على التمايز العفوي إلى طبقة أحادية من الخلايا مع العديد من الخصائص النموذجية للخلايا المعوية الممتصة مع طبقة حدود الفرشاة كما توجد في الأمعاء الدقيقة (Verhoeckx *et al.*, 2015).

* أجري اختبار السمية الخلوية بمركز البحوث الطبية الحيوية، قسم الصيدلة–جامعة غرناطة. استخدمت خلايا Caco 2 المتحصل عليها من وحدة زراعة الخلايا بجامعة غرناطة بإسبانيا. تزرع الخلايا ثم يفحص تأثير المستخلصات على حيوية الخلايا بنفس الطريقة المذكورة سابقا باستخدام خلايا RAW 264.

II.7.اختبار النشاطية المضادة للفيروسات

قدرت النشاطية المضادة للفيروسات لمستخلصات الفطر (SSF و SmF) في معهد باستور، قسم علم الفيروسات –الجزائر العاصمة– ضد فيروس Herpes simplex-2 (HSV-2)، وفق طريقة Anand *et al.* (2016).

تزرع 60 ميكرولتر من طبقة أحادية من خلايا HEp-2 (نوع من الخلايا الظهارية البشرية)، في صفيحة بها 96 بئر، وتلقح بـ 40 ميكرولتر من المعلق الفيروسي، ثم تجرى لها سبعة تخافيف عشرية متتالية في 2% وسط مصل جنين البقر/ وسط أساسي أدنى (FBS/MEM) ، تمت إضافتها إلى خمسة آبار (أربعة لمضاد الفيروسات ، واحد شاهد سالب، أما الشاهد الموجب فلا يحتوي على الفيروس). تحضن الصفيحة عند 37 °م في 5 ٪ CO_2 جوي لمدة 60 دقيقة، وذلك لتسهيل ادمصاص الفيروس إلى خط الخلية. من جهة أخرى تخفف التراكيز التالية من المستخلصات الفطرية، الخالية من السمية الخلوية، إلى 40 ميكروغرام، 30 ميكروغرام، 20 ميكروغرام و 10 ميكروغرام مع 2٪ من وسط (FBS/MEM) و نقل 100 ميكرولتر من كل مستخلص فطري مع الوسط على خطوط الخلايا أحادية الطبقة الملقحة بالفيروس وإعادة احتضانها عند درجة حرارة 37 °م لمدة 3-4 أيام للسماح بتكاثر الفيروس ومتابعة تأثير الإعتلال الخلوي (Cytopathic effect). لوحظ كل بئر يوميا تحت المجهر المقلوب لوجود أو عدم وجود تأثير الإعتلال الخلوي. تم الاستدلال على الغياب الإجمالي للتأثير الخلوي عن طريق سلامة طبقة الخلية ، دون تشويه في شكل الخلايا أو النواة مقارنة مع الشواهد . أجريت التجربة في ظروف معقمة وبثلاث مكررات.

الشاهد السالب: وسط+ خلايا+ فيروس.

الشاهد الموجب: وسط + خلايا.

II.8.النشاطيـــــــة الأنزيميـــــة

II.8.1. التحري عن قدرة العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae* على إنتاج الأنزيمات الحالة

تتعدد طرق دراسة النشاطية الأنزيمية للأنزيمات المفرزة خارج الخلية وفقا للوسط المستعمل و الذي يمكن أن يكون صلبا أو سائلا، و يعد الكشف عن النشاطية الأنزيمية باستعمال أوساط الآجار الصلبة أكثر استعمالا، حيث تسمح بالكشف والتقدير السريع لمختلف الأنزيمات الخارج خلوية لدى الفطريات (Prathyusha *et al.*, 2015). تم التحري عن قدرة الفطر على إنتاج أنزيمات البروتياز، الأميلاز و الليباز، و ذلك بإذابة مادة تفاعل كل أنزيم في أوساط أساسية خاصة به، بعدها تلقح بأقراص فطرية 5ملم، لتترك بعدها تنمو لمدة 5 إلى 7أيام في درجة حرارة 30 °م، بعدها تضاف كواشف كل نشاط أنزيمي إلى الأطباق (Sunitha *et al.*, 2013 ; Prathyusha *et al.*, 2015). لإنتقاء العزلة الأكثر نشاطا تم حساب كل من قطر الهالة و المستعمرة لتقدير النشاطية الأنزيمية لكل سلالة على كل مادة مختبرة و نسبة الإنتاج الأنزيمي قدرت وفقا لطريقة Taskin *et al.* (2008) حسب العلاقة التالية :

نسبة الإنتاج الأنزيمي= معدل قطر الهالة /معدل قطر المستعمرة

II.8.1.1. الأميلاز

اختبرت قدرة االعزلات الثلاث على إنتاج إنزيم الأميلاز بزرع قرص5 ملم على الوسط GYP مضاف إليه 0.2% من محلول النشاء ويعدل pH الوسط إلى 6 ، بعد مدة الحضن غمرت الأطباق بمحلول الكاشف (IKI)المتكون من 1% iodine و 2% potassium iodide. الهالة المحيطة بالمستعمرة الفطرية تعتبر نتيجة موجة لنشاطية أنزيم الأميلاز أما باقي الوسط فيظهر بلون أزرق.

II.8.1.2. الليباز

تنمى كل سلالة من الفطر على وسط Peptone Agar مضاف إليه1 % من Tween 20 كمصدر وحيد للكربون والذي يعقم بمعزل عن الوسط . بعد عملية الحضن يعبر عن النشاطية الموجبة لأنزيم الليباز بظهور هالة حول المستعمرة الفطرية بشكل ترسبات بلورية ناتجة عن تشكل أملاح الكالسيوم لحمض اللوريك المحررة من طرف الأنزيم.

II.8.1.3. البروتياز

للتحري عن إنتاج أنزيم البروتياز استعمل وسط GYP مضاف إليه 0.4% من محلول الجيلاتين (جيلاتين: 8غ/100مل) و الذي يعقم لوحده ثم يضاف إلى الوسط GYP المعقم. بعد عملية الحضن تغمر الأطباق بالمحلول المائي المشبع لكبريتات الأمونيوم الذي يترسب مع الجيلاتين، حيث تظهر منطقة الجيلاتين المحللة بشكل هالة شفافة حول المستعمرة الفطرية دلالة على وجود نشاط أنزيم البروتياز أما المنطقة غير المحللة فيترسب مع كبريتات الأمونيوم.

II.8.2. إنتاج الأنزيمات باستعمال التخمر على وسط اصطناعي سائل و التخمر على وسط طبيعي صلب

هناك طريقتان للتخمر تستخدمان لإنتاج الأنزيمات: التخمر في وسط سائل (Smf) ويعرف أيضا بالتخمر المغمور، والتخمر في الحالة الصلبة (SSF). يستخدم معظم مصنعي الأنزيمات تقنيات التخمر المغمور، ومع ذلك، هناك اهتمام كبير بتقنيات التخمر الصلبة باستخدام المخلفات الزراعية كركيزة Viniegra-González (*et al.*, 2003) بواسطة الفطريات الخيطية منذ ذلك الحين ، حيث يتكيف جيدًا مع استقلابها ، ويمثل البيئة الطبيعية الملائمة لنمو الميسيليوم. تستخدم الأنزيمات الصناعية مثل الأميلاز والليباز والبروتياز في الغالب في إنتاج الأدوية والأغذية والمشروبات والمنسوجات(Mohapatra *et al.*, 2003)، وقد تم استخلاصها من مجموعة متنوعة من المصادر مثل الحيوانات والنباتات والكائنات الحية الدقيقة (Muthulakshmi *et al.*, 2011) ولكن

الدراسات أثبتت أن الأنزيمات الميكروبية أكثر استقرارًا من غيرها المشتقة من النباتات والحيوانات (Mohapatra *et al.*, 2003).

II.8.2.1. إنتاج الأميلاز

- **التخمر في وسط سائل**

حضر مستخلص البطاطا بغلي قطع منها ثم ترشيحها. بعد ذلك تستعمل الرشاحة كمصدر للكربون في وسط Czapek dox. يلقح 100 مل من الوسط بـ1 مل من المعلق البوغي 6.4×10^4 خلية/مل ويحضن في 30°م لـ7 أيام. بعد انتهاء فترة الحضن يرشح مرق التخمر لإزالة الميسيليوم، وتجرى له عملية طرد مركزي بسرعة 10000 دورة في الدقيقة/ 10دقائق/ 4°م. يستعمل الجزء الطافي كأنزيم خام.

- **التخمر في الحالة الصلبة**

تعقم 5 غ من نخالة القمح المبلل بنسبة 50 ٪ من الماء المقطر عند 120 °م لمدة 30 دقيقة. بعد التعقيم ، لقحت الدوارق بـ 2مل من المعلق البوغي ، ثم حضنت عند 30 °م لمدة أسبوع واحد. في نهاية التخمر ، تضاف 10 مل من محلول الفوسفات المنظم 0.02 مولار، لكل 1 غرام من المادة الصلبة ، وتم تحريك المحتوى بأكمله لمدة 30 دقيقة ، بعد ذلك يرشح و تجرى له عملية طرد مركزي عند 4000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق. تستخدم المادة الطافية الواضحة كمصدر للأنزيم (Farid *et al.*, 2011).

- **تقدير النشاطية الأنزيمية للأميلاز**

يقدر نشاط الأنزيم وفق طريقة Chancharoonpong *et al.* (2012) باستخدام 1٪ نشاء مذاب في محلول الخل المنظم 0.1 مولار كمادة تفاعل. يمزج 1مل من مادة التفاعل مع 1 مل من الأنزيم الخام وحضنت عند 30 °م لمدة 10 دقائق. بعد ذلك يوقف التفاعل بإضافة 1 مل من حمض 3،5-ثنائي نتروسالسيليك في حمام ماء مغلي لمدة 15 دقيقة ، بعد أن يبرد الخليط، تضاف 9 مل من الماء المقطر. يقاس نشاط الأميلاز عن طريق الامتصاص عند طول الموجة 540 نانومتر.

يعبر عن النشاطية الأنزيمية بكمية الأنزيم المحررة لـ 1 ميكرومولار من الغلوكوز في الدقيقة (1 وحدة دولية تساوي 1 ميكرومولار/الدقيقة) (الملحق5). أجريت جميع التجارب بثلاث مكررات وعرضت البيانات على أنها القيم المتوسطة.

II.2.2.8. إنتاج البروتياز

- **التخمر في وسط سائل**

تعقم دوارق تحتوي على 40 مل من وسط الإنتاج (0.1٪ K_2HPO_4، 0.5٪ $MgSO_4$، 0.5٪ NaCl، 0.004٪ $FeSO_4$) مكمل بنسبة 2٪ من نخالة القمح (وزن/حجم) ،في 121 °م لمدة 20 دقيقة ، ثم تلقح بـ 1 مل من المعلق البوغي وتحضن عند 30 °م لمدة أسبوع. بعد انتهاء فترة الحضن، يرشح مرق التخمر و تجرى له عملية طرد مركزي بسرعة 10000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق. تستخدم المادة الطافية كمستخلص أنزيمي خام (Sandhya *et al.*, 2005b).

- **التخمرفي الحالة الصلبة**

توزن 10 غ من نخالة القمح في دوارق، وترطب بـ 10 مل من المحلول المعدني (0.1٪ K_2HPO_4، 0.5٪ $MgSO_4$ ، 0.5٪ NaCl، 0.004٪ $FeSO_4$) .ثم تعقم لمدة 20 دقيقة ، وتلقح بـ 1 مل من المعلق البوغي وتحضن عند 30 °م لمدة 7 أيام.

بعد انتهاء فترة التخمر، يضاف الماء المقطر لعجينة التخمر بمعدل (1: 5 وزن / وزن) ، يتم تحريك المحتوى بالكامل عند 180 دورة في الدقيقة ، 30 °م لمدة 30 دقيقة. بعد ذلك تفصل المادة الطافية عن طريق الطرد المركزي عند 10000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق وتستخدم كمصدر للأنزيم (Sandhya *et al.*, 2005b).

- **تقدير النشاطية الأنزيمية للبروتياز**

يحضر خليط التفاعل والذي يحتوي على 30 ميكرولتر من مستخلص الأنزيم ، و 500 ميكرولتر من الكازيين (1٪) كمادة تفاعل ، و 470 ميكرولتر من محلول الفوسفات المنظم (0.1 مولار) ، ثم يحضن عند 60 °م لمدة 10 دقائق ، بعد ذلك يتم إيقاف التفاعل بإضافة 1 مل من 10٪ حمض ثلاثي كلورو أسيتيك (TCA). بعد الطرد المركزي عند 3000 دورة في الدقيقة لمدة 15 دقيقة ، تمت إضافة 5 مل من Na_2CO_3 بتركيز 0.44 مولار

و 1 مل من كاشف Folin-Ciocalteau المخفف ثلاثة أضعاف إلى المادة الطافية المجمعة، ثم تحضن عند 30 °م لمدة 30 دقيقة. ويتم تقدير نشاط البروتياز باستخدام التحليل الطيفي عند 660 نانومتر.

يعبر عن وحدة واحدة من نشاط الأنزيم بكمية الأنزيم الذي حرر 1 ميكرومولار من التيروزين في الدقيقة (وحدة دولية تساوي 1 ميكرومولار / دقيقة) (الملحق5) (Sandhya *et al.*, 2005b). تم إجراء جميع التجارب بثلاث مكررات وعرضت البيانات على أنها القيم المتوسطة.

II.8.2.3. إنتاج الليباز

- **التخمر في وسط سائل**

تلقح دوارق تحتوي على 20 مل من وسط النمو المعدني (MGM) ، بـ 1 مل من المعلق البوغي، ثم تحضن عند 30 °م لمدة 7 أيام. بعد فترة الحضانة ، يتم إزالة الميسيليوم عن طريق الترشيح ثم الطرد المركزي عند 12000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق. تستخدم المادة الطافية الموضحة كمصدر للأنزيم (Falony *et al.*, 2006).

- **التخمر في الحالة الصلبة**

تؤخذ 5 غ من نخالة القمح في دوارق، وترطب باستخدام 5 مل من الوسط المعدني MGM . بعد التعقيم ، ثم يلقح الوسط بالمعلق البوغي. تحضن بعد ذلك الدوارق في 30 °م لمدة 7 أيام. بعد انتهاء فترة الحضن ، تضاف 100 مل من الماء المقطر ، ويرج الخليط لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة لتسهيل استخلاص الأنزيم من الركيزة المخمرة. بعد انتهاء المدة، يرشح كل المحتوى، ثم تجرى له عملية الطرد المركزي عند 12000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق. تستخدم المادة الطافية التي تم الحصول عليها كأنزيم خام (Falony *et al.*, 2006).

- **تقدير نشاطية أنزيم الليباز**

تم تحديد نشاط الأنزيم باستخدام طريقة المعايرة بـ NaOH للأحماض الدهنية المحررة من زيت الزيتون بفعل الليباز. يحضر وسط التفاعل بإضافة 1مل من الأنزيم الخام مع 2غ من زيت الزيتون و 4مل من محلول الخل المنظم (pH5) ثم 3 مل من الماء المقطر. يحضن الخليط عند 37 °م لمدة 30 دقيقة مع سرعة الرج عند 120

دورة في الدقيقة. تم إيقاف التفاعل بإضافة 20 مل من خليط الأسيتون: الإيثانول (1: 1 ح/ح). تتم معايرة الأحماض الدهنية المحررة بمحلول 50 ميليمولار من NaOH.

يعبر عن نشاط الأنزيم بكمية الأنزيم الذي حرر 1 ميكرومول من الأحماض الدهنية في كل دقيقة لكل مل بالنسبة لـ SmF (1 وحدة دولية تساوي 1 ميكرومول / دقيقة .مل) ، أو لكل غرام من الركيزة المخمرة (1 وحدة دولية تساوي 1 ميكرومول / دقيقة .غ) لـ SSF (Prabhakar *et al.*, 2002) (الملحق5).

أجريت جميع التجارب بثلاث مكررات وعرضت البيانات على أنها القيم المتوسطة.

II.9.تحديد بعض الظروف المثلى لإنتاج أنزيمات الليباز،الأميلاز و البروتياز باستعمال التخمر في الحالة الصلبة (SSF)

تم دراسة تأثير بعض العوامل على نشاطية الأنزيمات المدروسة المفرزة من طرف الفطر *A. oryzae* S1 وقد اشتملت هذه العوامل على درجة حرارة الحضن، نسبة الرطوبة ، نوع المصدر الكربوني والنيتروجيني و حجم اللقاح. اتبعت نفس الطريقة المذكورة سابقا لعملية التخمر في الحالة الصلبة باستعمال نخالة القمح كوسط طبيعي للنمو لإنتاج الأنزيمات. وتم إحداث التغيرات في العوامل المراد دراستها بشكل منفصل.

II.9.1. تأثير درجة الحرارة

لتحديد درجة الحرارة المثلى لنشاط الأنزيم، حضنت الدوارق بعد تلقيحها بـ 1مل من المعلق البوغي بتركيز $6.4x10^4$ خلية/مل في عدة درجات حرارة: 25، 28، ،30 و 35°م لمدة 7 أيام. بعد انتهاء فترة الحضن تجرى عملية الإستخلاص وتقدير النشاطية لكل أنزيم في كل درجة حرارة بنفس الطريقة المذكورة سابقا لكل نوع من الأنزيمات. أجريت التجارب بثلاث مكررات وعرضت البيانات على أنها القيم المتوسطة (Sandhya *et al.*, 2005b ؛ Farid *et al.*, 2011).

II.9.2. تأثير نسبة الرطوبة

لتحديد نسبة الرطوبة المثلى لنشاط الأنزيمات، تم ترطيب الوسط بنسب مختفلة من الرطوبة ،50،75 ، 100 و 125 %، ثم يلقح كل دورق بـ 1مل من المعلق البوغي الفطري وتحضن في درجة حرارة 30°م لمدة 7أيام. بعد

انتهاء فترة الحضن تجرى عملية الإستخلاص وتقدير النشاطية لكل أنزيم بنفس الطريقة المذكورة سابقا. أجريت التجارب بثلاث مكررات وعرضت البيانات على أنها القيم المتوسطة (Sandhya *et al.*, 2005b ؛ Farid *et al.*, 2011).

II.3.9. تأثير حجم اللقاح

بتثبيت الظروف المثلى من درجة الحرارة ونسبة الرطوبة، تلقح الدوارق بعدة أحجام من المعلق البوغي بتركيز6.4 10^4x خلية/مل : 0.5، 1، 2 و 3 مل. بعد انتهاء فترة الحضن تجرى عملية الإستخلاص وتقدير النشاطية لكل أنزيم بنفس الطريقة المذكورة سابقا لكل نوع من الأنزيمات. أجريت التجارب بثلاث مكررات وعرضت البيانات على أنها القيم المتوسطة (Sandhya *et al.*, 2005b ؛ Farid *et al.*, 2011).

II.4.9. تأثير نوع المصدر الكربوني والأزوتي

تم استكمال نخالة القمح بمصادر كربون مختلفة (النشاء، السكروز ، الغلوكوز ، والغليسيرول) بنسبة 1٪ (وزن / وزن) وبالنسبة لمصدر النيتروجين استخدم الببتون كمصدر عضوي بنسبة 1٪ ؛ كبريتات الأمونيوم ونترات الصوديوم و KNO_3 كمصدر غير عضوي بنسبة 0.25 ٪، مع تثبيت كل العوامل السابقة في القيم المثلى. بعد انتهاء فترة الحضن تجرى عملية الإستخلاص وتقدير النشاطية لكل أنزيم بنفس الطريقة المذكورة سابقا. أجريت التجارب بثلاث مكررات وعرضت البيانات على أنها القيم المتوسطة (Falony *et al.*, 2006).

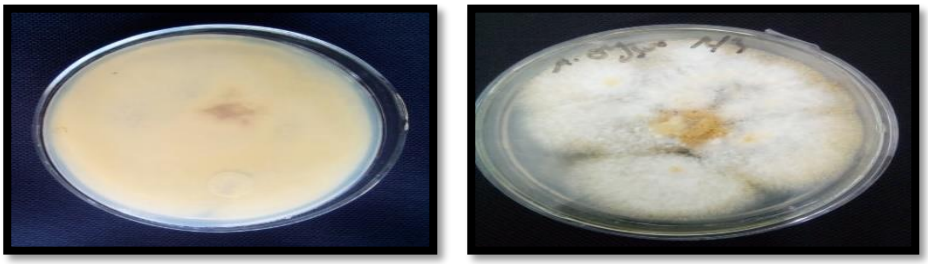
تم تحضير وسط شاهد بتنمية الفطر تحت نفس ظروف التجربة في وسط نخالة القمح بدون إضافة أي مصدر كربوني أو نيتروجيني.

الفصل III

النتـــــــائـــــــج

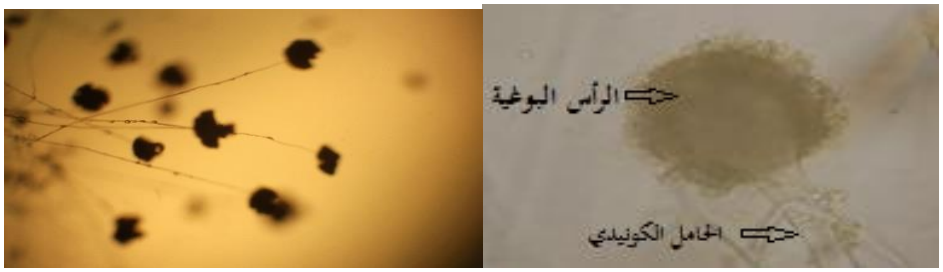
III.1.تعريف العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae*

يتضح من خلال الملاحظة العينية لمستعمرة الفطر النامية على وسط PDA ، مستعمرة ناعمة إلى شكل مسحوقي، ذات ميسيليوم هوائي و غنية بالأجسام الحجرية ، حيث تكون في البداية ذات لون أبيض ثم تميل إلى الاصفرار،أما الخلفية فتظهر صفراء شاحبة (شكل6). أما مجهريا فيظهر الفطر أنه يتكون من حامل كونيدي طويل يحمل رأس بوغية كبيرة شبه كروية، عليها زوائد (Phialides) متراصة مع بعضها البعض بشكل منتظم، تحمل أبواغ الفطر،أما الميسيليوم فهو متشابك و يظهر شفاف. تظهر الأبواغ بلون أصفر مخضر داكن إلى زيتوني ذات شكل بيضوي (شكل 7).



الواجهة الخلفية

شكل 6. مستعمرة *A. oryzae* منماة على وسط PDA عند درجة 30°م



– أ – **– ب –**

شكل7. الرأس البوغية لفطر *A.oryzae* تحت المجهر

– أ–: تكبير X40 **– ب–:** تكبير X4

III.2.إختبار النشاطية المضادة للميكروبات لمستخلصات الإيثيل أسيتات للعزلات الثلاث

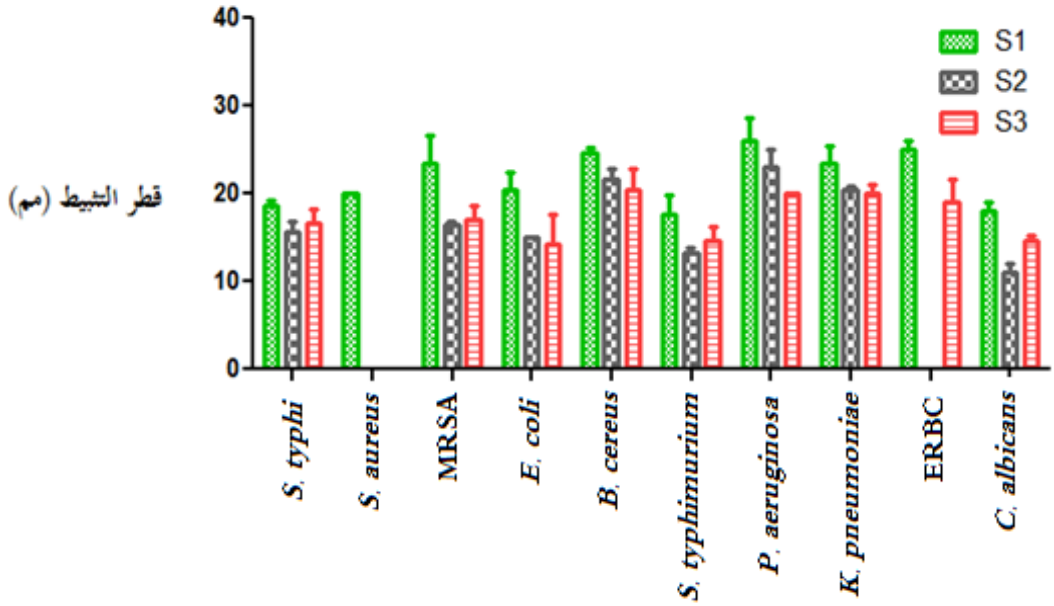
يهدف هذا الإختبار إلى انتقاء العزلة ذات النشاط الضد ميكروبي الأكبر من بين العزلات الثلاث. لقد بينت النتائج اختلاف تأثير مستخلصات العزلات الثلاث (S1, S2, S3) ، والمعبر عنه بقطر التثبيط (مم)، حيث كان هناك فرق معنوي بين العزلة S1 والسلالتين S2 وS3 (p <0.05). أما السلالتين S2وS3 فلم يكن هناك فرق معنوي بينهما. شهدت العزلة S1 نشاطية ضد بكتيرية على جميع الأنواع حيث تراوحت مناطق التثبيط من 17.66–26 مم، أكبرها كان على بكتيريا *P. aeruginosa* بـ 26 مم ، تليها ECRB بـ 25 مم و *B. cereus* بـ 24 مم، ثم MRSA و *K. pneumoniae* بـ 23 مم. أما بالنسبة للعزلتين S2 و S3 فلم يكن تأثير مستخلصاتهما على كل الأنواع البكتيرية، حيث لم يتم تسجيل أي تثبيط على بكتيريا *S. aureus* لكلا السلالتين ، و على ECRB بالنسبة للسلالة S2. أما مناطق التثبيط الأخرى فقد تراوحت بين 11–23 مم بالنسبة للسلالة S2 و بين 14–20مم بالنسبة للسلالة S3. أما بالنسبة للخميرة *C. allbicans* فإن العزلات الثلاث لها تأثير واضح خاصة بالنسبة لـ S1 بـ 17 مم (شكل 8 ؛ شكل 9). اعتمادًا على النتائج الإحصائية ، تم اعتبار S1 بمثابة سلالة نشطة جدًا في هذا الاختبار وتم تقييمها لتحديد MIC والنشاط المضاد للفطريات.

حدد التركيز الأدنى للتثبيط لمستخلص العزلة S1 التي شهدت أحسن نشاطية مضادة للميكروبات، وكان ذلك بالنسبة للسلالات الأكثر حساسية.

النتائج المتحصل عليها موضحة في الجدول (4)، حيث أظهر المستخلص أضعف تركيز مثبط 7.28 ميكروغرام/مل بالنسبة لبكتيريا *B. cereus* و *P. aeruginosa* و 21.85 ميكروغرام/مل بالنسبة للخميرة *C. albicans* والبكتيريا الأخرى المختبرة.

أما بالنسبة للنشاطية المضادة للفطريات الخيطية، فقد لوحظ أن نمو الفطر *A. oryzae* S1 أدى إلى تثبيط نمو الفطريات الممرضة المختبرة بنشاط منخفض إلى متوسط، حيث كانت نسب التثبيط على النحو التالي:

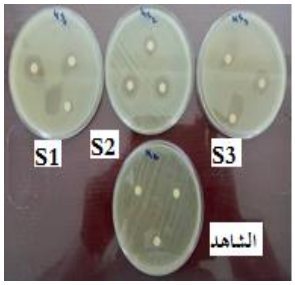
A. solani (%9.3)، *F. oxysporum* (%37) و *A. flavus* (%46) كما هو موضح في الشكل (10).



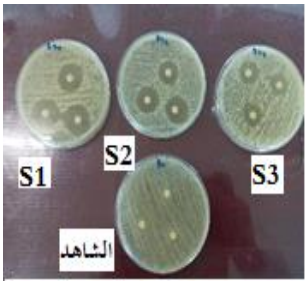
شكل 8. مقارنة بين متوسط قطر التثبيط لمستخلصات العزلات الثلاث على نمو مختلف الكائنات الحية الدقيقة الممرضة

جدول 4 . التراكيز الدنيا المثبطة لمستخلص الفطر *A.oryzae S1*

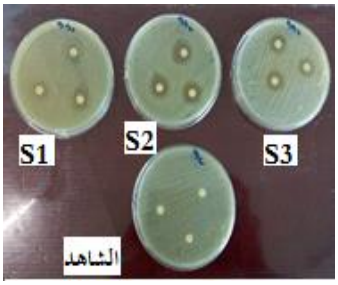
الكائنات الحية الدقيقة الممرضة	*E. coli*	*K. pneumoniae*	*S. aureus*	*MRSA*	*C.albicans*	*P. aeruginosa*	*B. cereus*
التركيز الأدنى للتثبيط (ميكروغرام/مل)	**21.85±0.35**					**07.28±0.13**	



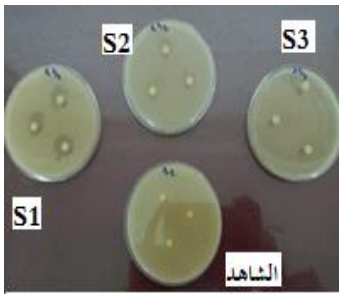
E. coli



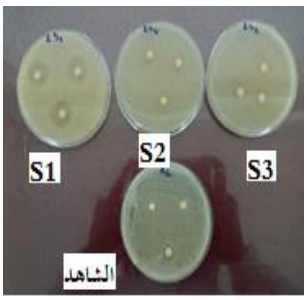
B. cereus



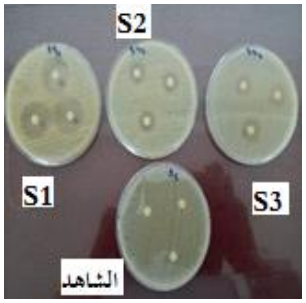
S. typhimurium



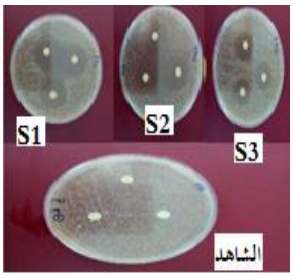
S . typhi



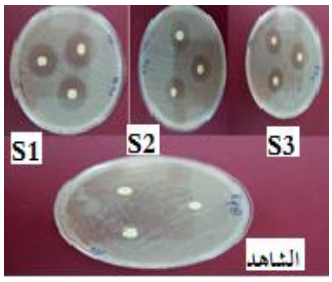
S. aureus



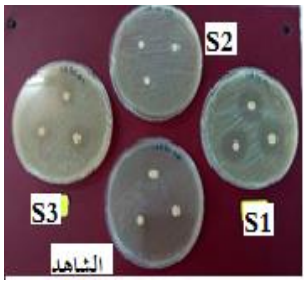
MRSA



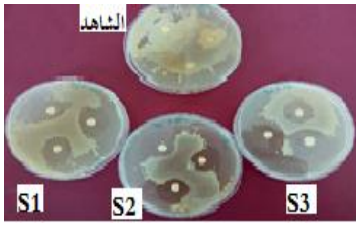
P . aeruginosa



K. pneumoniae

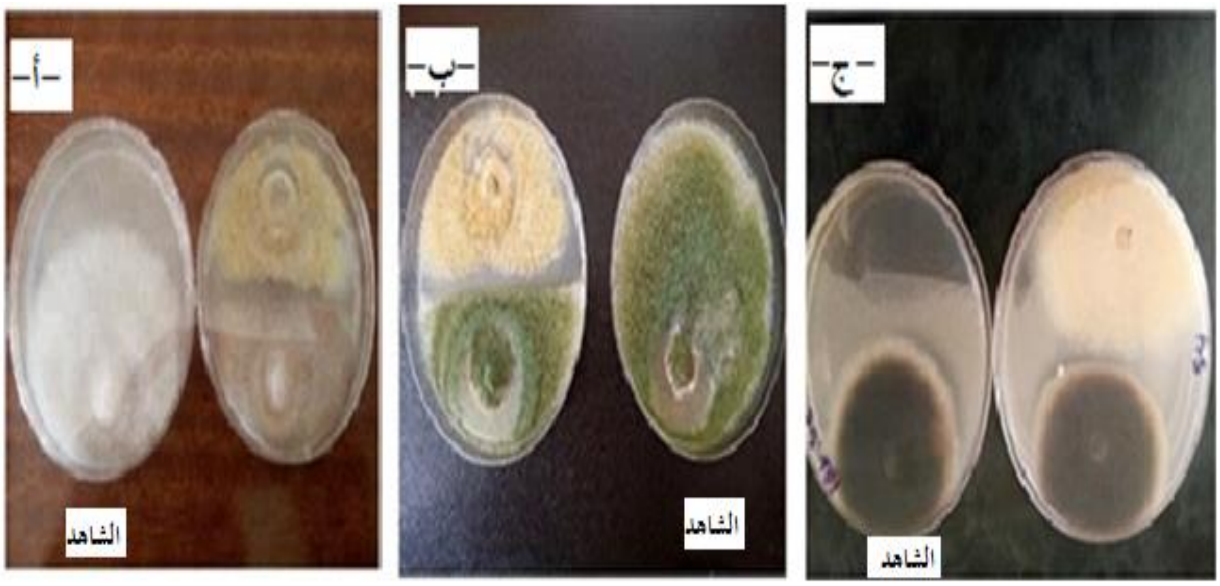


ECRB



C.albicans

شكل 9. اختبار النشاطية المضادة للميكروبات للعزلات الثلاث



شكل 10. النشاطية المضادة للفطريات لفطر *A. oryzae*

أ–*F. oxysporum*، ب–*A. flavus* ، ج–*A. solani*

III.3.التشخيص الجزيئي للعزلة S1 *A. oryzae*

تأكد تشخيص الفطر من خلال التشخيص الجزيئي بعد تحديد التسلسل لنواتج PCR على أنه السلالة *A. oryzae* 18HG80، حيث كان التطابق بنسبة 94% مع قاعدة البيانات (جدول5).

جدول 5. التسلسل النكليوتيدي لنواتج PCR للعزلة *A. oryzae* 18HG80

ونسبة تطابقها مع السلالة المرجعية*A . oryzae* SVP01 رقم التسلسل (KP256849.1) (الملحق8)

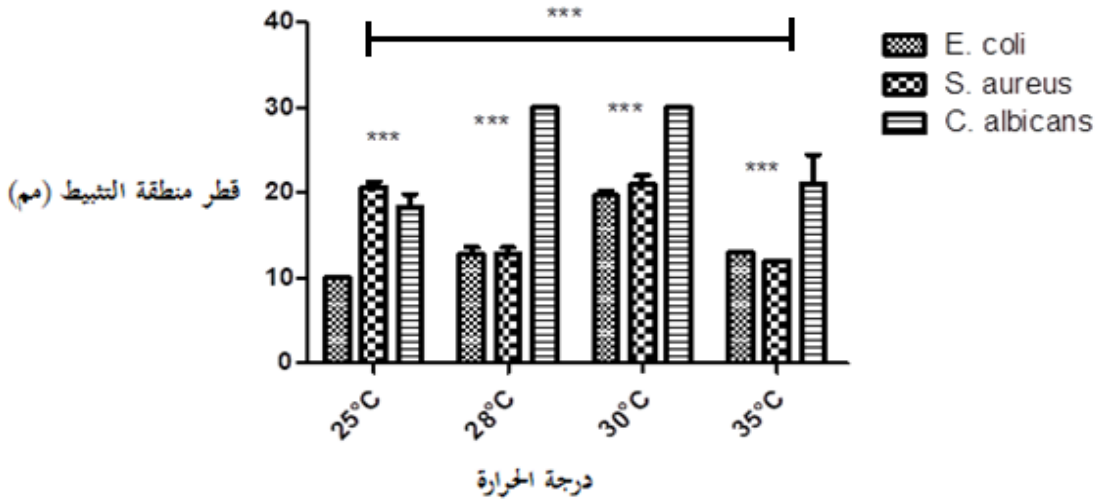
نسبة التطابق مع السلالة المرجعية*Aspergillus oryzae* SVP01 / التسلسل النكليوتيدي	% 94
GCGTAGGTGACCTGCGGAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCCTCGTGGAGCCCAACCTCCCACCCGTGT ATACTGTACCTTCGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTCATGGCCGCCGGGGGGCTTCTGCCCCCGGGCCCGCG CCCGCCGGAGACACATGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTCACACAATCAGTTAAAACT TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGC AGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCG AGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCCTCGTCCCCCCCGGGGGACGTGCCCGAAA GGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGCAGGCCCGGCCGG CGCTGGCCGACGCGAAAGCAACCATTTTTTCTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAAAAGCCGGAGGAAA	

III.4.تأثير بعض العوامل الفيسيولوجية على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات من طرف السلالة *A. oryzae* 18HG80

III.4.1. تأثير درجة الحرارة

تعتبر الحرارة من العوامل البيئية المهمة التي تؤثر على النمو وكذلك على إنتاج المستقلبات الثانوية. أظهرت نتائج تنمية الفطر في درجات مختلفة من الحرارة تباينا كبيرا ($p<0.0001$) في إنتاج الجزيئات الحيوية وتبين ذلك من خلال النشاطية المضادة للميكروبات. عززت زيادة درجات حرارة الحضن من 25 إلى 35 °م إنتاج المستقلبات

النشطة بيولوجيًا حيث تم تسجيل أقصى منطقة تثبيط عند 30 °م ضد الكائنات الحية الدقيقة المختبرة، خاصة بالنسبة لـ *C. albicans*، والتي لم يكن هناك فرق جد معنوي في التأثير عليها عند الدرجة 28°م (شكل 11).

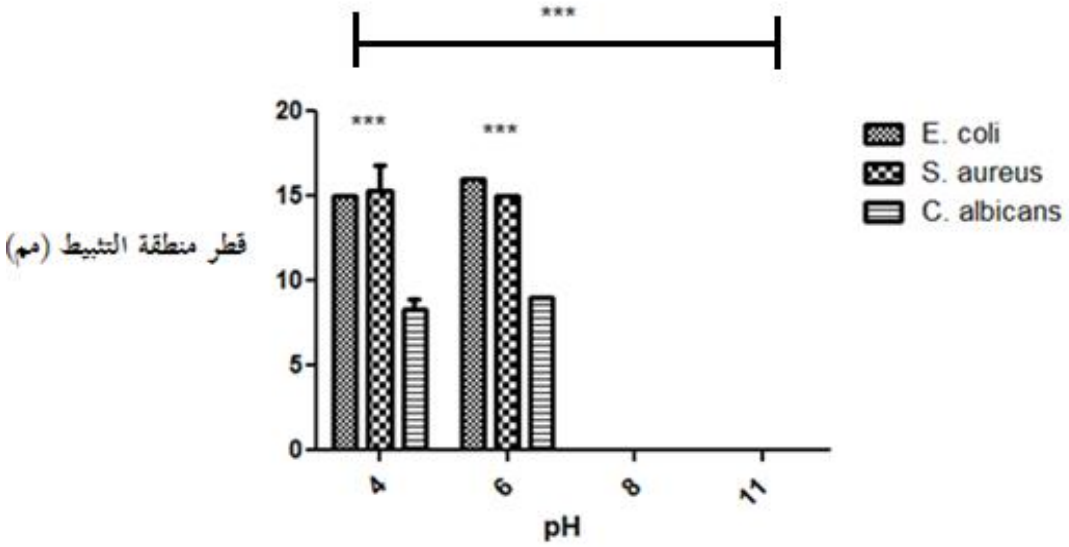


شكل 11. تأثير درجة الحرارة على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات

*** وجود فرق جد معنوي

III.2.4. تأثير الأس الهيدروجيني

لمعرفة قيم الأس الهيدروجيني المثلى لانتاج الجزيئات الحيوية، والتي شملت اختبار قيم مختلفة لـ pH وهي:4، 6، 8 و11، وتقدير النشاطية المضادة للميكروبات. تبين أن هناك فرق جد معنوي ($p<0.0001$)، حيث تم الحصول على أعلى نشاط مضاد للميكروبات عند الوسطين ذوي pH 4 و 6 ؛ أما بالنسبة للوسطين ذوي pH 8 و 11 فلم تلاحظ أي مناطق تثبيط لكل السلالات المختبرة (شكل12).



شكل 12. تأثير الأس الهيدروجيني على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات

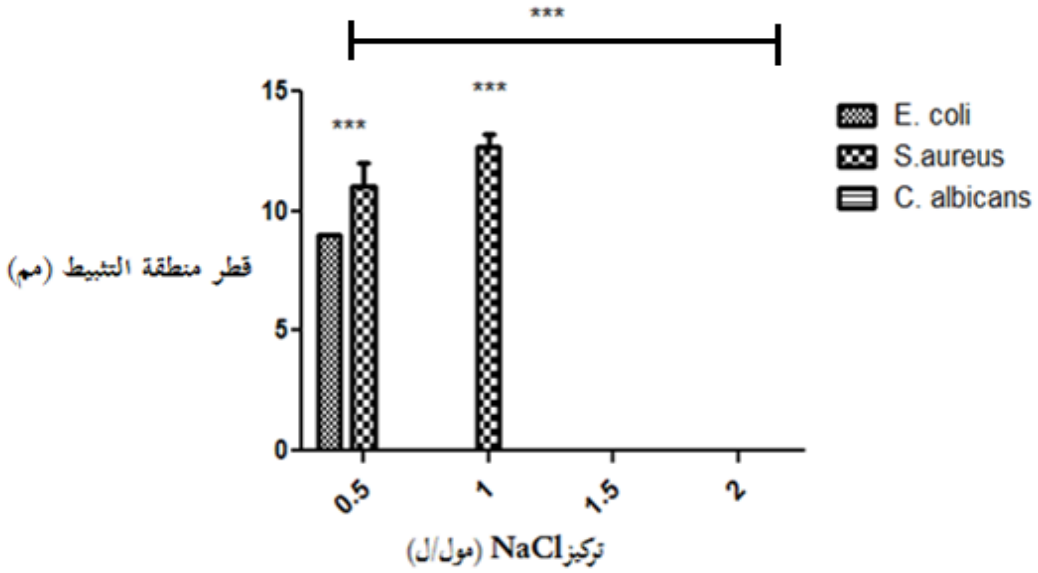
*** وجود فرق جد معنوي

III.3.4. تأثير درجة ملوحة الوسط

أظهرت زيادة تراكيز كلوريد الصوديوم من 0.5 مولار إلى 2 مولار أن الملوحة لها تأثير تثبيطي كبير على إنتاج الجزيئات الحيوية ذات النشاط ضد ميكروبي، حيث لوحظت نشاطية مضادة لـ *S. aureus* و *E. coli* عند 0.5 مولار، وفقط ضد *S. aureus* عند 1 مولار ، بينما لم يكن هناك أي تأثير ضد *C. albicans*، و كذلك عند التراكيز 1.5 و 2 مولار (الشكل 13).

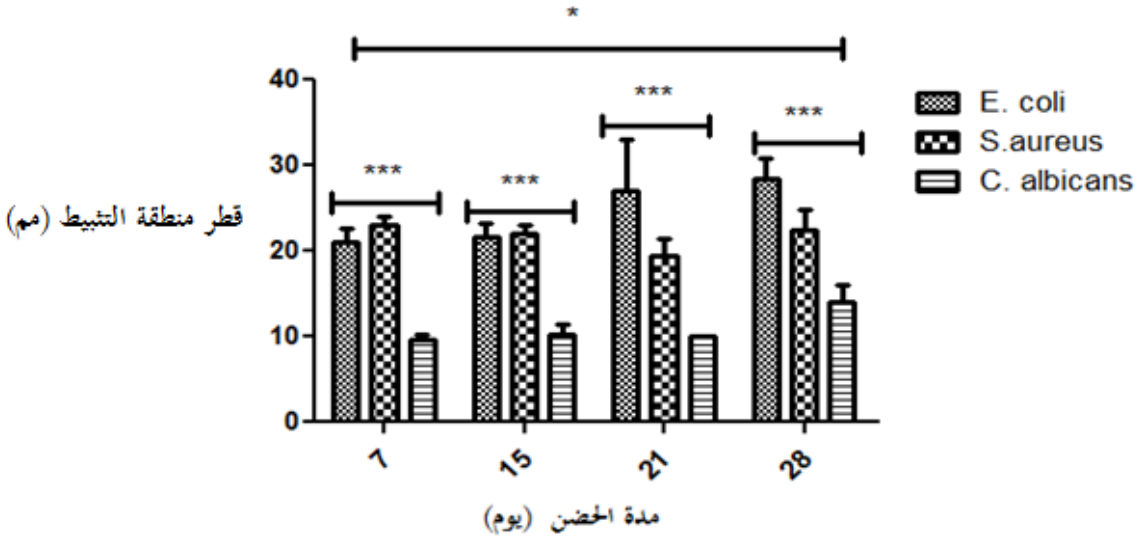
III.4.4. تأثير مدة الحضن

تمت متابعة إنتاج الجزيئات الحيوية من السلالة الفطرية قيد الدراسة، وذلك بتقدير النشاطية المضادة للميكروبات ، لمدة 28 يوما، وقد بينت النتائج الموضحة في الشكل (15) أن النشاطية المضادة للميكروبات تظهر بعد الأسبوع الاول من النمو، ويظل هذا النشاط مستقرًا بين 7-15 يومًا ثم يزداد في اليوم الحادي والعشرين ، ليصل إلى أقصاه في اليوم الثامن والعشرين من الحضن.



شكل13. تأثير تركيز NaCl على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات

*** وجود فرق جد معنوي



شكل 14. تأثير مدة الحضن على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات

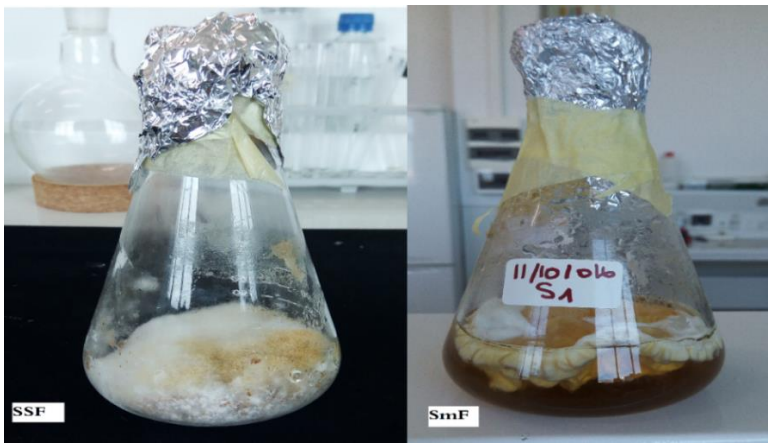
*** وجود فرق جد معنوي ; * وجود فرق معنوي

III.5.مقارنة بين استخلاص الجزيئات الحيوية باستعمال التخمر في الوسط السائل والتخمر في الحالة الصلبة

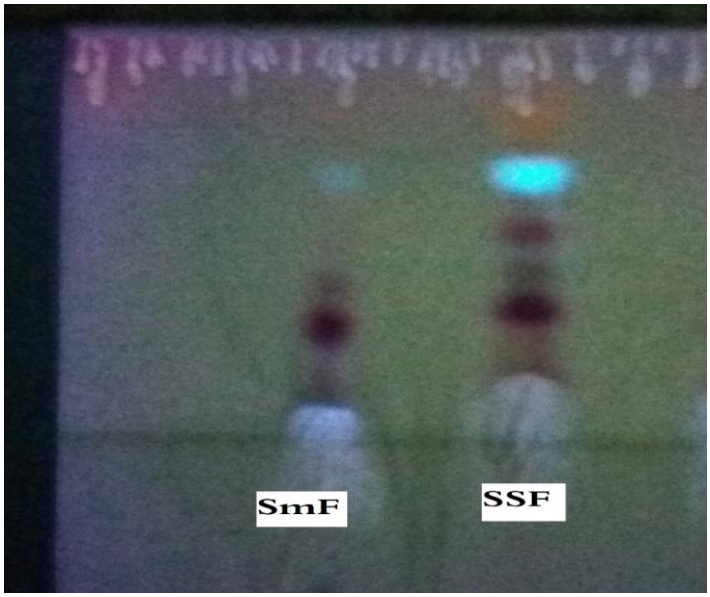
يمكن للسلالة *A. oryzae* 18HG80 النمو بشكل جيد على وسط عجينة نخالة القمح. حيث يلاحظ امتلاء الدورق. و تظهر المستعمرات بلون أصفر ذات شكل مسحوقي و غنية بالأبواغ، بالإضافة إلى ظهور مناطق بيضاء كثيفة و قطنية مع غياب تام للأجسام الحجرية. مقارنة مع نمو الفطر في وسط YES، حيث يظهر الميسيليوم بشكل كتلة بيضاء سميكة و صلبة(الشكل15).

III.5.1. الكشف الأولي للمركبات الحيوية بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

فحص المستخلص الخلوي المتحصل عليه من الوسطين (السائل والصلب) ، بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، و شوهدت الصفائح في الضوء المرئي و تحت الأشعة فوق البنفسجية UV عند طولي الموجة 254 و 365 نانومتر ، بعد المعاملة الكيميائية بكواشف خاصة . تبين من خلال ملاحظة الألواح ،ظهور خمسة بقع بالنسبة للوسط السائل (YES) ، بينما ظهرت نفس البقع بالنسبة لوسط التخمر الصلب (نخالة القمح)، إلا أنها ظهرت بلون أكثر شدة وومضان أقوى، إضافة إلى بقعة سادسة جديدة (شكل16) . يبين الجدول(6) قيم معامل الإنسياب (Rf) لكل بقعة.



شكل 15 . نمو فطر *A. oryzae* 18HG80 بعد التخمر في الوسط السائل(SmF) ووسط نخالة القمح الصلب (SSF)



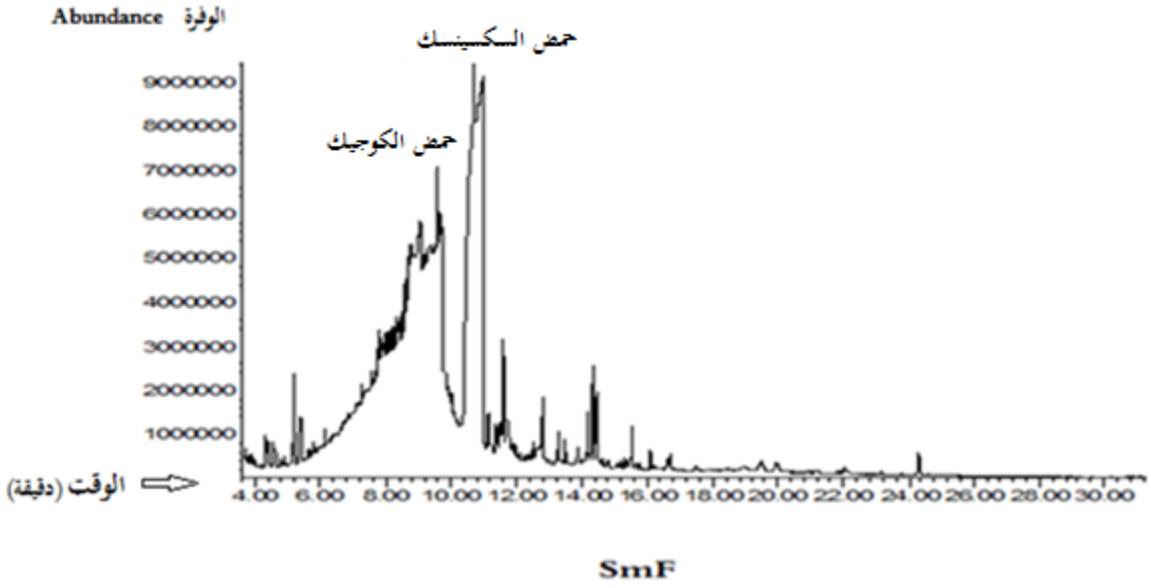
شكل 16. فصل المركبات باستعمال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة تحت 365نانومتر (UV)

جدول 6 . قيم معامل الإنسياب (Rf) لمختلف البقع في الوسطين السائل والصلب

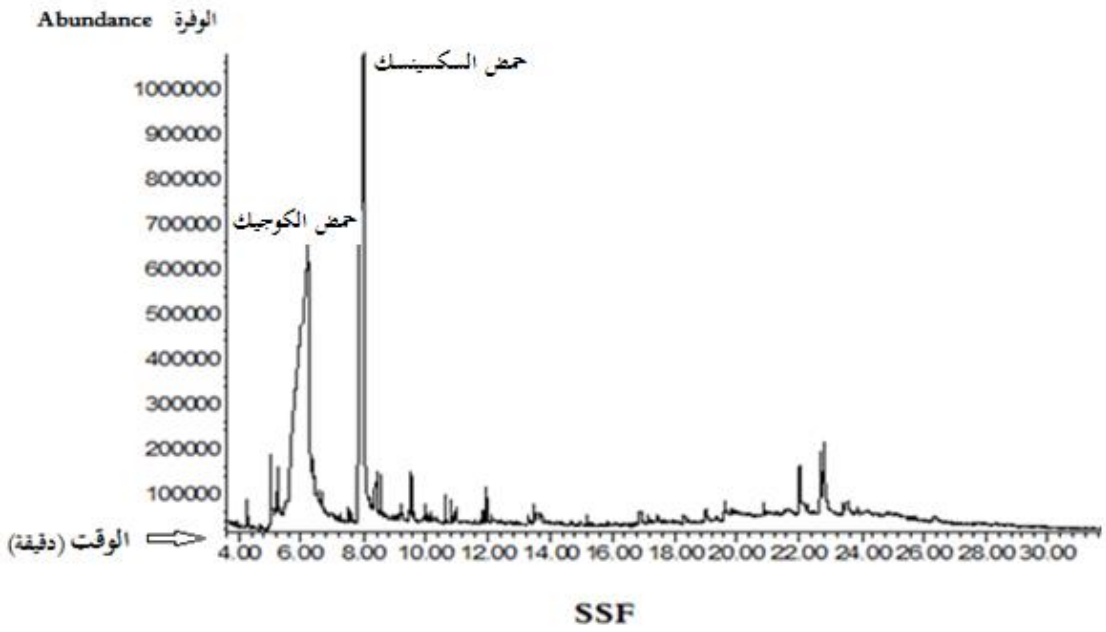
البقع	معامل الإنسياب (Rf)		لون البقع تحت أشعة UV (365 نانومتر)
	وسط التخمر السائل (SmF)	وسط التخمر الصلب (SSF)	
1	0.04	0.04	ومضان ابيض
2	0.54	0.54	بنفسجي داكن
3	0.61	0.61	بني فاتح
4	/	0.68	بنفسجي فاتح
5	0.76	0.76	ومضان أزرق فيروزي
6	0.87	0.87	برتقالي

III.2.5. تعريف الجزيئات الحيوية بواسطة كروماتوغرافيا الطور الغازي مع طيف الكتلة (GC/MS)

أظهرت نتائج كروماتوغرافيا الطور الغازي مع طيف الكتلة لمستخلصات الإيثيل أسيتات لكل نوع من التخمرات (Smf و SSF) والمبينة في الجدولين (7 و8) ، تباينا من حيث كمية ونوعية الجزيئات الحيوية المستخلصة. تم تعريف حوالي 104 مركب في مستخلص SmF، في حين تم تعريف 73 مركب في مستخلص SSF، وكان أبرزها حمضي السيكسينيك والكوجيك، إلا أن نسبتهما كانت أكبر نوعا ما في مستخلص SSF مقارنة مع مستخلص SmF، حيث كانت نسبة حمض السيكسينيك 42.284% في Smf و 48% في SSF، أما حمض الكوجيك فكانت نسبته 24.845 % في SmF و 25.097% في SSF. تم توضيح كروماتوغرام GC/MS لكلا المستخلصين في الشكلين (17و 18).



شكل 17. كروماتوغرام GC/MS لمستخلص فطر *A.oryzae* 18HG80 باستعمال تخمر الوسط السائل



شكل 18 . كروماتوغرام GC/MS لمستخلص فطر 18HG80 *A.oryzae* باستعمال تخمر الوسط الصلب

جدول7. الجزيئات الحيوية التي تم تعريفها في مستخلص 18HG80 *A. oryzae* باستعمال التخمر في الوسط السائل SmF

الرقم التسلسلي	وقت الإحتفاظ (RT) (الدقيقة)	إسم المركب	النسبة (%)
1	3.63	dl-3,4-Dehydroproline methyl ester	0.021
2	3.713	(+)-3,4-Dehydroproline amide	0.128
3	3.823	2-Propyn-1-amine, N-methyl	0.021
4	3.965	(+)-3,4-Dehydroproline amide 2,5-Dihydro-1H-pyrrole-2-carboxamide	0.012
5	4.458	1,7-Heptanediol	0.035

6	4.59	Dehydromevalonic lactone	0.107
7	4.637	Tetrahydrocyclopenta[1,3]dioxin-4 one	0.012
8	4.76	1H-Imidazole, 1-acetyl-	0.0141
9	4.898	1-Methoxy-2-methyl-3-butene	0.112
10	5	2-Pentyne	0.038
11	5.358	2-Coumaranone	0.306
12	5.405	4-Ethyl hydrogen itaconate-Ethoxy-2-oxoethyl)acrylic acid	0.412
13	5.621	Butanoic acid, 2-methyl-, 3-methyl -3-butenyl ester	0.010
14	6.121	Cyclohexanone, 2-methyl	1.622
15	6.426	3(2H)-Furanone, 2-(1-hydroxy-1-methyl-2-oxopropyl)-2,5-dimethyl	0.392
16*	**9.580**	**Kojic acid**	**24.845**
17	10.202	7-Oxabicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-one	0.028
18*	**10.655**	**Butanedioic acid (succinic acid)**	**42.284**
19	11.159	beta.-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro	0.678
20	11.352	Benzene acetic acid, 4-hydroxy-4-Hydroxybenzeneacetic acid	0.353
21	11.422	2-Furoic acid, oct-3-en-2-yl ester	0.200
22	11.502	3H-Pyrazol-3-one, 2,4-dihydro-2,4-Dimethyl	0.542
23	11.62	Boronic acid, ethyl-, bis(2-mercap toethyl ester	0.678
24	11.691	2,10-Dodecadien-1-ol, 3,7,11-trime thyl-, (Z)	0.865
25	11.903	Coumarin-6-ol, 3,4-dihydro-4,4,7-trimethyl	0.190
26	11.94	2-Pentenoic acid, 3-ethyl-, methyl ester	0.122
27	12.006	1-isopropyl-5-methylbicyclo[3.2.2] non-3-en-2-one	0.144

28	12.115	4(1H)-Pteridinone2-amino-6,7-dimethyl	0.126
29	12.221	Methylthiouracil	0.322
30	12.326	Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methyle thenyl)	0.214
31	12.454	1-(Ethylthio)-2-methoxybenzene	0.159
32	12.553	4-Methyl-6,7,8,9-tetrahydronaphtho [2,1b]thiophene	0.215
33	12.666	beta.-Ionon3-Buten-2-one, 4- (2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl	0.227
34	12.807	6-Acetamido-2-methylbenzothiazole N-(2-Methyl-1,3-benzothiazol-6-yl)acetamide	0.759
35	12.906	3-Amino-4-cyanoisoquinoline	0.121
36	13.273	5-Nitroso-2,4,6-triaminopyrimidine	0.309
37	13.339	Pentaborane(9), bromo	0.08
38	13.414	2-Naphthalenol, 5,6,7,8-tetrahydro 6-Hydroxytetralin	0.052
39	13.504	1,2-Cyclopentanedione,3,3,5,5-tetramethyl	0.234
40	13.586	5-Methyl-4-oxa-5-azadispiro [2.2.4. 1]undecane	0.088
41	13.893	Naphthalene, 1,8-dimethyl-1,8-Dimethylnaphthalene	0.0342
42	14.172	L-Leucine, N-cyclopropylcarbonyl-,methyl ester	0.536
43	14.46	(+-)Boschnialactone	0.615
44	14.61	Benzidine,3,3'-dimethoxy-[1,1'-Biphenyl]-4,4'-diamine, 3,3'-dimethoxy	0.085
45	14.671	5-Hydroxy-2-methylthiopyrimidine	0.038
46	14.756	Bicyclo[3.3.1]non-2-en-4-ol-9-one,1,4,8,8-tetramethyl	0.054
47	14.808	Pyrimidine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,5-[1-(2-aminophenylamino)propylidene]	0.0133
48	15.109	6(5H)-Pteridinone, 4-methyl	0.047

49	15.199	(Z)-2-[1-(2,5-Dimethyl-3-furyl)propyldene]-3-isopropylidenesuccinic anhydride	0.077
50	15.331	1,3-BUTADIENE, 1,1-DIPHENYL	0.094
51	15.397	6-(2-Chloroethoxy)-N-cyano-N',N'-dimethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	0.063
52	15.511	Benzenamine, 2,4,6-trimethyl	0.457
53	15.698	7,8-DIHYDROXY-.ALPHA.-DUNNIONE	0.04
54	15.783	5H-Indeno[2,1-E]1,2,4triazin-5-one , 3-hydrazino-, hydrazine	0.06
55	16.013	1-Cyclohexene-1-carboxaldehyde,4- (1-methylethenyl)	0.025
56	16.089	4-Methylformanilide	0.123
57	16.229	Cyclopentane, pentyl	0.11
58	16.371	3-Hydroxy-N'-(3-nitrobenzylidene) Benzhydrazide	0.018
59	16.39	4-[5-Methyl-2-(1-methylethylidene)cyclohexyl]-3-cyclohexen-1-one	0.06
60	16.607	1,3,5,7,9-Pentaazatricyclo[5.3.1.0 (4.11)]undecane-2,6-dione,9-(2-hydroxyethyl)-3,5-dimethyl	0.097
61	16.724	4,5,9,10-Tetrahydropyrene	0.172
62	16.814	Isobutyramide, N-(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)	0.045
63	17.002	4-[3-Methyl-1-(2-methyl-1-propenyl)-2-butenyl]-3-cyclohexen-1-one	0.014
64	17.073	Retinal Retinene E-Retinal Retinene1 Axerophthal	0.005
65	17.143	Bicyclo[4.1.0]heptane,-3-cycloprop yl,-7-carbethoxy, cis	0.018
66	17.473	1-(p-hydroxyphenyl)-2,3-dimethyl-4-(prop-2-yl)-2,5-dihydropyrazole-5-one	0.057
67	17.553	Propenamide,2-cyano-N-isopropyl-3-(3,4 dimethoxyphenyl)	0.025
68	17.671	5-Methyl-4-oxa-5-azadispiro[2.2.4.1] undecane	0.019

69	17.892	1-(1'-Hydroxy-2',2',6'-trimethyl-4'oxocyclohexyl) butan-2-one	0.034
70	17.996	Tricyclo[6.3.3.0]tetradec-4-ene,10,13-dioxo	0.009
71	18.085	Methoxamine Benzenemethanol, lpha.-(1-aminoethyl)-2,5-dimethoxy	0.01
72	18.104	Cyclopentane, 2-n-octyl	0.005
73	18.203	5,8-Methano-4H-3,1-benzoxazine-2-thione,1,2,4a-rel,5-trans,6,7,8-cis,8a-cis-octahydro	0.034
74	18.349	7-Amino-1,4-dimethylpyrimido[4,5-c]pyridazine-3,5-(1H,2H)-dione	0.027
75	18.448	Decanoic Acid, 2,2,2- trifluoroethwxyl ester	0.081
76	18.449	5-Hydroxymethyl uracil	0.07
77	18.759	PALLADIUM,BIS[(1,2,3-.ETA.)-2 PENTENYL]	0.021
78	19.146	Germacrene A	0.02
79	19.173	Propanedinitrile,1-(1-cycloocten-1-yl)-1-(1 cyclopenten-3-on-1-yl)	0.031
80	19.291	5-Acetyl-2-methylpyridine4-propyl-3 thiosemicarbazone	0.022
81	20.255	5-Benzofuranacetic acid,6-ethenyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-3,6-dimethyl-.alpha.-methylene-2-oxo-, methyl ester	0.022
82	20.345	1R,3Z,9s-4,11,11-Trimethyl-8-methylenebicyclo[7.2.0]undec-3-ene	0.011
83	20.515	Cyclopenta[c]pyran-1(4aH)-one,5,6,7,7a-tetrahydro-4,7-dimethyl	0.02
84	20.883	Triethylenemelamine1,3,5-Triazine,2,4,6-tris(1-aziridinyl)	0.033
85	21.056	(+)-Grandisol	0.007
86	21.193	1-(2-Nitrobenzyl)isoquinoline	0.012
87	21.254	Aristolone	0.012

88	21.41	1,1-Di-D3-Methyl-4A-Methyl1,2,3,4,4A,10,10A-Octahydro-2 Oxyphenantherene	0.004
89	21.716	phenanthro[9,10-c]furan-Oxa-2H cyclopenta[l]phenanthrene	0.005
90	21.815	Phosphine oxide, triphenyl-Triphenylphosphine oxide	0.0018
91	21.951	1,4-Naphthalenedione,5,8-dimethoxy-1,4-Naphthoquinone, 5,8-dimethoxy	0.0013
92	22.055	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	0.042
93	22.149	1-Methyl-3-phenyl-4-formyl-1,3(2H-dihydroimidazole-2-thione	0.017
94	22.714	5-Benzofuranacetic acid,6-ethenyl-2,4,5,6,7,7a-hexahydro-3,6-dimethyl-.alpha.-methylene-2-oxo-, methyl ester	0.004
95	23.147	1,2-Benzisothiazole, 3-methoxy	0.013
96	23.698	3,7,11,15-Tetramethylhexadeca-1,6,10,14-tetraen-3-ol	0.002
97	23.802	1-Propene,2-nitro-3-(1-cyclooctenyl)1-(2-Nitro-2-propenyl)-1-cyclooctene	0.011
98	24.324	1H-Purin-2-amine,6-methoxy-2-Amino-6-methoxypurine	0.168
99	24.484	TRANS-.GAMMA.-BISABOLENE	0.001
100	24.569	p-(Methylthio)benzyl alcohol	0.007
101	25.32	Dodemorph	0.008
102	30.74	4-Allyl-5-furan-2-yl-2,4-dihydro-[1,2,4]triazole-3-thione	0.009
103	30.775	Cheilanth-13(14)-enic Methyl Ester	0.006
104	31.439	Benzenemethanol,alpha.-ethynyl-.alpha.-phenyl	0.002

*المركبات الموجودة بأعلى نسبة تظهر بخط داكن.

جدول 8. الجزيئات الحيوية التي تم تعريفها في مستخلص *A. oryzae* 18HG80 باستعمال التخمر الحالة الصلبة SSF

الرقم التسلسلي	وقت الإحتفاظ (الدقيقة) (**RT**)	إسم المركب	النسبة (%)
1	4.225	2,5-Difluorophenylhydrazine	0.421
2	5.167	4-Ethyl hydrogen itaconate2-(2-Ethoxy-2-oxoethyl)acrylic acid	0.758
3	5.240	Benzeneacetic acid	0.785
4	**6.303**	**Kojic acid**	**25.097**
5	6.656	Benzaldehyde, 3-hydroxym-Formylphenol -Benzaldehyde, m-hydroxy	0.218
6	7.501	-Benzenemethanol, 4-methoxyAnise alcohol	0.268
7	7.586	Naphthalene, 2-ethylbeta.-Ethylnaphthalene2-Ethylnaphthalene	0.110
8	7.619	Glutaric acid, di(4-methoxy-2-methylbutyl) ester	0.094
9	**7.981**	**Butanedioic acid (Succinic acid)**	**48**
10	8.395	5-Oxohexanethioic acid, S-t-butyl-ester	2.326
11	9.250	4,11-Dioxa-3,5-dimethyltetracycloundecane	0.430
12	9.474	5,5 Dimethyl-3-vinyl cyclohex-2-en -1-one	0.354
13	9.529	Naphthalene, 1-(1-cyclopenten-1-yl)	0.688
14	9.608	Diethyl Phthalate1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester	0.357
15	9.902	3-Ethoxyacrylonitrile	0.103
16	9.960	Benzo[b]thiophene-2-ol-1-Benzothiophen-2(3H)-one	0.347
17	10.065	Cyclopentane, pentyl	0.248
18	10.165	3,4-Dihydroxypropiophenone	0.206
19	10.287	Acetaldehyde, methyl(2-propenyl)hydrazine	0.155
20	10.652	Naphazoline	0.349
21	10.793	4-Acetoxycinnamic acid p-Acetoxycinnamic acid	0.286
22	10.845	Phenol, 2,5-dichloro-4-methoxy	0.059
23	10.890	3,3'-Bis(1,2,4-oxadiazolyl)-5,5'-diamine	0.094
24	10.961	4-Methoxy-2-methyl-1-(methylthio)benzene	0.171

25	10.994	9-Amino-6-[methylthio]-9H-purine6-(Methylsulfanyl)-9H-purin-9-amine	0.267
26	11.588	Carbonic acid, pentadecyl propyl ester	0.085
27	11.735	Bicyclo[2.2.2]octane, 1-fluoro-4-methyl	0.063
28	11.801	6-Acetamido-2-methylbenzothiazole	0.182
29	11.847	3-Acridinol	0.251
30	11.959	Flopropione	0.589
31	12.149	6-Oxabicyclo[3.1.0]hexan-3-one, 2, 2,4,4-tetramethyl	0.148
32	12.426	6-Methoxycoumaran-3-one	0.075
33	13.289	Propanedinitrile, 2,4,6-cyclohepta trien-1-ylidene	0.309
34	13.493	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)	1.259
35	13.669	Cyclohex-2-enone, 3-(N',N'-dimethylhydrazino)	0.276
36	14.678	8-Methyl-6-nonenoic acid	0.228
37	15.000	Methoxsalen	0.109
38	15.185	5-(t-Butyl)-3,3-dimethyl-4-(benzyl)thiophen-2(3H)-one	0.210
39	15.382	Ethyl undecyl carbonate	0.095
40	15.883	1H-Pyrrole, 1-[2-(adamantan-1-ylox y)ethyl]	0.136
41	16.056	2-Propenoic acid, 3-(2-thienyl)	0.034
42	16.686	6-Methyl-3-nitro-2(4H)-pyridone	0.116
43	16.788	Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8 dimethyl-2-(1-methylethenyl)-, [2R (2.alpha.,4a.alpha.,8 a.beta.)]	0.122
44	16.901	Benzene, 2-(2-isothiocyanatopropyl)-1,4-dimethoxy	0.341
45	17.010	Methyl 2-octylcyclopropene-1-hepta noate	0.125
46	17.150	Cyclopropanecarboxylic acid, 2-(2- methyl-1-propenyl)-, methyl ester	0.266
47	17.284	1,2,3,4-Tetramethylanthracene	0.126
48	17.422	1H-Benzocyclohepten-7-ol, 2,3,4,4a ,5,6,7,8-octahydro-1,1,4a,7-tetramethyl	0.167
49	17.467	Tetracyclo[4.4.1.1(7,10).0(2,5)]do dec-3-en-11-ol	0.148
50	18.310	2-(2-Hydroxypropionyl)phenylglyoxy lic acid, methyl ester	0.158

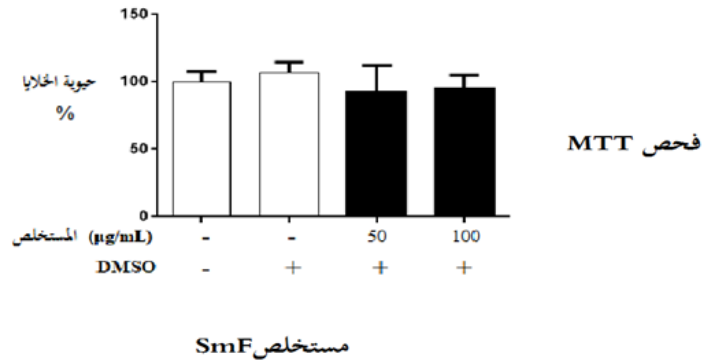
51	18.438	5-Hydroxy-2-nitrobenzaldehyde-6 -Nitro-3-hydroxybenzaldehyde	0.064
52	18.854	N-(5-Fluoro-tricyclo[2.2.1.0*2,6*] hept-3-yl)-acetamide	0.063
53	19.005	Ergotaman-3',6',18-trione, 9,10-di hydro-12'-hydroxy-2'-methyl-5'-(phenylmethyl)-, (5'.alpha.,10.alpha)	0.423
54	19.162	1,4-Dioxaspiro[4.6]undec-6-ene	0.068
55	19.295	9-Oxa-bicyclo[3.3.1]nonane-2,6-dione	0.156
56	19.808	1,18-Nonadecadien-7,10-dione	0.244
57	19.876	[(2E)-3,7-Dimethyl-2,6-octadienylo xy]methylbenzene	0.458
58	19.943	(3aR*,7aR*)-7a-But-3'-ynyl-3a-meth yloctahydro-5H-inden-5-one	0.276
59	20.073	Methyl - tetrahydro - naphthyl – tetralin	0.027
60	21.574	(3E,5E,7E)-6-Methyl-8-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexenyl)-3,5,7-octatrien-2-one	0.241
61	22.042	ester Phthalic acid, di(2-propylpentyl)	1.180
62	22.151	2,2-Dimethylmegastigma-4,6,8-trien -3-one	0.384
63	22.245	Cantleyine	0.340
64	22.469	1H-Cycloprop[e]azulene, decahydro- 1,1,4,7 tetramethyl,[1aR(1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,7.beta., 7a.beta. 7b.alpha.)]	0.190
65	22.679	Heliannuol E	1.723
66	22.808	1,3-Dimethyl-5-(5-methylfurfurylid en)-hexahydropyrimidin-2,4,6-trion	2.956
67	23.443	(Z)-8-Hydroxy-4,7-dimethyl-oct-6-enoic acid lactone	0.317
68	23.541	Glaucyl alcohol	0.586
69	23.897	2-Methyl-6-(5-methyl-2-thiazolin-2 -ylamino)pyridine	0.218
70	24.080	Biphenyl	0.027
71	24.826	Formic acid, (4-fluoro-3-nitrophenyl)methyl ester	0.011
72	26.372	1-(2-Nitrophenyl)pyrrole 1-(2-Nitrophenyl)-1H-pyrrole	0.111

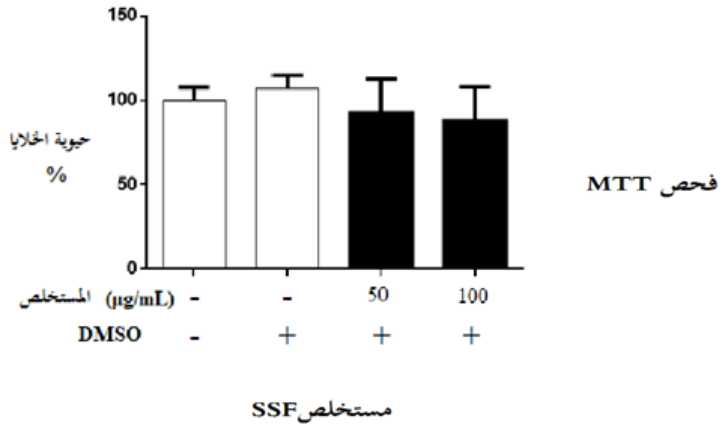
73	26.409	Decanynoic acid-2	0.029

*المركبات الموجودة بأعلى نسبة تظهر بخط داكن.

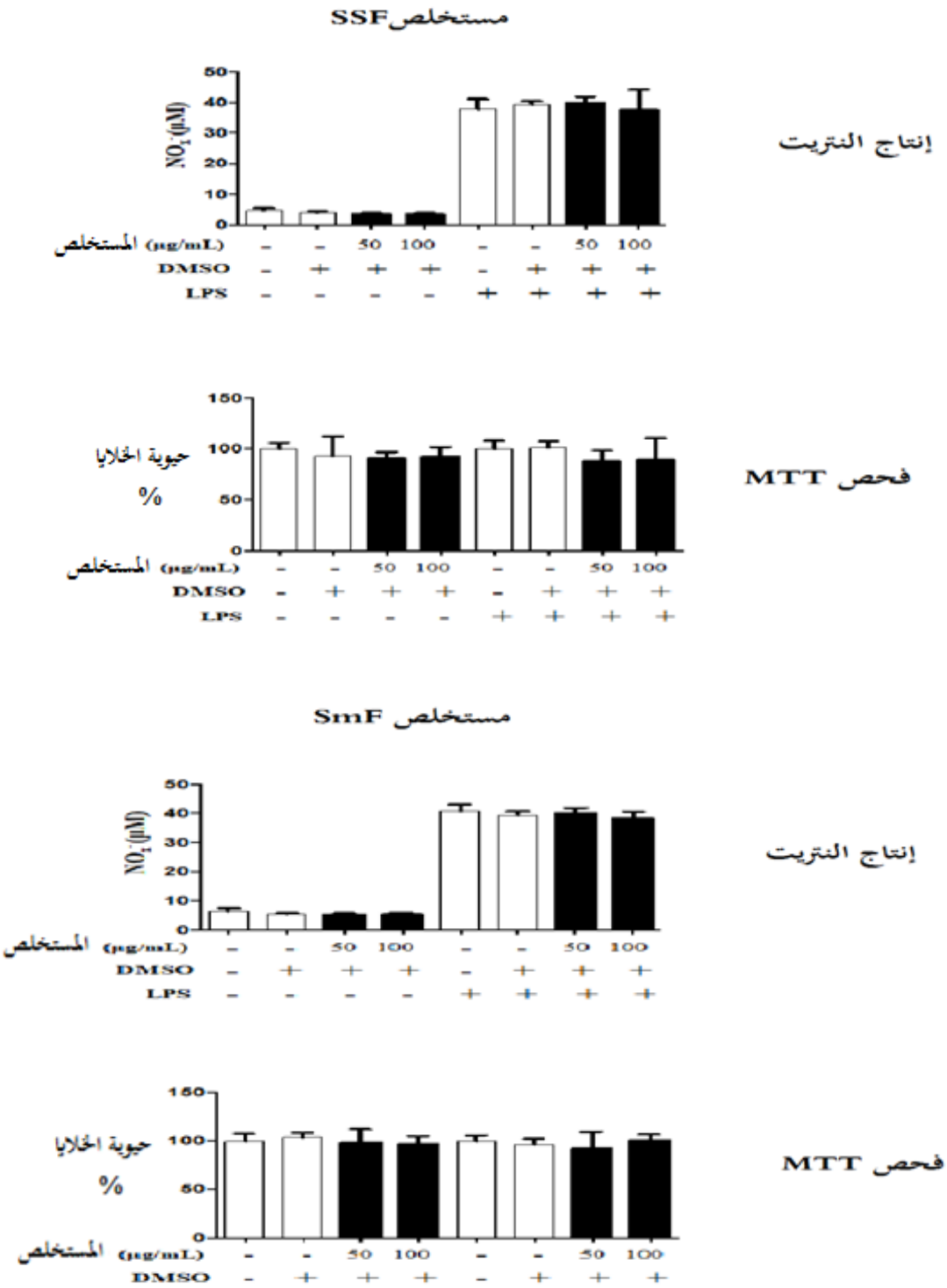
III.6. تقييم السمية الخلوية للمستخلصين SmF و SSF

من خلال النتائج المتحصل عليها والمبينة في الشكلين (19 و20)، يلاحظ أن التخافيف المختلفة للمستخلصين لم تبد أية سمية سواء على المزارع الخلوية للخلايا البالغة RAW264 أو خلايا Caco-2.





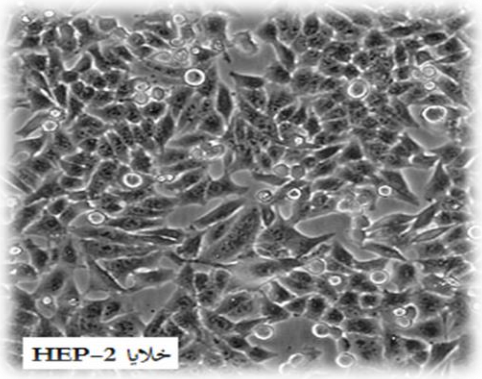
شكل19. اختبار السمية الخلوية في الزجاج لمستخلصات SSF و SmF في خلايا Caco-2



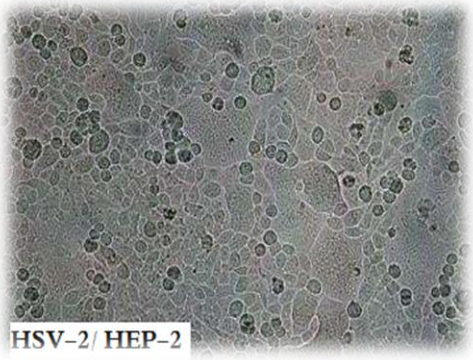
شكل 20 . الخواص المناعية لمستخلصات SSF و SmF على إنتاج أكسيد النيتريك في خلايا RAW 264

III.7.اختبار النشاطية المضادة للفيروسات

من خلال المراقبة اليومية ولمدة 4 أيام للصفائح، تحت المجهر المقلوب، لم يتم تسجيل أي تأثير للمستخلصين على الفيروس المختبر،وقد تم الإستدلال على ذلك من خلال ملاحظة تشوه الخلايا (أي كان هناك تأثير اعتلال خلوي) مقارنة مع الشواهد (شكل21). يرجح ذلك إلى كون الفطر لا يملك خاصية مضادة للفيروسات، أو أن التراكيز المستعملة للإختبار كانت ضعيفة.



-أ-



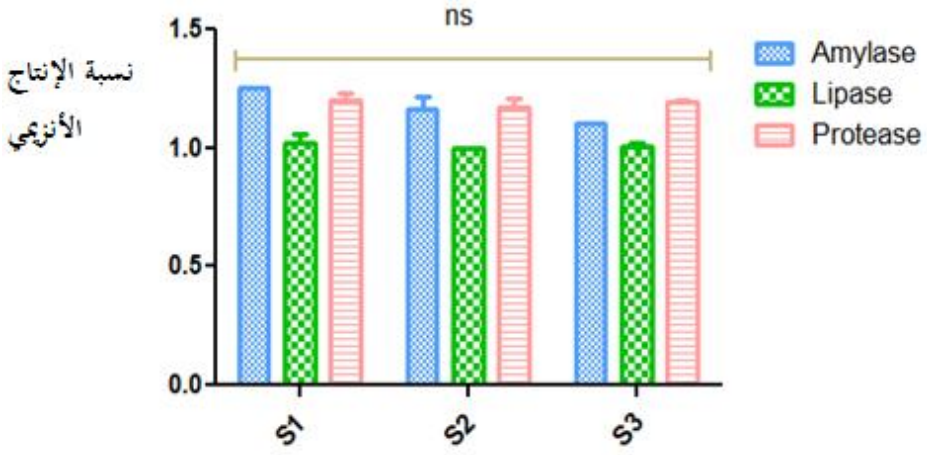
-ب-

شكل 21. تأثير الاعتلال الخلوي للفيروس

أ: خلايا سليمة ، ب : خلايا معتلة

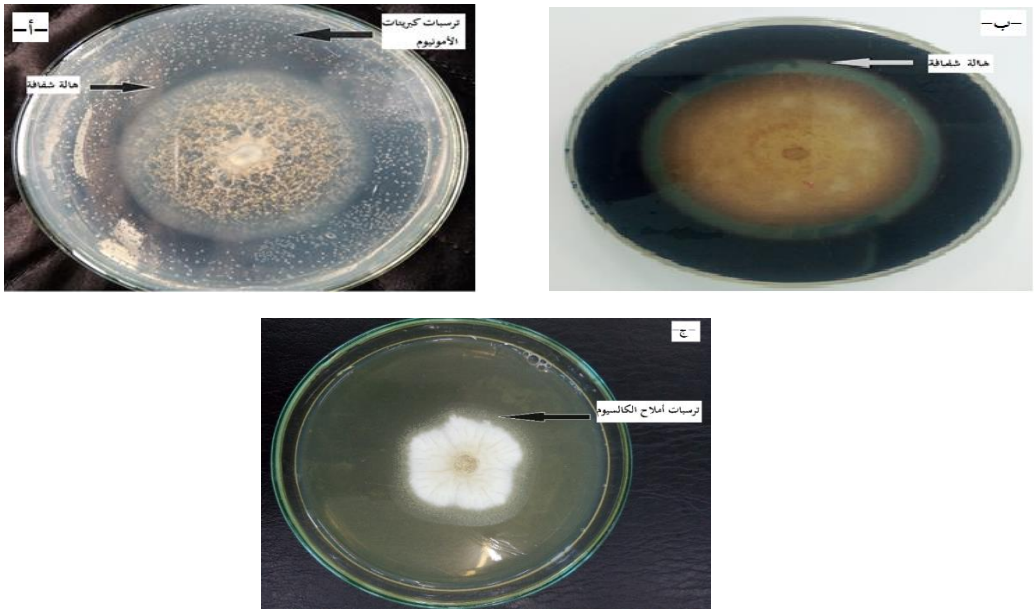
III.8.النشاطيـــــة الأنزيميـــة

أوضحت النتائج المتحصل عليها في هذا الإختبار، أن العزلات الثلاث للفطر قادرة على إنتاج الأنزيمات الحالة (الليباز، الأميلاز و البروتياز)، وبعد حساب المؤشر الأنزيمي الذي يعبر عن قوة النشاطية الأنزيمية و مقارنة متوسطات المؤشرات الأنزيمية بين السلالات على كل أنزيم مختبر، لم يسجل أي فرق معنوي بين السلالات (الشكلين 22، 23).



شكل 22 . مقارنة نسبة الإنتاج الأنزيمي بين العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae*

ns: لا يوجد فرق معنوي

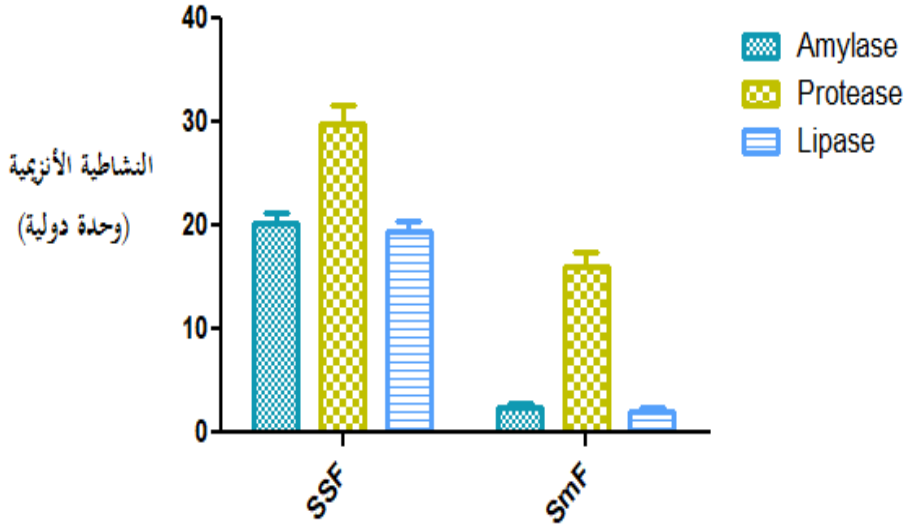


شكل 23. النشاطية الأنزيمية لفطر *A. oryzae*

-أ- نشاطية البروتياز، **-ب-** نشاطية الأميلاز، **-ج-** نشاطية الليباز

III.9. مقارنة إنتاج الأنزيمات باستعمال التخمر في وسط سائل (SmF) والتخمر في الحالة الصلبة (SSF)

تم استخدام عمليتي تخمر (SSF و Smf) للمقارنة بينهما في قدرة إنتاج الأنزيمات من طرف السلالة *A. oryzae* 18HG80 . النتائج التي تم الحصول عليها والمبينة في الشكل(24)، أشارت إلى أن كفاءة الإنتاج كانت أعلى في SSF عنها في Smf لجميع الأنزيمات المختبرة ($p<0.0001$) بصورة مضاعفة.



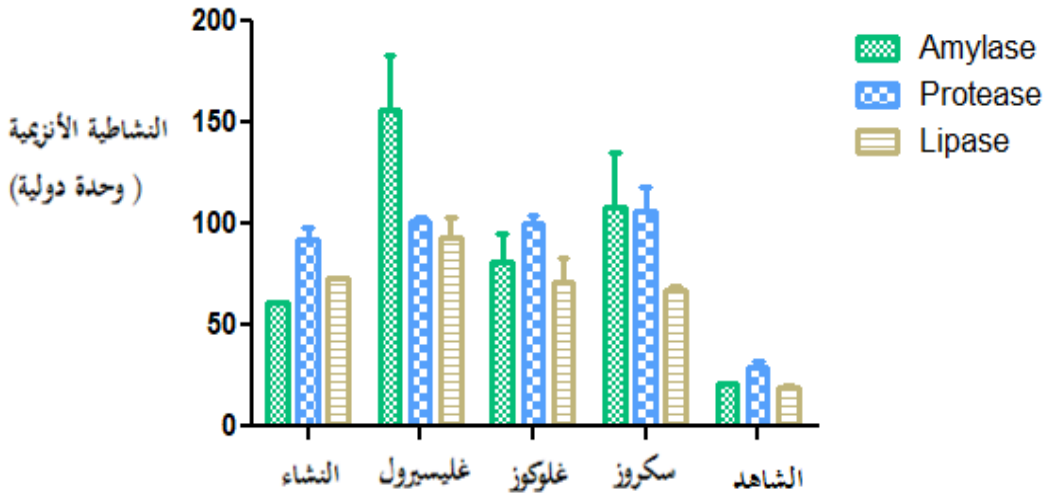
شكل 24 . مقارنة إنتاج الأنزيمات بين استعمال التخمر السائل والتخمر الصلب

III.10. تحديد بعض الظروف المثلى لإنتاج أنزيمات الليباز، الأميلاز والبروتياز باستعمال التخمر الحالة الصلبة

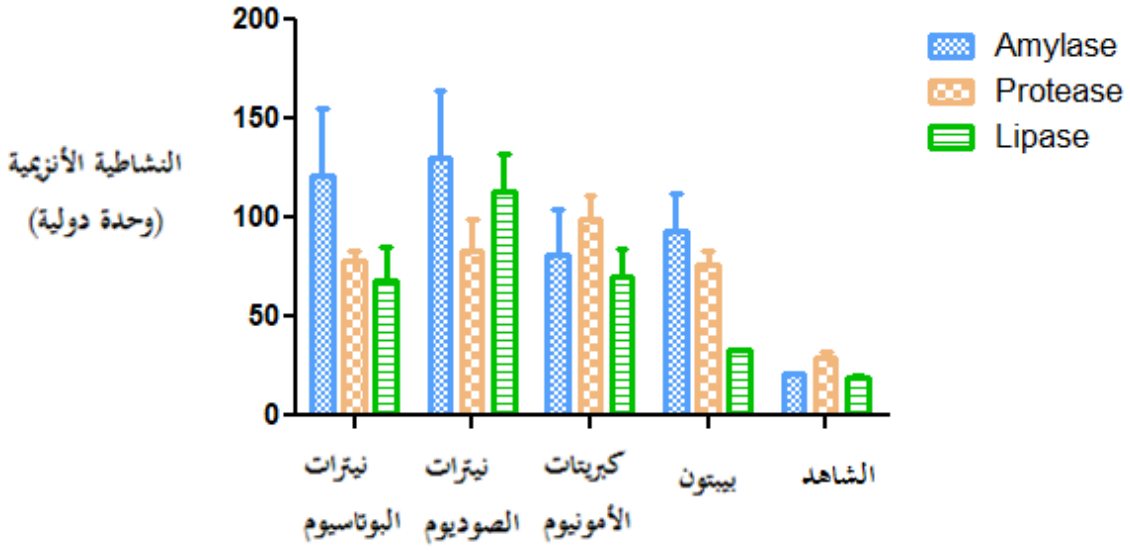
III.10.1. تأثير مصدر الكربون والنيتروجين

أظهرت النتائج المبينة في الشكل (25) أن إضافة أي مصدر من المصادر الكربونية أو النيتروجينية المختبرة للوسط يحفز بشكل كبير نشاطية الأنزيمات الثلاث مقارنة مع الشاهد. وقد كانت أعلى قيم إنتاج أنزيم الأميلاز في وجود الغليسيرول كمصدر كربوني، حيث بلغت نشاطيته (155.71±27.209) وحدة دولية. أما بالنسبة لأنزيم البروتياز والليباز فلم يكن هناك فرق معنوي بين المصادر الكربونية المستعملة في التأثير على نشاطية الأنزيمين.

أما بالنسبة لتأثير مصادر مختلفة للنيتروجين، فقد أوضحت النتائج المبينة في الشكل (26) أن أفضل مصدر نيتروجيني لنشاط أنزيمي الأميلاز والليباز هو نيترات الصوديوم ، إذ بلغت نشاطيتهما 130.055 و 113.33 وحدة دولية على الترتيب. في حين بينت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين المصادر النيتروجينية الأخرى المستعملة في تأثيرها على نشاط الأنزيمات.



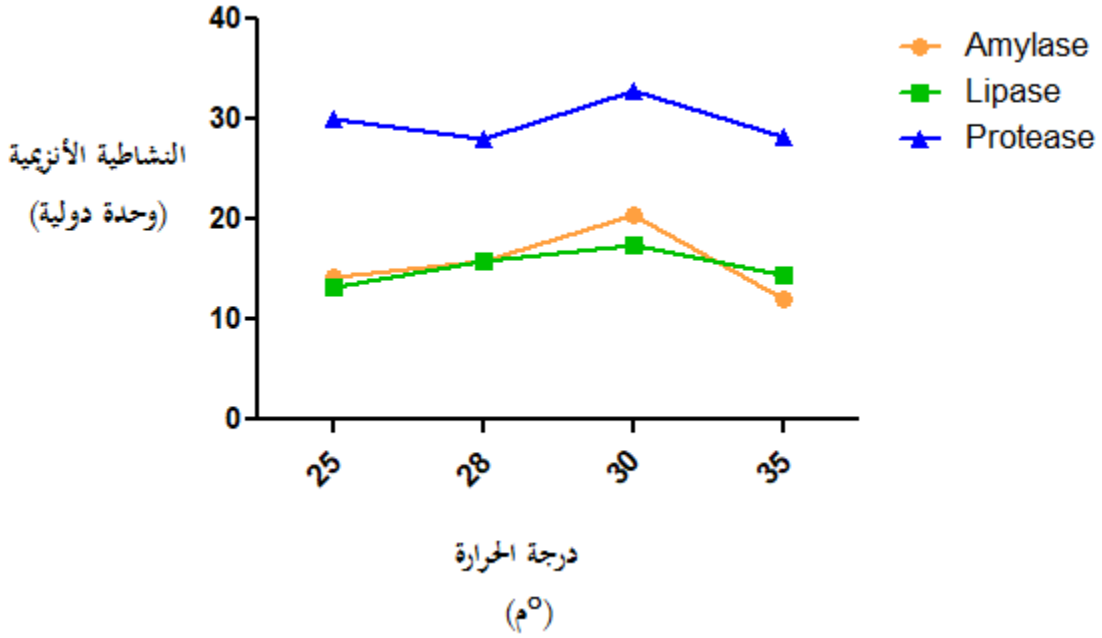
شكل 25 . تأثير مصادر كربونية مختلفة على النشاطية الأنزيمية



شكل26 . تأثير مصادر نيتروجينية مختلفة على النشاطية الأنزيمية

III.2.10. تأثير درجة الحرارة

بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق جد معنوية في تأثير درجات الحرارة المختلفة على نشاطية الأنزيمات ($p<0.0001$). تشير النتائج الموضحة في الشكل (27) أن أعلى نشاط أنزيمي كان عند درجة 30°م ، إذ بلغت نشاطية الأنزيمات 20.415 ، 17.43 و 32.77 وحدة دولية لكل من أنزيم الأميلاز، الليباز و البروتياز على التوالي. كما لوحظ أيضا من خلال النتائج انخفاض النشاطية الأنزيمية للأنزيمات الثلاث عندما ترتفع درجة الحرارة إلى 35°م.



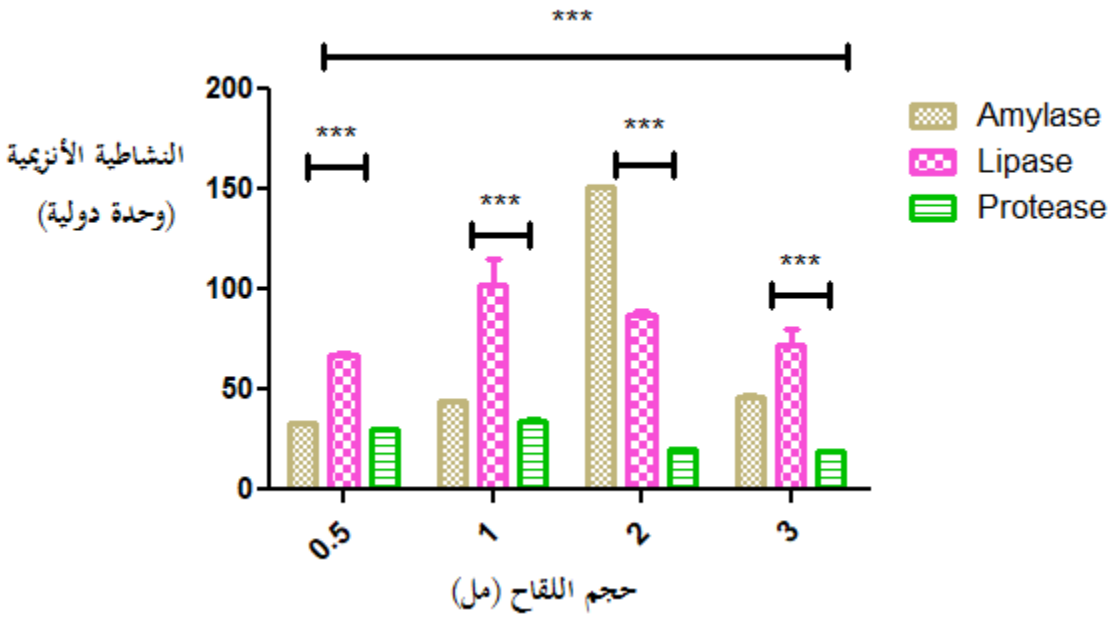
شكل 27 . تأثير درجة الحرارة على نشاطية الأنزيمات

III.10.3. تأثير حجم اللقاح

لمعرفة تأثير حجم اللقاح الأمثل على نشاطية الأنزيمات، تم تلقيح أوساط نخالة القمح بأحجام مختلفة من اللقاح الفطري من 0.5-3 مل ذات تركيز 6.4x 10^6 خلية/مل. تشير النتائج الموضحة في الشكل(28) وجود فرق جد معنوي ($p<0.0001$)، وهذا حسب كل أنزيم ،إذ كانت نشاطية أنزيم الأميلاز أفضل عند استخدام حجم اللقاح 2مل (150.99 وحدة دولية)، أما بالنسبة لأنزيمي البروتياز والليباز فكان حجم اللقاح 1مل هو الأمثل حيث بلغت نشاطيتهما 33.96 وحدة دولية و 101.835 وحدة دولية على الترتيب.

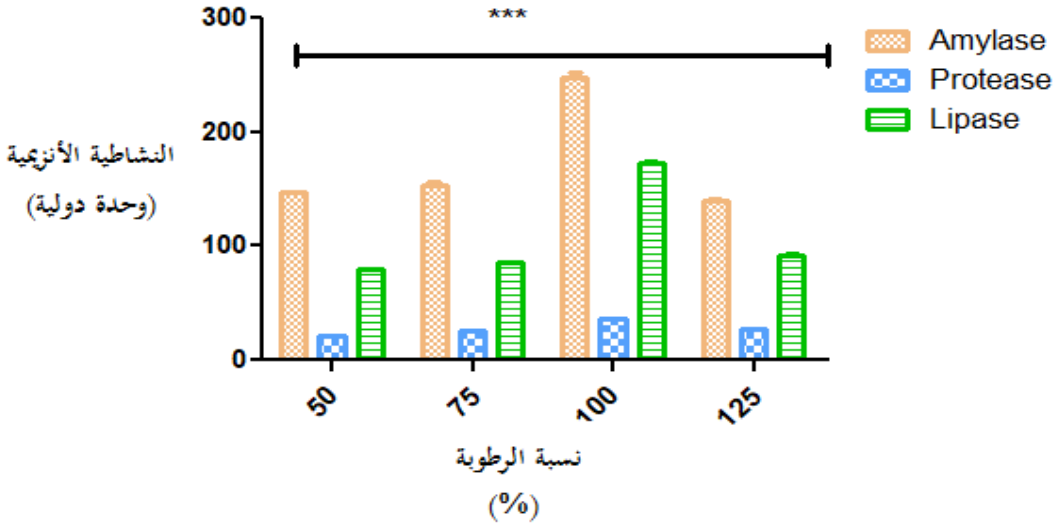
III.10.4. تأثير نسبة الرطوبة

أظهرت النتائج المتحصل عليها والمبينة في الشكل (29)، وجود فرق جد معنوي واضح بين نسب الرطوبة المستعملة ($p<0.0001$)، حيث كانت نشاطية الأنزيمين الأميلاز و الليباز أفضل في الوسط المرطب بنسبة 100 % مقارنة مع النسب الأخرى أما البروتياز فلم يبد أي فرق معنوي بين النسب.



شكل 28 . تأثير حجم اللقاح على النشاطية الأنزيمية

*** وجود فرق جد معنوي



شكل 29 . تأثير نسبة الرطوبة على النشاطية الأنزيمية

*** وجود فرق جد معنوي

الفصل IV

المنـــــاقشـــــة

المنـــــــــــاقشة

من بين الإستراتيجيات المتبعة للبحث عن جزيئات حيوية جديدة ، هو استكشاف النظم البيئية التي لم تدرس من قبل أو تمت دراستها بشكل قليل، خاصة النظم البيئية ذات عامل أوعدة عوامل شديدة مثل الملوحة، الأس الهيدروجيني...إلخ. من بين هاته النظم البيئية السبخات (بيئات ذات أتربة مالحة)، والتي تتضمن مناطق نادرة في العالم، وتعتبر بيئات محفزة لعزل فطريات تكون مصدر لمركبات حيوية جديدة ذات نشاطية مضادة للميكروبات (Boughachiche *et al.*,2005). عملت الجزيئات الحيوية الطبيعية والمستخلصة من الفطريات بشكل خاص كعمود أساسي لتطوير عوامل مضادة للبكتيريا والفيروسات (Hussain *et al.*, 2014). حيث تعرف الفطريات بشكل جيد بقدرتها على إنتاج مركبات حيوية طبيعية والتي تمثل 20% من الجزيئات الحيوية المنتجة من طرف الأحياء الدقيقة بشكل عام (Silber *et al.*, 2016). فلقد كان اكتشاف البنسلين ثورة حقيقية في الطب ، ومنذ ذلك الوقت استمر الاهتمام البحثي باستكشاف عوامل جديدة مضادة للميكروبات من الكائنات الحية الدقيقة (Almaqtri and Al-fakih، 2019).

IV.1.النشاطية المضادة للميكروبات لفطر *A. oryzae*

أظهرت العزلات الثلاث لفطر *A. oryzae* نشاطية مضادة للميكروبات، ويعزى هذا النشاط المثبط إلى إمكانية إنتاج هذه العزلات لمركبات ذات نشاط بيولوجي مثبط لنمو الكائنات الممرضة في أوساط الزرع

(Naik *et al.*, 2009). تتوافق هذه النتائج مع تلك المتحصل عليها من طرف Beharka و Nagaraja (1998)، في دراستهم بإضافة فطر *A. oryzae* كمضافات غذائية لأعلاف الحيوانات حيث وجدوا أنه يثبط

نمو البكتيريا والفطريات الملوثة للعلف. نفس النتائج أشار إليها أيضا Sadrati *et al.* (2013) من خلال دراستهم للنشاطية المضادة للميكروبات لفطريات داخلية.

من جهة أخرى يرجح أن الجزيئات الحيوية ذات نشاطية مضادة للميكروبات المستخلصة بواسطة الإيثيل أسيتات لها القطبية التي تسمح لها باستخلاصها بهذا المذيب، و هذا ما تم إثباته في دراسة لمقارنة بين عدة مذيبات عضوية في استخلاص الجزيئات الحيوية، حيث وجد أن الإيثيل أسيتات هو الأحسن (Meenupriya, Thangara and 2010).

حسب Ponec *et al.* (2003)، تصنف حساسية الكائن الدقيق حسب قطر التثبيط : كائن دقيق معدوم الحساسية عند قطر أقل من 8مم، حساس إذا تراوح القطر بين 9-14مم، حساس جدا إذا كان القطر بين 15-19مم، أما إذا كان القطر أكبر من 20مم فإن الحساسية شديدة.

في دراستنا حقق المستخلص الفطري أكبر نشاطية ضد *P. aeruginosa*، *B. cereus*، *E. coli* المقاومة وبكتيريا *S. aureus* المقاومة للميثيسيلين. تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Bhattacharyya و Jha (2011) في اختبارهما للنشاطية المضادة للميكروبات لفطر *A. niger* ضد بكتيريا *B. subtilis* و خميرة *C. albicans*. والتي كانت إيجابية. كما تتطابق هذه النتائج مع تلك المتحصل عليها من طرف Al- fakih وAlmaqtri (2019) عند اختبار النشاطية المضادة للبكتيريا لمستخلص فطر *A. oryzae* على سبع أنواع بكتيرية، إلا أن قطر التثبيط تراوح مابين 10-17.3 مم وكان التركيز الأدنى للتثبيط (MIC) بين 176–285 ميكروغرام/مل. وهذا ما يوحي إلى أن السلالة المعزولة أنجع وأحسن.

تعتبر هذه النتائج مهمة لأن هذه البكتيريا تعرف بأنها ممرضة وخطيرة بسبب مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية، وهي مسؤولة عن عدوى المستشفيات (Sahu *et al.*,2012)، كما تعتبر بكتيريا *S. aureus* مسببة لإلتهابات الجلد (Camporese *et al.*,2003)، في حين تسبب *B. cereus* إلتهابات في العديد من الأمراض كما تكون مسؤولة عن التسمم الغذائي (Kumar *et al.*,2006).

كل من الجنسين *Penicilium* و*Aspergillus* معروفين بإنتاجهما الواسع للمستقلبات الثانوية ذات النشاط البيولوجي المختلف بما في ذلك المركبات ذات النشاط ضد البكتيري و الفطري (Al-fakih and Almaqtri، 2019) ، إلا أنه في بادئ الأمر، كانت المضادات الحيوية التي تنتجها *Aspergilli* تسمى أسبيرجيلين، لكن الدراسات الحديثة توصلت إلى أن *A. oryzae* قادر على إنتاج العديد من المستقلبات الثانوية كمضادات حيوية مثل أسبيرجيلوماراسمين (Aspergillormarasmine) ، حمض سيكلوبيازونيك (CPA) ، حمض الكوجيك، حمض3-نيتروبروبيونيك ، مالتوريزين ، فيولاسيتين والذي تم التحري عن إنتاجه فقط على مستخلص الشعير كمضاد حيوي (Blumenthal *et al.*, 2004) ، بالإضافة إلى الأسبرفوران كعامل مضاد للفطريات (Farid *et al.*, 2011)، وكذلك مركب CJ-17.665 المعزول من طرف *A. ochraceus* (Al-fakih and Almaqtri، 2019) .من جهة أخرى، أظهرت نتائج دراسة سابقة حول تأثير البقع المكشوطة من ألواح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) على النمو البكتيري، بأن البقع ذات معاملات الإنسياب (0.53، 0.64، 0.55، 0.72، 0.85) لها تأثير تثبيطي على نمو البكتيريا: *Staphylococcus pyogenes*، *S. aureus* و *S. typhimurium* (Ndip and Seanego، 2012). تتوافق هذه النتائج مع النتائج المتحصل عليها في دراستنا،

حيث وجد من خلال فصل المركبات باستعمال تقنية TLC ، بقع ذات معاملات انسياب مقاربة (جدول 7) والتي يمكن أن يكون لها دور في نشاطية الفطر المضادة للميكروبات.

IV.2.تأثير بعض العوامل على إنتاج الجزيئات الحيوية ذات النشاطية المضادة للميكروبات

تعتبر العوامل الحيوية من درجة حرارة و الأس الهيدروجيني بالإضافة إلى المصادر الغذائية و كذلك مدة الحضن، من أهم العوامل المؤثرة على نمو الفطريات وكذلك قدرتها على إنتاج الجزيئات الحيوية، وذلك من خلال تأثيرها على مختلف العمليات الحيوية . يعد تحسين الظروف البيئية للزرع من المعايير الضرورية لتحقيق أقصى إنتاج من المستقلبات النشطة بيولوجيًا بواسطة سلالة ميكروبية. ومع ذلك ، هناك دراسات قليلة حول تأثير الظروف الغذائية والبيئية على نمو الفطريات وإنتاج المركبات المضادة للميكروبات (Selvin and Juneius ، 2012).

أثبتت عدة دراسات أن درجة الحرارة تؤثر بشكل كبير على زيادة نسبة إنتاج المستقلبات الثانوية، وقد وجد في هذه الدراسة أن درجة الحرارة المثالية لانتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات هي 30°م، تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Bhattacharyya و Jha (2011)، حيث وجدا أن درجة الحرارة المثالية لإنتاج الجزيئات الحيوية ذات نشاطية مضادة للميكروبات عند 30°م أين سجل فطر *Aspergillus sp.* أعلى منطقة تثبيط، وهذا ما أشار إليه أيضا Singh *et al.* (2017) بالنسبة لبكتيريا *Streptomyces sp.*. في حين كانت درجة الحرارة المثالية بالنسبة لفطر *Aspergillus terrus* و *Fusarium solani* هي 25°م (Merlin *et al.*, 2013)، وكذلك بالنسبة لبكتيريا *Rhodopseudomonas palustris* (Selvin and Juneius ، 2012). أما بالنسبة لـ *Rhizoctonia*

solani فكانت بين 20-25°م (Richie *et al.*,2009). وقد أشار Merlin *et al.* (2013)، بأن انخفاض درجة الحرارة قد يوقف النشاط الأيضي للفطر وارتفاعها يؤدي إلى قتل الخلايا. وفي دراسة أجراها Nizamuddin, *et al.* (2008) على فطر *A. oryzae* وجد أن المجال الحراري بين 30-35°م هو الأمثل لبلوغ العمليات الحيوية أقصاها.

و بالموازاة مع درجة الحرارة، تؤثر درجة الأس الهيدروجيني هي الأخرى على نمو و استقلاب الفطريات، وبالرغم من أن العديد من الفطريات لا تفضل النمو في الظروف القلوية السائدة في السبخة ، فقد وجد سابقا من خلال الدراسة الفيسيولوجية للفطر أن درجة الأس الهيدروجيني المثالية لنموه هي 8، في حين كانت درجة الأس الهيدروجيني المثلى لانتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات هي 6، تتوافق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Merlin *et al.* (2013)، الذين وجدوا بأن درجة الأس الهيدروجيني المثلى لإنتاج العوامل المضادة للميكروبات هي 6. على عكس ما توصل إليه Bhattacharyya و Jha (2011) الذان وجدا بأن درجة الأس الهيدروجيني 5.5 هي المثلى. اما Thongwai و Kunopakarn (2007) فأشاروا إلى قدرة الكائنات الحية الدقيقة على بناء المركبات المضادة للميكروبات في مجال الأس الهيدروجيني 5.5-8.5. مقارنة بالبكتيريا *Streptomyces sp.* و *Rhodopseudomonas palustris* فقد وجد بأن درجة الأس الهيدروجيني المثلى لإنتاج المركبات ذات نشاطية مضادة للميكروبات هي 7.5 و 8.5 على الترتيب. يعتبر الأس الهيدروجيني للوسط من أهم العوامل المحددة لعملية الإستقلاب، وبالتالي البناء الحيوي للمستقلبات الثانوية. يرتبط الأس الهيدروجيني بخصائص النفاذية لجدار الخلية والغشاء وبالتالي يكون له تأثير على امتصاص أيون أو فقدانه (Merlin *et al.*, 2013).

بالإضافة إلى تأثير الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة ، تؤثر مدة الحضن هي الأخرى على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات. وقد وجد في هذه الدراسة أن السلالة *A. oryzae* 18HG80 تتطلب 28 يوما للإنتاج الأمثل للمركبات الحيوية المضادة للميكروبات، في حين يتطلب فطر *Aspergillus sp.* 16 يوما فقط للإنتاج، وهو نفس ما أشار إليه Bhattacharyya و Jha (2011)، أما Albert *et al.* (1990) فلاحظوا أن إنتاج مركب Fumonisine B1 من طرف *Fusarium moniliform* يبدأ بعد اليوم 12، وفي دراسة أخرى لتأثير مدة الحضن على إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات من طرف الفطر *Fusarium solani* ، وجد أن فترة 9 أيام هي الأمثل للإنتاج وتنخفض بعدها في اليوم العاشر. قد يرجع هذا الإختلاف بين النتائج إلى مراحل نمو الفطر وخاصة المدة التي يصل فيها إلى مرحلة الإستقرار وبقائه ثابتا فيها (Merlin *et al.*, 2013).

كما أشار Bhattacharyya و Jha (2011) إلى أن تركيز الجزيئات الحيوية في الوسط يستمر في الارتفاع خلال مرحلة الاستقرار وينخفض بعد 91 يوما من الحضن.

لم تؤثر تراكيز كلوريد الصوديوم 0.5 مولار و 1 مولار، (3% و 6% على الترتيب)، في الوسط على إنتاج الجزيئات الحيوية التي تؤثر على بكتيريا *S. aureus*. تتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه Merlin *et al.* (2013)، حيث وجدوا أن تركيز الملح في الوسط بنسبة 2.5-3% هو الأمثل لإنتاج المستقلبات الثانوية المضادة للبكتيريا. في حين وجد أن تركيز 0.085 مولار هو الأمثل لتثبيط بكتيريا *Bacillus subtilis* بواسطة فطر *Aspergillus sp.*. مقارنة مع بكتيريا *E. coli* و *C. albicans* فإن وجود الملوحة في الوسط حال دون نموها، و هذه نتائج مماثلة لتلك المتحصل عليها من طرف Bhattacharyya و Jha (2011)، حيث وجدوا أن إنتاج الجزيئات الحيوية المضادة للميكروبات ينخفض تدريجيًا مع زيادة تركيز الملح في الوسط.

IV.3.مقارنة استخلاص الجزيئات الحيوية بين استعمال تخمر الحالة السائلة (SmF) وتخمر الحالة الصلبة (SSF)

يمكن استخدام الجزيئات الحيوية ذات مصدر طبيعي، مثل النباتات والكائنات الحية الدقيقة، في مجالات مختلفة، بما في ذلك الزراعة والبيوتكنولوجيا. التخمر هو عملية حاسمة لحث إنتاج الجزيئات الحيوية من الفطريات، هناك نوعين من التخمر : التخمر في الحالة السائلة والتخمر في الحالة الصلبة.

لهذا الأخير تطبيقات مهمة في الوقت الحالي، بما في ذلك إنتاج الأنزيمات، المضادات الحيوية و كذلك الأحماض العضوية...إلخ. وتعتبر المخلفات الزراعية أحسن المواد المستعملة لهذا التخمر، بالإضافة إلى ذلك فإن الهدم الحيوي لهذه المركبات بواسطة عزلة GRAS ،يمكن أن يحسن من قيمة هذه المواد كأعلاف و مغذيات حيوانية. لقد تم اختيار نخالة القمح لهذا التخمر، اعتمادا على النتائج المتحصل عليها من طرف Sivaramakrishman *et al.*(2007)، عند المقارنة بين تأثير عدة أنواع من المخلفات الزراعية (قشور جوز الهند، قشور الفستق، قشور السمسم، مسحوق بذور الكاكاو، مسحوق بذور التمر الهندي، نخالة الأرز، نواة التمر ، قشور نبات الزيتون، قشور الخردل ، قشور بذور القطن ، قشر الأرز و نخالة القمح). حيث وجدوا أن نخالة القمح هي الأحسن، و رجح ذلك إلى وجود نسبة كافية من المغذيات، بالإضافة إلى قابليتها على الحفاظ على قيمتها الغذائية حتى في درجات رطوبة مختلفة.

أعطى استخدام نخالة القمح كوسط طبيعي في التخمر نتائج مشجعة، حيث كان هناك اختلاف كمي ونوعي في الجزيئات الحيوية المنتجة من طرف السلالة *A.oryzae* 18HG80 ، وقد كانت النسبة في الوسط

الطبيعي أكبر مقارنة مع الوسط الإصطناعي (YES). يمكن أن يرجع ذلك إلى المميزات الجزيئية و الفسيولوجية، و كذلك إلى النمط الظاهري للنمو الذي يتبعه الفطر. فمن خلال الدراسة التي أجراها Beisebeke *et al.* (2002)، وجد أن الغزل الفطري النامي على نخالة القمح يكون هوائيا، و بالتالي زيادة عملية التنفس (التهوئة)، بالإضافة إلى تعدد نواقل مصادر الكربون إلى داخل الهيفا. كما أظهرت الدراسة الجزيئية لفطر *A. oryzae* وجود اختلاف نوعي في التعبير الجيني و إنتاج البروتينات، مقارنة مع التخمر في وسط سائل.

تتوافق النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة مع تلك المتحصل عليها من طرف Mohd *et al.* (2019)، حيث اكتشفوا أن الجزيئات الحيوية المنتجة من طرف الفطر الداخلي *Pleosporales sp.* تختلف كما ونوعا حسب نوع التخمر، حيث وجدوا أن المركبات المنتجة عند استخدام التخمر الصلب هي: Cucurbitacin D , E، 3,10-dihydroxy-4,8-dimethyl-6-methylbenzocoumarin، 3,8,10-trihydroxy,4-methoxy-6methyl benzocoumari و 2,5-dimethoxy-3,6-bis (4-methoxyphenyl)-1,4-benzoquinone. في حين نتج عن التخمر السائل: Cucurbitacin A, B, C، (5R)-5-hydroxy-2,3-dimethylcyclohex-2-en-1-one، Dankasteron A. وفي دراسة أخرى للمقارنة بين التخمرين وجد أن انتاج كل من Compactin، Lovastatin، Mevastatin ، Pravastatin من طرف فطري *Aspergillus sp.* و *Penicillium sp.* كان أكبر في تخمر SSF منه في SmF (Subramaniyam و Vimala، 2012).

أشار Subramaniyam و Vimala (2012) أن الجزيئات الحيوية المنتجة عن طريق تخمر SSF تكون أكثر استقرارا وبكميات كبيرة مقارنة مع تلك المنتجة عبر تخمر SmF. ومع ذلك ، فإن تطبيق SSF محدود بجودة

وخصائص مادة التفاعل المستخدمة في الوسط. لهذا السبب ، من الضروري اختبار القدرة الإنتاجية لمجموعة متنوعة من االمواد قبل تحسين عملية التخمر(Subramaniyam و Vimala، 2012).

أظهرت نتائج التحليل الكيميائي لمستخلص السلالة *A. oryzae* 18HG80 قدرة الفطر على إنتاج أنواع مختلفة من المركبات ،وكان أبرزها حمضي الكوجيك و السيكسينيك . تتوافق هذه النتائج مع النتائج المتحصل عليها سابقا، حيث يعرف فطر *A. oryzae* وكذلك أنواع أخرى من جنس *Aspergillus* و *Penicillium*، *Rhizopus oryzae* بإنتاجهم لهذين الحمضين بكميات كبيرة (Yang *et al.*, 2016).

IV.4.دراسة سمية السلالة *A. oryzae* 18HG80

هناك فرق واضح بين السموم الفطرية والجزيئات الحيوية ذات الخصائص المميزة لتطبيقات متنوعة، حيث تملك الأنواع الفطرية التي تستعمل في المجال الصناعي قدرة محدودة على إنتاج المركبات السامة (Mycotoxins)، وتنتج مجموعة كبيرة ومتنوعة من الجزيئات الحيوية الأخرى التي يمكن أن تظهر نشاطًا مضادًا للسرطان أو للميكروبات ، للأكسدة و صبغات ...إلخ (Frisvad *et al.*, 2018).

ينتمي فطر *A. oryzae* إلى نفس عائلة *A. flavus* ، لكنه غير منتج لسموم الأفلاتوكسين (Barbesgaard *et al.*, 1992)، ومع ذلك ، تم عزل بعض السموم الفطرية من *A. oryzae* ، بما في ذلك حمض الكوجيك ، وحمض β-نيتروبروبيونيك (BNP) ، وحمض السيكلوبيازونيك (CPA) ، وقد أفاد بعض الباحثين أن حمض الكوجيك له نشاط مثبط قوي ضد أنزيم التيروزيناز ونشاط مضاد للبكتيريا ، في حين أظهرت الدراسات الحديثة أن حمض الكوجيك قد يكون مادة مسرطنة محتملة (He *et al.*, 2019). على عكس Seshime *et al.*

(2005) الذين يعتقدون أن الفطر يحتوي على المورثة المسؤولة على انتاج سموم الأفلاتوكسين ولكنها غير نشطة بسبب طفرات في بعض المورثات التنظيمية. أظهرت نتائج دراسة سمية المستخلص الفطري على الخلايا البالعة وكذلك الخلايا الظهارية Caco2 أن السلالة *A. oryzae* 18HG80 عديمة السمية، وتتماشى هذه النتائج مع ما توصل إليه (Sosa *et al.*, 2013) الذين وجدوا أن الفطر لم ينتج سموم الأفلاتوكسين B1، B2، G1، G2 وكذلك سم Ochratoxin . وتم الإستنتاج بأن فطر *A. oryzae* هو فطر أمن وتم إدراجه على أنه "معترف به عموما على أنه أمن "(GRAS) من قبل إدارة الغذاء والدواء (FDA) ، وتم دعم سلامته من قبل منظمة الصحة العالمية (WHO). (He *et al.*, 2019). السلالات الفطرية التي تستخدم في البيوتكنولوجيا الصناعية لها تاريخ طويل وموثق على نطاق واسع من الاستخدام الآمن لتطبيقات الغذاء والأعلاف. وقد تم استخدام السلالات التي تنتمي إلى أنواع *A. niger* و *A. oryzae* لتخمر الطعام ولتصنيع الأنزيمات لأكثر من 50 عامًا . تعتبر السلطات التنظيمية مئات الأنزيمات المنتجة في هذه الأنواع آمنة. علاوة على ذلك ، لا يتم إنتاج السموم الفطرية والمستقلبات الثانوية الأخرى خلال ظروف النمو ذات الصلة الصناعية الخاضعة للرقابة حيث تكون العناصر الغذائية غير محدودة و لا يوجد أي تنافس من قبل أي من الكائنات الحية الدقيقة الأخرى (Frisvad *et al.*, 2018).

وفي ظل امتلاك مستخلص السلالة الفطرية المدروسة خاصية مضادة للميكروبات، فان عدم سمّيته على خلاّيا المضّيف تصبح ضروّرية جداً وخاصة عند استخدامه لتحضّير مواد معقمة أو مطهرة أو دخوله كأحد المكونات الكيميائية (محمد جمّل ، 2009).

IV.5.النشاطية الأنزيميــة

يتم إنتاج معظم الأنزيمات من الحيوانات والنباتات، إلا أنها ليست مطلوبة بشدة إذ تعتمد على حياة الكائن ، وعليه أصبح تركيز الباحثين على الأنزيمات الميكروبية، والتي تعتبر مجالا واسعا ومتزايدا في البيوتكنولوجيا . أثبتت الفطريات كونها مصادر عالمية للمركبات الحيوية للتوسع الصناعي والطبي الحيوي لعقود، ويتم الآن إنتاج العديد من المنتجات الصناعية الهامة من الفطريات باستخدام تقنية التخمر. تفرز الفطريات مجموعة واسعة من الأنزيمات وتلعب دورًا مهمًا في تحلل المواد العضوية، والعديد من هذه الأنزيمات يتم الآن إنتاجها تجاريًا ، بالإضافة إلى ذلك أصبح استخدام مواد التفاعل غير المكلفة لإنتاج الأنزيمات ، محط اهتمام الكثير من الباحثين (Sunitha *et al.*, 2013).

من بين الطرق الهادفة إلى معرفة النشاطية الأنزيمية النوعية ، طريقة الزرع عل سطح الآجار، وهي طريقة مباشرة تتعلق بالنسبة بين قطر هالة الهدم الأنزيمي وقطر المستعمرة و المعبر عنها بالمؤشر الأنزيمي، هذا الأخير هو وسيلة سريعة و سهلة لإختبار و مقارنة النشاطية الأنزيمية لعدد أكبر من الكائنات الحية الدقيقة (Carrim *et al.*, 2006). وحسب Choi *et al.* (2005) إذا كان المؤشر الأنزيمي أكبر من واحد فإن الكائنات المختبرة تعد منتجة للأنزيم خارج خلوي المختبر، و هذا يتماشى مع النتائج المتحصل عليها حيث أظهرت كل سلالات فطر *A.oryzae* نشاطية اتجاه كل أنزيم مختبر بمؤشر أنزيمي أكبر من 1، و عليه يمكن اعتبارها منتجة له.

فطر *A. oryzae* هو فطر خيطي له القدرة على إفراز كميات كبيرة من أنزيمات الإماهة، تشمل هاته البروتينات الخارج خلوية، بروتينات ذات خصائص مختلفة مثل أنزيمات البروتياز المعتدلة والقاعدية، الليباز، الأميلاز، الغلوتاميناز و مينالوبيبتيداز(Zamber، 2010؛ Chancharoonpong *et al.*, 2012؛ Shah *et al.*, 2014).

هذا يتوافق مع النتائج المتحصل عليها حيث أبدت السلالة المدروسة قدرة عالية على إنتاج الأنزيمات الثلاث: الأميلاز، البروتياز والليباز سواء باستعمال التخمر في الحالة الصلبة أو التخمر في الحالة السائلة.

أعطى استخدام نخالة القمح كوسط طبيعي صلب في التخمر نتائج مشجعة، حيث كانت نشاطية الأنزيمات الثلاث المنتجة من طرف الفطر أكبر بأضعاف مقارنة مع الأوساط الاصطناعية السائلة. نفس النتائج التي حصل عليها Mahadik *et al.* (2002)؛ Sandhya *et al.* (2005a) في دراستهم حول إنتاج البروتياز والليباز بواسطة *A. oryzae* باستخدام تقنيات التخمر SSF و Smf ، ورجح ذلك إلى ظروف النمو، حيث تذوب العناصر الغذائية في الوسط السائل ، بينما في الوسط الصلب الطبيعي ينمو الفطر على طبقة يتم فيها إدمصاص العناصر الغذائية ، أو لأن الأنزيم الذي تم الحصول عليه بواسطة تخمرSSF كان أكثر تركيزًا. من جهة أخرى، يكون التخمر في الحالة الصلبة مناسبًا لنمو الفطريات بسبب انخفاض محتواه من الرطوبة وبالتالي السماح باختراق الميسليوم الفطري من خلال الوسط، وهذا ما يجعله أكثر قدرة على إنتاج بعض الأنزيمات والمستقلبات التي عادة لن يتم إنتاجها في تخمر الحالة السائلة (Chancharoonpong *et al.*, 2012). وحسب Beisebeke *et al.* (2002) ، فإن الميسيليوم النامي على نخالة القمح يكون هوائيا، و بالتالي زيادة عملية التنفس (التهوئة)، بالإضافة إلى زيادة تراكم الكحولات متعددة الهيدروكسيل و تعدد نواقل مصادر الكربون إلى داخل الهيفا. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت الدراسة الجزيئية لفطر *A. oryzae* وجود اختلاف نوعي في التعبير الجيني و إنتاج

البروتينات في التخمرفي الوسط الصلب، مقارنة مع التخمر في الوسط السائل. يمكن أن تؤدي هذه الاختلافات بين طرق الإنتاج المستخدمة إلى الحصول على إنزيمات ذات خصائص مختلفة (Falony *et al.*, 2006 ؛ Muthulakshmi *et al.*, 2011)، إلا أنه لا يمكن الجزم بأن نوعية الأنزيمات المنتجة بواسطة التخمر الصلب أفضل من تلك المنتجة بواسطة التخمر السائل، وهذا ما أكدته النتائج التي توصل إليها Colla *et al.* (2015)، حيث وجد أن أنزيم الليباز الحامضي المنتج بواسطة التخمر السائل أكثر ثباتا منه المنتج عن طريق التخمر الصلب بفارق نسبة 20% .

IV.6. تحديد بعض الظروف المثلى لإنتاج أنزيمات الليباز، الأميلاز والبروتياز باستعمال التخمر الحالة الصلبة

يتأثر إنتاج الأنزيمات من طرف الكائنات الحية الدقيقة بمكونات الوسط الزراعي بشكل كبير ، وخاصة مصادر الكربون والنيتروجين ، والعوامل الفيزيائية مثل درجة الحرارة ، ودرجة الحموضة ، مدة الحضن ، وكذلك حجم اللقاح. لذا من المهم إنتاج الأنزيمات في أوساط غير مكلفة ومحسنة على نطاق واسع لتكون العملية قابلة للتطبيق تجاريًا .

بينت النتائج الخاصة بتأثير درجة الحرارة على نشاطية الأنزيمات الثلاث المدروسة والمنتجة من طرف السلالة *A. oryzae*18HG80، أن أحسن نشاطية تبديها الأنزيمات هي عند درجة الحرارة 30°م. تتوافق هذه النتيجة مع تلك المتحصل عليها من طرف (Zamber, 2010؛ Muthulakshmi *et al.*, 2011)، ، حيث وجدوا أن درجة الحرارة المثالية لنشاط أنزيمات الغليكوأميلاز و البروتياز هي 30°م. ونفس النتائج سجلت بالنسبة لأنزيمي

الأميلاز والسيليلاز المنتجة من طرف *A. oryzae* (Grover *et al.*, 2013)، وأنزيم السيليلاز المنتج من طرف *A. niger* (Lee *et al.*, 2011). على عكس ماتوصل إليه Mahadik *et al.* (2002)؛ Shah *et al.* (2014)، أظهر أنزيم الليباز الحامضي المنتج من طرف *A. niger*، و أنزيم ألفا أميلاز المنتج من طرف *A. oryzae*، أعلى نشاطية لهما عند درجة حرارة 45°م. عادة ما يكون نمو الخلايا وإنتاج الأنزيمات والمستقلبات الأخرى حساس لدرجة الحرارة. يرتبط إنتاج α-amylase بواسطة الفطريات بالنمو الذي يعتمد بشكل تسلسلي على درجة حرارة الحضن ، ومن ثم، فإن درجة الحرارة المثلى تعتمد على ما إذا كانت العزلة محبة للحرارة (Mesophilic) أو محبة للحرارة العالية (Thermophilic) (Sivaramakrishnan *et al.*, 2007). وقد لوحظ انخفاض نشاط الأنزيم عند ارتفاع درجة الحرارة بسبب التغير في تكوين الغشاء وهدم البروتين وكذلك تثبيط نمو الفطريات (Muthulakshmi *et al.*, 2011)،كما ذكر Shah *et al.* (2014) تؤثر درجات الحرارة المرتفعة والمنخفضة على إنبات االأبواغ ونمو الخلايا، وبالتالي التأثير على الإنتاجية الإجمالية لعملية التخمر.

بالإضافة إلى تأثير درجة الحرارة ، تؤثر الرطوبة هي الأخرى على نشاطية الأنزيمات، حيث وجد في هذه الدراسة أن نسبة الرطوبة 100% هي الأحسن لنشاطية الأنزيمات. وبمقارنة هذه النتائج مع نتائج الدراسات التي تمت على بعض الفطريات، يلاحظ أن نشاطية الأنزيمات المدروسة تكون في أقصاها عند نفس النسبة (Zamber، 2010). بينما كانت 70% بالنسبة لأنزيم السيليلاز المنتج من طرف *A. niger*، وأنزيم الأميلاز المنتج من طرف *A. oryzae* (Lee *et al.*, 2011). في حين وجد Chutmanop *et al.* (2008) أن نسبة الرطوبة المثلى لنشاط أنزيمي البروتياز والأميلاز المنتجة من طرف *A. oryzae* هي 50%. وفي دراسة أخرى كانت 75% بالنسبة لأنزيم الأميلاز والسيليلاز عند *A. oryzae* و*Trichoderma reesei* (Grover *et al.*, 2013).

تعتبر الرطوبة من أهم المعايير في التخمرات الصلبة، فهي تؤثر على نمو الكائن الحي وبالتالي إنتاج الأنزيمات. حيث يؤدي المحتوى العالي من الرطوبة إلى تقليل مسامية المادة ، والتغيرات في بنية جزيئاتها وتقليل حجم الغاز. كما لوحظ انخفاض كبير في إنتاج الأنزيم مع زيادة كبيرة في محتوى الرطوبة ، والذي يرجع إلى انخفاض معدل نقل الأكسجين، ويسهل التلوث بالبكتيريا سريعة النمو (Mahadik *et al.*, 2002). كما أشارت الدراسات أن الرطوبة المنخفضة تمنع نمو الفطريات ونشاطها وبالتالي التأثير على إنزيماتها، وكذلك إمكانية الوصول إلى المغذيات. تنمو الفطريات عادة في نسبة رطوبة أقل مقارنة مع البكتيريا، مما يوفر ميزة كبيرة في الحد من خطر التلوث ؛ لأن معظم الأنواع البكتيرية غير قادرة على النمو بمستوى رطوبة منخفض. ومع ذلك ، يختلف مستوى الرطوبة الأمثل باختلاف االوسط المستخدم ، لأن الأنواع المختلفة من الأوساط لها سعة تخزين مختلفة للماء (Grover *et al.*, 2013).

بالموازاة مع درجة الحرارة والرطوبة، تؤثر مصادر الكربون والنيتروجين هي الأخرى على نشاطية الأنزيمات، إذ تعتبر ضرورية للنمو السليم والتمثيل الغذائي للكائنات الحية الدقيقة. يعد استخدام المصادر الكربونية والنيتروجينية غير المكلفة عاملا مهما في تخفيض تكلفة إنتاج الأنزيمات. في دراسة تأثير مصادر الكربون والنيتروجين كمكمل إضافي في الوسط لزيادة إنتاج الأنزيمات إلى أقصى حد. بينت النتائج أن الغليسيرول هو أفضل مصدر كربوني بالنسبة لأنزيم الأميلاز، بينما لم تؤثر المصادر الأخرى على نشاطية الليباز والبروتياز.

بالإضافة إلى مصدر الكربون والطاقة ، تتطلب الكائنات الحية الدقيقة النيتروجين والفوسفور والمعادن لنموها. في دراستنا ، كانت نيترات الصوديوم مصدرًا أفضل للنيتروجين لإنتاج الأميلاز والليباز، في حين لم تتأثر نشاطية البروتياز بإضافة أي من المصادر المختبرة. تتوافق هذه النتائج مع تلك المتحصل عليها من طرف Gautam *et*

al. (2011)، حيث وجدوا في دراستهم لتأثير مصادر مختلفة من النيتروجين على انتاج السيليلاز، بأن نشاطية الأنزيم تكون أحسن عند إضافة البيبتون و كذلك نيترات الصوديوم. على عكس ما توصل إليه Zamber (2010) أين كانت المصادر العضوية للنيتروجين مثل البيبتون ومستخلص الخميرة أحسن لنشاطية انزيم الغليكوأميلاز. وفي دراسة أخرى كانت اليوريا مصدرًا أفضل للنيتروجين لإنتاج الأميلاز و السيليلاز بواسطة *A. oryzae* و *Trichoderma reesei* (Grover et al., 2013). وفي دراسة مماثلة أجراها Shah *et al.* (2014) ، كان مستخلص الخميرة أفضل مصدر للنيتروجين لأعلى نشاط للأميلاز عند *A. oryzae*. وكما أشار Muthulakshmi *et al.* (2011)، تميل بعض الأملاح النيتروجينية إلى تقليل الأس الهيدروجيني لوسط التخمر وكان لها تأثير سلبي على إنتاج الأنزيمات على الرغم من أنها تدعم نمو الكائن الحي.

يعتبر حجم اللقاح من العوامل المهمة التي تؤثر على نشاطية الأنزيم، وذلك بالتأثير على نسبة استعمال مادة التفاعل. وعليه يتطلب التخمر في الحالة الصلبة حجم لقاح مناسب ليكون التخمر جد فعال (Grover *et al.*, 2013). في دراستنا الحالية، كان حجم اللقاح 1مل مثالي لنشاطية أنزيمي الليباز والبروتياز، أما أنزيم الأميلاز فأبدى نشاطية أحسن عند تلقيح الوسط بـ 2مل من المعلق البوغي الفطري. أما في الأحجام العالية من اللقاح فلوحظ انخفاض في نشاطية الأنزيمات الثلاث، وقد يكون ذلك بسبب تكتل الخلايا التي يمكن أن تقلل من معدل امتصاص السكر والأكسجين وكذلك إفراز الأنزيم (Muthulakshmi *et al.* 2011) .

استعملت أحجام وتراكيز لقاح مختلفة في دراسات عدة، فقد درس Zamber (2010) تأثير أحجام لقاح مختلفة في إنتاج أنزيم الأميلاز من سلالة أخرى تابعة لفطر *A. oryzae*، فوجد بأن حجم اللقاح بين 0.5–0.8مل هو الأمثل في إنتاج الأنزيم. في حين وجد Kunamneni *et al.* (2005) أن حجم اللقاح 1 مل أحسن لإنتاج

أنزيم الأميلاز. وفي دراسة أخرى لبيان تأثير أحجام لقاح مختلفة في إنتاج أنزيم البروتياز من طرف فطر *A. flavus* على وسط نخالة القمح، وجد أن حجم اللقاح 0.3مل هو الأفضل(Muthulakshmi *et al.* 2011).

يمكن أن يؤدي حجم اللقاح الأصغر إلى امتداد وطول مرحلة التباطؤ في النمو الفطري. إلا أن الزيادة في حجم اللقاح تحسن بشكل عام من النشاطات المتعلقة بالنمو الفطري حتى مستوى معين، بعد ذلك يكون هناك انخفاض في النشاط الميكروبي بسبب نقص المغذيات، مما يتطلب وقتًا أطول للنمو والإنتاج المثالي للمستقلبات الثانوية (Shah *et al.*, 2014).

تعد نخالة القمح خيارًا جيدا للإنتاج الصناعي للأنزيمات؛ إذ تحتوي 65 % كربوهيدرات، 16 %بروتين، كالسيوم، حديد، مغنيزيوم، فوسفات، بوتاسيوم، صوديوم، زنك، وفيتامينات (K, E, B3, B2, B1) ،والليبيدات، بالإضافة إلى تكلفتها البسيطة، وهي مناسبة بشكل خاص لإنتاج الأنزيم الفطري . رغم الإستعمال الواسع لتخمرات الحالة الصلبة لا تتوفر معلومات كافية حول حركة التفاعلات في نظام التخمر؛ لصعوبة قياس عوامل النمو وتحليل النمو الخلوي وتحديد استهلاك مواد التفاعل، بسبب الطبيعة المتنوعة لمواد التفاعل ذات البنية المعقدة غذائيا و بنيويا، فالعوامل التي تؤدي إلى أنتاجية عالية غير مفهومة تماما، لذا فالعملية المثلى تبقى إستراتيجية تجريبية فقط (عبد الرزاق وأخرون، 2019).

تعد الأنزيمات مهمة في عمليات الإستقلاب لدى جميع الكائنات الحية، بالتالي يمكن الحصول عليها من النباتات و الحيوانات و الكائنات الحية الدقيقة . أثبتت الدراسات أن الأنزيمات المعزولة من الكائنات الحية الدقيقة، وخاصة الفطريات، أكثر أهمية لا سيما على المستوى الصناعي كونها أكثر استقرارا في درجات الحرارة

و الأس الهيدروجيني غير المثلى، حيث يمكن إستعمالها في المجالات النسيجية (الأميلاز، الليباز، السيليلاز)، الأغذية (البروتياز، السيليلاز، البكتيناز، أوكسيدو ريدكتاز)، الصناعات الجلدية (البروتياز، الليباز)، و الورقية (الليباز، أوكسيدو ريدكتاز، كزيليناز) و المنظفات (البروتياز، السيليلاز، الليباز، أوكسيدو ريدكتاز) (Sousa *et al.*, 2008).

الخـــاتمـــة

الخـــــاتمـــــــة

التربة المالحة قد لا تكون صالحة في المجال الزراعي، إلا أنه يمكن اعتبارها مخزن للعديد من الكائنات الحية الدقيقة ذات أهمية كبرى في العديد من المجالات: الاقتصادية، الصناعية، الطبية، الصيدلانية و البيوتكنولوجية...

مكنت هذه الدراسة حول فطر *A. oryzae* 18HG80 المعزول من تربة مالحة (سبخة البيضاء) من إظهار الأهمية البيوتكنولوجية لهذا الفطر إذ يمكن أن يشكل مصدرا للعديد من الجزيئات الحيوية النشطة بيولوجيا ذات الأهمية الطبية، الصناعية والزراعية. تميزت هذه السلالة بامتلاكها لنشاطية ضد ميكروبية واسعة ضد بعض الأنواع البكتيرية والفطريات الممرضة للنباتات و الإنسان، ومع ذلك من أجل تقييم هذا العمل من الضروري إتباعه بتنقية هذه الجزيئات الحيوية وتطبيقها في الحي (*in vivo*) للوصول إلى ما إذا كانت هذه السلالة لديها القدرة على العمل كعنصر تحكم بيولوجي، أو كعامل دوائي وبيوتكنولوجي جديد.

أثبتت هذه السلالة كفاءة عالية في إنتاج بعض الأنزيمات ذات الأهمية الصناعية، كما تمكنا من تحديد بعض الظروف المثلى لإنتاج كل من الجزيئات الحيوية النشطة والأنزيمات. كما بينت النتائج أن أفضل وسط لاستخلاص هذه المستقلبات هو الوسط الطبيعي (عجينة نخالة القمح)، حيث أعطت هذه الطريقة قيمة مضافة في البيوتكنولوجيا من خلال التقليل في تكلفة الإنتاج وكذلك تمهيد الطريق لإدارة النفايات. إضافة إلى ذلك فإن استعمال المخلفات الزراعية كمواد أولية في التخمرات الصناعية التي تتطلب وجود الملح باستخدام الفطر *A. oryzae*، سيفتح المجال على مصراعيه للبحث، لكون النتائج المتحصل عليها مشجعة.

من جهة أخرى تم تعريف المستقلبات الثانوية المفرزة من طرف الفطر، والمتمثلة بالدرجة الأولى في حمضي السيكسينيك و الكوجيك اللذان يعتبران موادا كيميائة مهمة ذات استخدامات صناعية مختلفة، بالإضافة إلى حقيقة أن استعمال هذا الفطر آمن في العديد من المجالات (الصناعات الغذائية والمشروبات ومستحضرات التجميل والصناعات الدوائية)، وهذا ما أثبته إختبار السمية الخلوية، فهذا يفتح آفاقا للبحث في المستقبل. وعليه فمن الضروري القيام بأبحاث و دراسات أكثر تعمقا ودقة تشمل:

- تعميق الدراسة المخبرية للكشف عن آليات تأثير الجزيئات النشطة حيويا باستعمال تقنيات حديثة.
- الكشف عن قابلية العزلة على انتاج أنزيمات حالة أخرى.
- تنقية حمضي السكسينيك والكوجيك وإجراء بعض الدراسات التطبيقية في الواقع.
- استعمال مخلفات زراعية وصناعية أخرى بوصفها أوساطا طبيعية إقتصادية لإنتاج الأنزيمات الحالة وحامضي السكسينيك والكوجيك.
- قدرة الفطر على تحمل الملوحة تسمح باستعماله في التخمرات الصناعية التي تتطلب وجود الملح.
- معالجة وتلقيح الأشجار والنباتات الصغيرة لتزرع خارجيا في التربة المالحة.
- استعمال *A. oryzae* 18HG80 كبروبيوتيك في تغذية الدواجن وتحسين المردود، وكذلك في المكافحة البيولوجية.

المراجـــــــع

المراجع العربية

إسماعيل خليل إبراهيم (**2008**). السموم الفطرية أو سموم الأعفان – الأمراض الفطرية التي تصيب المزروعات والدواجن وأثرها على الإنسان. دار الكتب العلمية . 208 صفحة.

عبد الرزاق الأحمد الجماس، هـ.، الفتحي، ح.، الخلف، و.(**2019**). تأثير ترطيب وسط التخمر بالشرش والمولاس على إنتاج الرينين بوساطة فطر *Rhizomucor miehei* باستخدام تخمرات الحالة الصلبة. المجلة العلمية لجامعة الملك فيصل (العلوم الأساسية والتطبيقية). المجلد 20، العدد 01.

عبيد جاسم، ن. و فلاح عزيز،ز . (2015) . عزل وتشخيص أنواع جنس *Aspergillus* من الجهاز التنفسي للمصابين بالأمراض الرئوية المزمنة. مجلة بابل، العلوم الصرفة والتقنية، المجلد 23 ، العدد 01 .

ماهود السوداني، ع. ع. ا. (**2015**). الخصائص المظهرية والجزيئية لفطر *Aspergillus niger* وتقييم قابليته في إنتاج حامض السيتريك تحت ظروف مختلفة. جامعة القادسية، العراق. 115 صفحة.

محمد جمّل علي ابو مجداد، ن. (2009). الفعالية الضد مايكروبية لمستخلص الحنظل و السذاب و الكركم بالمختبر. مجلة جامعة ذي قار. المجلد 04. العدد 04.

المراجع الأجنبية

Aguilar CN, **Gerardo GS**, **PLilia A**, **Raul RH**, **José MH**, **and Juan**, **C.E**. (**2008**). Perspectives of solid-state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4 (4): 354-366.

Al-Fakih A A, **and Almaqtri W Q A**. (**2019**). Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp. *Mycology*, 10 (4): 191-209.

Aliat T, **and Kaabeche M**. (**2013**). Phytoecological characterization of the wetland Chott El Beida (Setif, Algeria), Bulletin de l'Institut Scientifique Rabat, 35: 35–41.

Aly A H, **Edrada-Ebel R**, **Wray V**, **Muller W E**, **Kozytska S**, **Hentschel U**, **Proksch P**, **and Ebel R**. (**2008**). Bioactive metabolites from the endophytic fungus Ampelomyces sp. isolated from the medicinal plant Urospermum picroides. Phytochemistry, 69: 1716-1725.

Anand D, **Marimuthu S**, **Saravanan**, **P**, **and Rajarajan S**. (**2016**). *In Vitro* Antiviral Activity of Fungal Secondary Metabolites Against *Herpes Simplex* Virus-2, *International Journal of Pharmaceutical Sciences.* 38:73-77.

Anugya M, **Radhey S V**, **and Nalini S**, (**2009**). Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver. *Pesticide Biochemistry and Physiology* , 94 (2009) 55–59.

Azmir J, **Zaidul I S M**, **Rahman M M**, **Sharif K M**, **Mohamed A**, **Sahena F**, **and Omar A K M**. (**2013**). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.

Baker DD, **and Alvi K A**. (**2004**) Small molecule natural products: new structures, new activities. *Current Opinion in Biotechnology*. 15:576–583

Barbesgaard P, **Heldt-Hansen HP**, **and Diderichsen B**. (**1992**). Mini-review On the safety of *Asperyillus oryzae*: a rev.iew. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 36: 569-572.

Beharka AA, **and Nagaraja TG**. (**1998**). Effect of *Aspergillus oryzae* Extract Alone or in Combination with Antimicrobial Compounds on Ruminal Bacteria, *Journal of Dairy Science*. 81:1591–1598.

Belhattab R. **and Larous L**. (**2008**). Antimicrobial activity and inhibition of Aflatoxin B1 production by Origanum glandulosum Desf. essential oils. *The Egyptian Journal of Biological Pest control*. 18(1) 127-131

Bhattacharyya, **P**. **and Jha D K**. (**2011**). Optimization of cultural conditions affecting growth and improved bioactive metabolite production by a subsurface *Aspergillus* strain. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2(4): 133-143.

Blumenthal CZ. (**2004**). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 39: 214–228.

Boudouma D. (**2009**). Composition chimique du son de blé dur produit par les moulins industriels algériens. *Cellulose*. 2(90) : 6-48.

Boughachiche F, **Reghioua S**, **and Oulmi L**. (**2005**). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha de Aïn MLila, *Sciences & Technologie C, Biotechnologies,* 5–10.

Camporese A, **Balick MJ**, **Arvigo R** , **Esposito RG**, **Morsellino N**, **De Simone F**, **and Tubaro A**. (**2003**). Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Ethnopharmacology*. 87, 103–107.

Carrim A J I, **Arbosa E C**, **and Gonçalves J D**. (**2006**). Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). *Brazilian Archives of Biology and Technology* , 49: 353-395.

Chancharoonpong C, **Hsieh P C**, **and Sheu S C**. (**2012**). Enzyme production and growth of *Aspergillus oryzae* S. on soybean koji fermentation. *Apcbee Procedia*, *2*, 57-61.

Chaudhary R and Tripathy A. (**2015**). Isolation and Identification of Bioactive Compounds from *Irpex Lacteus* Wild Fleshy Fungi, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 7:11.

Choi Y W, **Hodgkiss I J**, **and Hyde K**. **D**. (**2005**). Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*, **1**: 55-66.

Chutmanop J, **Chuichulcherm S**, **Chisti Y**, **and Srinophakun P**. (**2008**). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 83 (7), 1012-1018.

Colla L M, **Ficanha A M**, **Rizzardi J**, **Bertolin T E**, **Reinehr C O**, **and Costa J A V**. (**2015**). Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. *BioMed Research international*, *2015*.

Costes, **C**. **1982**. Les enzymes ; production et utilisation industrielles. Bordas, Paris. pp.37-195.

Cui H B, **Mei W L**, **Miao C D**, **Lin H P**, **Hong K and Dai H F**. (**2008**). Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium sp*.0935030 of mangrove plant *Acrostichum aureum* . *Chemical Journal of Chinese Universities*, 33: 407-410

Essodolom T. (**2016**). Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne : caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du Soumbala, du Bikalga et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines.

Centre de Recherche en Sciences Biologiques, Alimentaires et Nutritionnelles. Université Ouaga I PR Joseph-Ki Zerbo. Français.

Falony G, **Armas J C**, **Mendoza J C D**, **and Hernández J L M**. (**2006**). Production of Extracellular Lipase from *Aspergillus niger* by Solid-State Fermentation. *Food Technology & Biotechnology*, *44*(2).

Farid MAF, **Hoda M**. **and Abdel Halim S**, (**2011**). Amylase production from *Aspergillus oryzae* LS1 by solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of wheat flour. *Iranian Journal of Biotechnology.* 9:8 267-274

Fickers, **P**. (**2008**). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment.* 12(2), 119-130.

Frisvad J C, **Møller L L**, **Larsen T O**, **Kumar R**, **and Arnau J**. (**2018**). Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei. Applied microbiology and biotechnology*, *102* (22), 9481-9515.

Gautam S P, **Bundela P S**, **Pandey A K**, **Khan J**, **Awasthi M K**, **and Sarsaiya S**. (**2011**). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. *Biotechnology research international*, *2011*.

Graminha E B, **Gonçalves A Z**, **Pirota R D**, **Balsalobe M A**, **Da Silva R**. **and Gomes E**. (**2008**). Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, 144: 1-22.

Grover A, **Maninder A**, **and Sarao L K**. (**2013**). Production of fungal amylase and cellulase enzymes via solid state fermentation using *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei. International journal of advanced engineering research and technology. 2* (8), 108-124.

Guo B, **Wang Y**, **Sun X**. **and Tang K**. (**2008**). Bioactive natural products from endophytes: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol*; 44: 153-158.

Gupta, **R**, **Gigras**, **P**, **Mohapatra**, **H**, **Goswami**, **V K**, **and Chauhan B**. (**2003**). Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. *Process biochemistry*, *38*(11), 1599-1616.

Hassan SAA, **and Bakhiet SEA**. (**2017**). Optimization of antibacterial compounds production by *Aspergillus fumigatus* isolated from Sudanese indigenous soil. *International Biological and Biomedical Journal.* 3(4):203–208.

He B, **Tu**, **Y**, **Jiang C**, **Zhang Z**, **Li Y**, **and Zeng B**. (**2019**). Functional Genomics of *Aspergillus oryzae*: Strategies and Progress. *Microorganisms*, *7*(4), 103.

Hoffman A M, **Mayer S G**, **Strobel G A**, **Hess W M**, **Sovocool G W**, **Grange A H**, **Harper J K**, **Arif A M**, **Grant D M**, **and Kelley-Swift E G**. **2008**. Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic Phoma species. *Phytochemistry*. 69: 1049-1056

Hussain H, **Kliche-Spory C**, **Al-Harrasi A**, **Al-Rawahi A**, **Abbas G**, **Green I R**, ... **and Shah A**. (**2014**). Antimicrobial constituents from three endophytic fungi. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, *7*, S224-S227.

Joana Gil-Chávez G, **Villa J A**, **Fernando Ayala-Zavala J**, **Basilio Heredia J**, **Sepulveda D**, **Yahia E M**, **and González-Aguilar G A**. (**2013**). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 5-23.

Jooyendeh H, **Kaur A**, **Minhas KS**. (**2009**). Lipases in dairy industry: A review. *Journal of Food Science and Technology* . 46(3):181-9.

Juneius R. **and Selvin J**, (**2012**). Process optimization for the production of antimicrobial compounds from marine sponge associated bacteria *Rhodopseudomonas palustris MSB 55. Indian Journal of Innovations and Developments*. 1 (2): 74-79.

Junichiro M, **Sumiko O-K**, **Tomohiro A**, **Nishimura M**, **Koike H**, **Masayuki M** (**2010**). Penicillin biosynthesis in *Aspergillus oryzae* and its overproduction by genetic engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **110**: 8-11.

Kaur H, **Onsare J G**, **Sharma V**, **and Arora D S**. (**2015**). Isolation, purification and characterization of novel antimicrobial compound 7-methoxy-2, 2-dimethyl-4-octa-4′, 6′-dienyl-2H-napthalene-1-one from *Penicillium* sp. and its cytotoxicity studies. *AMB Express*, 5(1), 40.

Kitamoto K, **Arioka M**. **and Ohneda M**. (**2005**). Isolation and characterization of *Aspergillus oryzae* vacuolar protein sorting mutants. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 :4856 - 4861.

Kogej T, **Ramos J**, **Plemenitas A**. **and Gunde-Cimerman N**. (**2005**). The halophilic fungus *Hortaea werneckii* and the halotolerant fungus *Aureobasidium pullulans* maintain low intracellular cation concentrations in hypersaline envirenments. *Applied and Environmental Microbiology.* 71: 6600-6605.

Kumar D, **Savitri T N**, **Verma R**, **and Bhalla T C**. (**2008**). Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal of Microbiology*, *3* (12), 661-672.

KumarVP, **Chauhan NS**, **Padh H**, **and Rajani M**. (**2006**). Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* ,107 ,182–188.

Kunamneni A, **Permaul K and Singh S**. (**2005**). Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100:168-171.

Lee C. **K**., **Darah**, **I**., **& Ibrahim**, **C**. **O**. (**2011**). Production and optimization of cellulase enzyme using *Aspergillus niger* USM AI 1 and comparison with *Trichoderma reesei* via solid state fermentation system. *Biotechnology Research International*, *2011.*

Lee K, **Lee S K**, **and Lee B D**. (**2006**). *Aspergillus oryzae* as probiotic in poultry-A review. *International Journal of Poultry Science*, *5* (1), 1-3.

Li E, **Jiang L**, **Guo L**, **Zhang H**. **and Che Y**. (**2008**). Pestalachlorides A-C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16: 7894-7899.

Li Y, **Song YC**, **Liu JY**, **Ma YM**, **and Tan RX**. (**2005**). Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. *World J Microbiol Biotechnol*. 21(4):553–558.

Ma J, **Zhang XL**, **Wang Y**, **Zheng JY**, **Wang CY**, **and Shao CL**. (**2017**) **X**. Aspergivones A and B, two new flavones isolated from a gorgonian-derived *Aspergillus candidus* fungus. *Natural Product Research*. 31(1):32–36.

Ma X, **Nong X**, **Ren Z**, **Wang J**, **Liang X**, **Wang L**, **Qi S**. (**2017**) **Y**. Antiviral peptides from marine gorgonian-derived fungus *Aspergillus sp*. SCSIO 41501. *Tetrahedron Letters*. 58 (12):1151–1155.

Machida M, **Asai K**, **Nierman W C**, **Archer B D**, **Bennett J W**, **Kato M**, **Sawano T**, **Komori T**, **Kuhara S**, **Kikuchi H**. (**2005**). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. 438 : 22-29.

Mahadik N D, **Puntambekar U S**, **Bastawde K B**, **Khire J M**, **and Gokhale D V** (**2002**). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*, *38* (5), 715-721.

Manpreet S, **Sawraj S**, **Sachin D**, **Pankaj S**, **and Banerjee U**. **C**. (**2005**). Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 1 (2): 1-9.

Martinelle M. (**1995**). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase . *Biochimica et Biophysica Acta*. 1258, p. 272-276.

Mathan S, **Subramanian V**, **Nagamony S**. (**2013**). Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297, *European Journal of Experimental Biology*. 3138–44.

Mechakra A, **Auberger B**, **Remeuf F**, **Lenoir J**. (**1999**). Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti. Sciences des aliments*. 19: 663–675.

Meenupriya J, **and Thangaraj M**. (**2010**). Isolation and molecular characterization of bioactive secondary metabolites from Callyspongia spp. associated fungi. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, *3*(9), 738-740.

Merlin J N, **Christhudas I V S N**, **Kumar P P**, **and Agastian P**. (**2013**). Optimization of growth and bioactive metabolite production: *Fusarium solani. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 6* (3), 98-103.

Modhafar Al K . (**1998**). Etude cinétique du mode d'action de l'alpha-amylase pancréatique de porc : mise en évidence de sites fonctionnels d'attachement de ligands. Aspects moléculaires et cellulaires. Thèse de doctorat, Marseille.

Mohapatra B R, **Bapuji M**. **and Sree A**. (**2003**). Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms. *Acta Biotechnologica*. 23 :75–84

Mohd S A, **Mallappa K S**, **Sinniah U R**. (**2019**). Natural Bioactive Compounds: Volume 1: Production and Applications. *Springer Nature*. pp. 608.

Monggoot S, **Pichaitam T**, **Tanapichatsakul C**, **Pripdeevech P**. (**2018**). Antibacterial potential of secondary metabolites produced by *Aspergillus* sp., an endophyte of Mitrephora wangii. *Archives of Microbiology*. 200(6):951–959.

Morin O., (**1994**), *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.

Mosmann T. (**1983**). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65(1–2):55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

Muthulakshmi C, **Gomathi D**, **and Kumar D G**. (**2011**). Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid-state fermentation. *Jordan Journal of Biological Sciences.* 147: 1–12

Naik B S, **Shashikala J**, **and Krishnamurthy Y L**. (**2009**). Study on the diversity of endophytic communities from rice (Oryza sativa L.) and their antagonistic activities *in vitro*. *Microbiological Research*. 164: 290-296

Naz Z. (**2015**). Introduction to biotechnology. Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan. DOI: 10.13140/RG.2.1.3517.8968

Nicoletti R, **and Vinale F**. (**2018**). Bioactive Compounds from Marine-Derived *Aspergillus, Penicillium, Talaromyces* and *Trichoderma* Species. *Marine Drugs. 16*, 408.

Nizamuddin S, **Sridevi A**, **and Narasimha G**. (**2008**). Production of β-galactosidase by *Aspergillus oryzae* in solid- state fermentation. *African Journal of Biotechnology*. 7: 1096-1100.

Olempska-Beer Z S, **Merker RI**, **Ditto MD**, **and Di Novi MJ**. (**2006**). Food-processing enzymes from recombinant microorganisms a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 45 :144-158.

Pandey A, **Soccol C R**, **and Mitchell D**. (**2000**). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35: 1153-1169

Petit P, **Lucas E M**, **Abreu L M**, **Pfenning L H**, **and Takahashi J A**. (**2009**). Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, *12* (4), 8-9.

Prabhakar T, **Kumar KA**, **and Ellaiah P**. (**2002**). The Effect of Cultural Conditions on the Production of Lipase by Fungi. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 61:123-127.

Prathyusha P, **Rajitha Sri A B**, **and Satya Prasad K**. (**2015**). Diversity and enzymatic activity of foliar endophytic fungi isolated from medicinal plants of Indian dry deciduous forest. *Pharma Letter*. *7*(8), 244-251.

Qin S, **Xing K**, **Jiang J H**, **Xu L H**, **and Li W J**. (**2011**). Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Applied Microbioogyl and Biotechnology* . 89: 457-473.

Rahman MA, **Begum MF**, **Alam MF**. (**2009**). Screening of *Trichoderma* Isolates as a Biological Control Agent against *Cera- tocystis paradoxa* Causing Pineapple Disease of Sugarcane, *Mycobiology*. 37: 277-285.

Rahmoun N M, **Boucherit-Otmani Z**, **Boucherit K**, **Benabdallah M**, **Villemin D**, **and Choukchou-Braham N**. (**2012**). Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. *Medecine et maladies infectieuses*. *42* (6), 270-275.

Raveendran S, **Parameswaran B**, **Beevi Ummalyma S**, **Abraham A**, **Kuruvilla Mathew A**, **Madhavan A**, ... **and Pandey A**. (**2018**). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food technology and biotechnology*, *56*(1), 16-30.

Robinson P K. (**2015**). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, *59* : 1-41.

Sadrati N, **Daoud H**, **Zerroug A**, **Dahamna S**, **and Bouharati S**. (**2013**). Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (Triticum durum). *Journal of plant protection research*, *53*(2).

Sahu MC, **Debata N K**, **and Padhy R N**. (**2012**). Antibacterial activity of Argemone mexicana L. against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical samples. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,* S800-S807.

Sandhya C, **Nampoothiri K M**, **and Pandey A**. (**2005**)**a**. Microbial proteases. In *Microbial enzymes and biotransformations* . *Humana Press*. pp. 165-179

Sandhya C, **Sumantha A**, **Szakacs G**, **and Pandey A**. (**2005**)**b**. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process biochemistry*, *40*(8), 2689-2694.

Sasidharan S, **Chen Y**, **Saravanan D**, **Sundram K M**, **and Latha L Y**. (**2011**). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1).

Schutyser M A I. (**2003**). Mixed solid-state fermentation: Numerical modeling and experimental validation. Ph. D. Thesis, Wageningen University. The Netherlands. p. 7-9.

Scriban R. (**1993**). Biotechnologie. Technique et Documentation Lavoisier, 4e édition. Paris .

Seanego C T, **and Ndip R N**. (**2012**). Identification and antibacterial evaluation of bioactive compounds from Garcinia kola (Heckel) seeds. *Molecules*, *17*(6): 6569-6584.

Seshime Y, **Juvvadi PR**, **Fujii I**, **Kitamoto K**. (**2005**). Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 331:253–260.

Shah I J, **Gami P N**, **Shukla R M**, **and Acharya D K**. (**2014**). Optimization for α-amylase production by *Aspergillus oryzae* using submerged fermentation technology. *Basic research journal of microbiology*, *1*(4): 01-10.

Silber J, **Kramer A**, **Labes A**, **and Tasdemir D**. (**2016**). From discovery to production: biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics. *Marine drugs*, *14*(7): 137.

Singh P. **nee'Nigam and Pandey A**. (**2009**). Solid-state fermentation technology for bioconversion of biomass and agricultural residues. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, DOI 10.1007/978-1-4020-9942-7-10

Singh C, **Parmar R S**, **Jadon P**, **and Kumar A**. (**2017**). Optimization of Cultural Conditions for Production of Antifungal Bioactive Metabolites by Streptomyces spp. Isolated from Soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *6*(2): 386-396.

Singhania R R, **Patel A K**, **Soccol C R**, **and Pandey A**. (**2009**). Recent advances in solidstate fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44: 13-18.

Sivaramakrishnan S, **Gangadharan D**, **Nampoothiri K M**, **Soccol C R**, **and Pandey A**. (**2007**). Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 66: 621-626.

Sosa A, **Kobashigawa E**, **Galindo J**, **Bocourt R**, **Corassin C H**, **and Oliveira C A F** (**2013**). Mycotoxicological studies of an *Aspergillus oryzae* strain. *Journal of Yeast and Fungal Research*, *4*(3), 26-32.

Sousa C D S, **Soars A C F and Garrido M D S**. (**2008**). Characterization of streptomycetes with potential to promot plant growth and biocontrol. *Scientia Agricola*. 65: 50-55.

Subramaniyam R, **and Vimala R**. (**2012**). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International journal of science and nature*. 3(3), 480-486.

Sumantha A, **Sandhya C**, **Szakacs G**, **Soccol C R**, **and Pandey A**. (**2005**). Production and partial purification of a Neutral metallo-protease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 43 (4): 313-319.

Sunitha V H, **Nirmala Devi D**, **and Srinivas**, **C**. (**2013**). Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, *9*(1), 1-9.

Tabuc C. (**2007**). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. UPSP de Mycotoxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse Laboratoire Biologie Animale, IBNA Balotesti. p. 190.

Taskin E, **Eltem R**, **Silva E S D**, **and Souza J V B D**. (**2008**). Screening of *Aspergillus* strains isolated from vineyards for pectinase production. *Journal of Food, Agriculture & Environment* , 6: 412-414.

Thongwai N, **and Kunopakarn J**. (**2007**). Growth inhibition of Ralstonia solanacearum PT1J by antagonistic bacteria isolated from soils in the Northern part of Thailand. *Chiang Mai Journal of Science* . 34 : 345-354.

Verhoeckx K, **Cotter P**, **López-Expósito I**, **Kleiveland C**, **Lea T**, **Mackie A**, **and Wichers H**. (**2015**). The impact of food bioactives on health: *in vitro* and ex vivo models , p. 338. *Springer Nature*.

Viniegra-González G, **Favela-Torres E**, **Aguilar C N**, **de Jesus Rómero-Gomez S**, **Dıaz-Godınez G**, **and Augur C**. (**2003**). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, *13*(2-3), 157-167.

Vittaladevaram V. (**2017**). Fermentative Production of Microbial Enzymes and their Applications: Present status and future prospects. *Journal of Applied Biology & Biotechnology. 5* (04), 090-094.

Webster J, **and Weber R W S**. (**2007**). Introduction to fungi. Third ed. Combridge University Press. New York. p. 696 .

Yang L, **Lübeck M**, **Ahring B K**, **and Lübeck P S**. (**2016**). Enhanced succinic acid production in Aspergillus saccharolyticus by heterologous expression of fumarate reductase from Trypanosoma brucei. *Applied microbiology and biotechnology. 100* (4), 1799-1809.

Zamber, **V**. (**2010**). Solid-state fermentation of Aspergillus oryzae for glucoamylase production on agro residues. *International Journal of life sciences*, 4: 16-25.

Zhao K, **Penttinen P**, **Guan T**, **Xiao J**, **Chen Q**, **Xu J**, **Lindström K**, **Zhang L**, **Zhang X**, **and Storbel G A**. (**2011**). The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. *Curre Microbiol*ogy. 62: 182-190.

الملحـــــقـــات

الملحق 1: تركيب نخالة القمح المستعملة

قيم المركبات المقاسة (%)	القيم التجريبية (%)	القيم المرجعية (Boudouma، 2009)
مادة جافة	93.3	88
نسبة الرطوبة	6.7	12
الرماد	4.65	5.5
مجموع المواد النيتروجينية	16.3	14.5
الكربوهيدرات	62.5	59.8
الليبيدات	6	4.48
الألياف	27	41.7

الملحق 2: تركيب الأوساط الزراعية المستعملة

1- وسط مستخلص البطاطا PDA Potato Dextrose Agar:

- مستخلص البطاطس.....200 غ
- أجار.....15 غ
- غلوكوز.....20 غ
- ماء مقطر.....1000 ملل

2- وسط YESA Yeast Extract Sucrose Agar :

- مستخلص الخميرة.....20 غ
- $MgSO4,5H2O$.....0.5 غ
- سكروز.....150 غ
- Trace metal 1ملل
- ماء مقطر.....1000ملل
- **Trace metal**:
- $ZnSO_4,7H_2O$ .....1 غ
- $CuSO_4,7H_2O$ ..... 0.5 غ
- مـاء مقطر..... 100ملل

3- وسط Czapek:

- $Na\ NO_3$ .....2 غ
- KH_2PO_4 .....1 غ
- $Mg\ SO_4.7H_2O$.....1 غ
- KCl ..... 0.5 غ
- $FeSO_4.7H_2O$ ..... 0.01 غ
- سكروز.....30 غ
- أجار.....15 غ

- ماء مقطر.....1000 ملل

4- وسط Saboraud:

- بيبتون.....10 غ
- غلوكوز.....40 غ
- أجار.....20 غ
- ماء مقطر.....1000ملل

5- وسط Glucose yeast extract peptone agar (GYP)

- بيبتون.....0.5 غ
- مستخلص الخميرة.....0.1 غ
- غلوكوز.....1 غ
- أجار.....16 غ
- ماء مقطر.....1000ملل

6- وسط Pepton Agar (PA)

- بيبتون.....10 غ
- NaCl.....5 غ
- $CaCl_2$.....1 غ
- أجار.....16 غ

- ماء مقطر.....1000مل

7- وسط معدني أدنى (MGM)

- NaH_2PO_4 ..... 12غ
- KH_2PO_4.....2غ
- $MgSO_4.7H_2O$.....0.3غ
- $CaCl_2$.....0.25غ
- كبريتات الأمونيوم.....1%
- زيت زيتون.....2%
- ماء مقطر.....1000مل

8- المحلول الملحي

- K_2HPO_4.....1غ
- $NaNO_3$.....3غ
- $MgSO_4$.....0.5غ
- $FeSO_3$.....0.01غ
- KCL.....0.5غ

9- محلول الخل المنظم 0.1 مولار pH 5

- أسيتات الصوديوم.....5.7غ

- حمض الأسيتيك.....1.7غ

- ماء مقطر.....1000مل

10- محلول الفوسفات المنظم 0.1 مولار pH 7

- $Na_2HPO_4-7H_2O$.....20.2غ

- $NaH_2PO_4H_2O$.....3.4غ

- ماء مقطر.....1000مل

11- **محلول الفوسفات المنظم 0.02 مولار pH 6**

- $Na_2HPO_4-7H_2O$.....0.73غ

- $NaH_2PO_4H_2O$.....2.38غ

- ماء مقطر.....1000مل

الملحق 3 : طريقة تحضير محلول حمض ثنائي نيتروساليسيكليك (DNSA)

حضر المحلول بإذابة 1 غ من المادة DNSA-3،5 في 50مل من الماء المقطر، بعدها يضاف إلى المحلول 20 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم 8% و 30 غ من ترترات الصوديوم و البوتاسيوم وأكمل الحجم إلى 100مل من الماء المقطر (ماهود السوداني، 2015).

الملحق 4: جداول التحليـــلات الإحصائيـــــــة

جدول 4-1. إختبار النشاطية المضادة للميكروبات لمستخلصات الإيثيل أسيتات للعزلات الثلاث

الكائنات الحية الدقيقة الممرضة	مناطق التثبيط (مم) (SD±M)		
عزلات *A. oryzae*	S1	S2	S3
Salmonella typhi	0.57±18.66	1.15±15.66	1.52 ±16.66
S. aureus	00±20	00±00	00±00
MRSA	3.21±23.33	0.57±16.33	1.73±17
E. coli	2.08±20.33	00±15	3.21±14.33
B. cereus	0.57±24.66	1.15±21.66	2.51±20.33
S. typhimurium	2.08±17.66	0.57±13.33	1.52±14.66
P. aeruginosa	2.64±26	2±23	00±20
K. pneumoniae	2.08±23.33	0.57±20.33	1±20
ECRB	1±25	00±00	2.64±19
C. albicans	1±18	1±11	0.57±14.66

جدول4-2 . تأثير درجة الحرارة على النشاطية المضادة للميكروبات

درجة الحرارة (°م)	قطر التثبيط (مم)		
	C. albicans	*S. aureus*	*E.coli*
25	18.33±1.52	20.66±0.57	10±00
28	30±00	12.83±0.76	12.83±0.76
30	30±00	21±01	19.66±0.57
35	21±3.46	12±00	13±00

كل نقطة تمثل المتوسط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري (M±SD).

جدول4-3 . تأثير درجة الأس الهيدروجيني على النشاطية المضادة للميكروبات

درجة الأس الهيدروجيني	قطر التثبيط (مم)		
	C. albicans	*S. aureus*	*E.coli*
4	8.33±0.57	15.33±1.52	15±00
6	09±00	15±00	16±00
8	00	00	00
11	00	00	00

كل نقطة تمثل المتوسط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري (M±SD).

جدول4-4 . تأثير الملوحة على النشاطية المضادة للميكروبات

تركيز NaCl (مولار)	قطر التثبيط (مم)		
	C. albicans	*S. aureus*	*E.coli*
0.5	00	11±01	09±00
1	00	12.66±0.57	00
1.5	00	00	00
2	00	00	00

كل نقطة تمثل المتوسط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري (M±SD).

جدول4-5 . تأثير مدة الحضن على النشاطية المضادة للميكروبات

مدة الحضن (يوم)	قطر التثبيط (مم)		
	C. albicans	*S. aureus*	*E.coli*
7	9.66±0.57	23±01	21±1.73
14	10.33±1.15	22±01	21.66±1.52
21	10±00	19.33±2.08	27±6.08
28	14±02	22.33±2.51	28.33±2.51

كل نقطة تمثل المتوسط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري (M±SD).

جدول4-6. المؤشرات الأنزيمية للعزلات الثلاث

الأنزيم / العزلات	الأميلاز	الليباز	البروتياز
	المؤشر الأنزيمي		
S1	1.25±00	1.025±0.035	1.2±0.028
S2	1.16±0.056	01±00	1.175±0.035
S3	1.1±00	1.01±0.014	1.19±0.014

كل نقطة تمثل المتوسط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري (M±SD).

جدول4-7 . مقارنة إنتاج الأنزيمات بين استعمال التخمر في الحالة السائلة والصلبة

الأنزيم / نوع التخمر	الأميلاز (وحدة دولية)	الليباز (وحدة دولية)	البروتياز (وحدة دولية)
SSF	20.21±0.99	19.5±0.93	29.8±1.91
SmF	2.37±0.39	1.98±0.44	15.95±1.57

كل نقطة تمثل المتوسط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري (M±SD).

جدول4-8 . تأثير درجة الحرارة على النشاطية الأنزيمية

درجة الحرارة (°م)	النشاطية الأنزيمية		
	الأميلاز (وحدة دولية)	البروتياز (وحدة دولية)	الليباز (وحدة دولية)
25	14.13±0.12	30.115±0.77	13.175±0.219
28	15.9±0.67	28.13±0.834	15.855±0.20
30	20.41±0.13	32.771±1.03	17.430±0.141
35	11.99±0.091	28.295±0.742	14.340±0.452

جدول.4-9 تأثير نسبة الرطوبة على النشاطية الأنزيمية

نسبة الرطوبة (%)	النشاطية الأنزيمية		
	الأميلاز (وحدة دولية)	البروتياز (وحدة دولية)	الليباز (وحدة دولية)
50	146.92±0.537	21.305±0.615	79.425±0.813
75	153.645±2.199	25.045±0.134	85.575±0.601
100	247.515±4.447	35.535±0.869	172.735±0.841
125	140.110±1.357	27.555±0.289	91.790±2.177

كل نقطة تمثل المتوسط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري (M±SD).

جدول4-10 . تأثير حجم اللقاح على النشاطية الأنزيمية

حجم اللقاح (مل)	النشاطية الأنزيمية		
	الأميلاز (وحدة دولية)	البروتياز (وحدة دولية)	الليباز (وحدة دولية)
0.5	33.145±0.289	3.255±0.106	67.230±0.806
1	43.932±0.115	33.960±0.763	101.835±13.116
2	150.99±0.565	19.765±0.346	87.539±1.895
3	46.385±1.152	18.875±0.643	71.800±8.442

كل نقطة تمثل المتوسط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري (M±SD).

جدول4-11 . تأثير مصادر الكربون على النشاطية الأنزيمية

مصدر الكربون	النشاطية الأنزيمية		
	الأميلاز (وحدة دولية)	البروتياز (وحدة دولية)	الليباز (وحدة دولية)
النشاء	61.365±0.247	91.805±6.526	73.33±00
الغليسيرول	155.710±27.209	100.925±2.199	93.33±9.432
الغلوكوز	81.485±13.979	100.565±3.104	71.665±11.787
السكروز	108.660±26.40	105.960±12.600	67.495±1.180
الشاهد	20.700±0.753	29.495±2.609	19.160±1.032

كل نقطة تمثل المتوسط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري (M±SD).

جدول4-12 . تأثير مصادر النيتروجين على النشاطية الأنزيمية

مصدر النيتروجين	النشاطية الأنزيمية		
	الأميلاز (وحدة دولية)	البروتياز (وحدة دولية)	الليباز (وحدة دولية)
نترات البوتاسيوم	121.210±33.856	78.080±5.359	68.330±16.503
نترات الصوديوم	130.055±34.103	83.500±15.330	113.330±18.851
كاربونات الأمونيوم	81.315±22.563	98.755±12.310	70±14.142
بيبتون	92.760±19.134	76.170±6.858	33.330±00
الشاهد	20.700±0.753	29.495±2.609	19.160±1.032

كل نقطة تمثل المتوسط الحسابي لثلاث مكررات±الإنحراف المعياري (M±SD).

الملحـــق 5: طريـــــــــقة حســـــــاب النشاطيـــــة الأنزيمية

مثال لحساب النشاطية الأنزيمية لأنزيم البروتياز:

عدد المولات = الكتلة / الكتلة المولية ..... (**1**)

الكتلة المولية للتيروزين هي 181.19 غ/ مول

إنطلاقا من المنحنى العيارية للتيروزين نستخرج كتلة التيروزين الموافقة لكل قيمة كثافة ضوئية (D.O)

مثال: الكثافة الضوئية 0.164 تقابلها كتلة التيروزين 29.03 ميكروغرام ومنه عدد المولات **=** 0.1602 ميكرومول.

يعبر عن وحدة واحدة من نشاط الأنزيم بكمية الأنزيم الذي حرر 1 ميكرومولار من التيروزين في الدقيقة (وحدة دولية تساوي 1 ميكرومولار / دقيقة) أي:

0.1602 ميكرومول ⟵ 1 مل من الحجم الكلي لمحلول التفاعل

س ⟵ 1000 مل

س= 160.21 ميكرومولار

160.21 ميكرومولار ⟵ 10 دقائق (مدة التفاعل)

س ⟵ 1 دقيقة

س=16.021 وحدة دولية

الملحـــق 6: طريـــــــــقة تحضير المعلق البوغي و حســـــــاب عدد الأبواغ

استخدم المحلول الفيسيولوجي المعقم لتحضير المعلق البوغي، حيث أضيف 10 مل من هذا المحلول لمستعمرة فطرية متبوغة بعمر 7 أيام. كشطت المستعمرة قليلا للحصول على الأبواغ، وضع المعلق البوغي على جهاز الرجاج الكهربائي لمدة 10 دقائق لتأمين توزيع متجانس للأبواغ في المعلق، ثم خفف المعلق البوغي بإضافة المحلول الفيسيولوجي للوصول إلى التخفيف 10^{-4}، أخذ بعد ذلك 100 ميكرولتر من المعلق و100 ميكرولتر من أزرق الميثيلين وتم حساب تركيز الأبواغ باستخدام شريحة مالسييه counting Malassez chamber وفق المعادلة التالية :

التركيز (خلية حية/ مل) = متوسط عدد الخلايا x معامل التخفيف x التخفيف

متوسط عدد الخلايا = عدد الخلايا / عدد المربعات

معامل التخفيف = الحجم النهائي / حجم المعلق

الملحـــق7 . تحضير المنحنيات العيارية للغلوكوز و التيروزين

1. المنحنى العياري للغلوكوز

حضر المنحنى العياري للغلوكوز بوصفه سكرا مختزلا لتقدير السكريات المختزلة في الأوساط المستعملة للتخمر. وقد اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل ماهود السوداني (2015).

انطلاقا من المحلول الأم للغلوكوز بتركيز 10مغ/مل، تم تحضير التراكيز 10، 20، 30، 30، 40، 50، 60، 70، 80، 90، 100 ميكروغرام/مل.

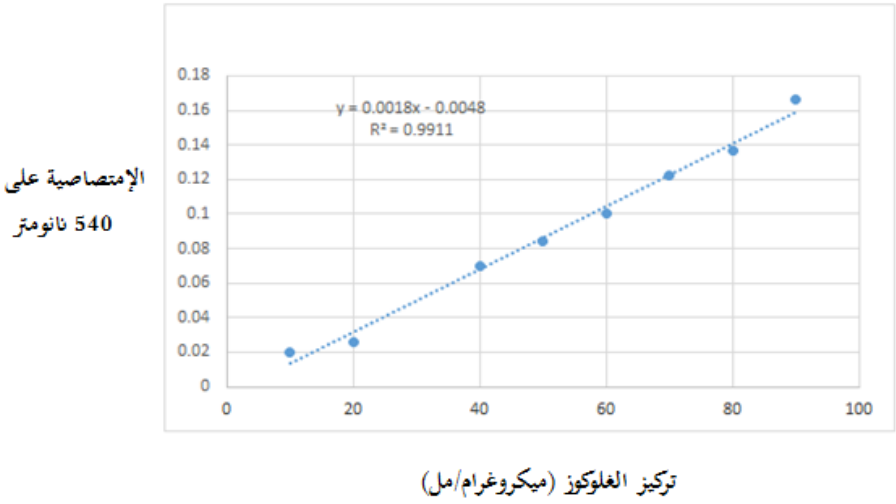
يضاف إلى 1 مل من كل تركيز، 1مل من محلول حمض 3،5-ثنائي نتروسالسيليك (DNSA)، ووضعت في حمام مائي مغلي لمدة 15د. وبعد أن تبرد الأنابيب يضاف 5 مل من الماء المقطر وترج جيدا. ثم تقرأ درجة الإمتصاص لكل تركيز عند طول الموجة 540 نانومتر. تحضر الأنابيب بثلاث مكررات لكل تركيز.

ملاحظة: يحضر الأنبوب الشاهد بنفس الطريقة لكن بدون الغلوكوز.

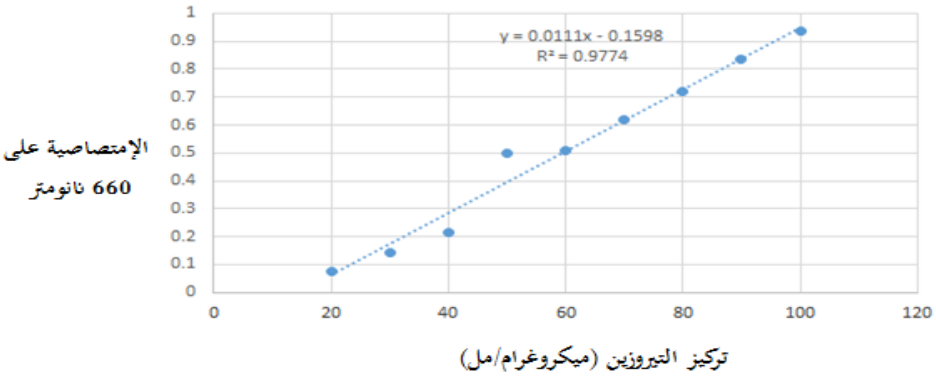
2. المنحنى العياري للتيروزين

انطلاقا من المحلول الأم للتيروزين بتركيز 10مغ/مل، تم تحضير التراكيز 20 ،30، 40، 50، 60، 70، 80، 90، 100 ميكروغرام/مل. تضاف بعد ذلك 2.5 مل من Na_2CO_3 0.44 مولار، و 0.5 مل من كاشف Folin ciocalteu مخفف بنسبة 3/1. ترج الأنابيب جيدا وتترك لمدة 30د، بعد ذلك تقرأ درجة الإمتصاص في طول الموجة 660 نانومتر. (Mechakra *et al.*, 1999) .تحضر الأنابيب بثلاث مكررات لكل تركيز.

ملاحظة: يحضر الأنبوب الشاهد بنفس الطريقة لكن بدون تيروزين.



المنحنى العياري للغلوكوز



المنحنى العياري للتيروزين

الملحـــق 8 . التسلسل النكليوتيدي لنواتج PCR للعزلة المرجعية SVP01 *Aspergillus oryzae*

رقم التسلسل (KP256849.1) ونسبة تطابقها مع السلالة المدروسة 18HG80 *A. oryzae*

التسلسل النكليوتيدي	نسبة التطابق مع السلالة 18HG80 *A. oryzae*	% 94
TGGCCCAGGAAGGGTTGGCAACGACCCCCCAGGGGCCGGAAAAGTTGGTCAAACCCGGTCATTTAGAAGG AAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTA GCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGTCATGGCCGCCG GGGGCGTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGT TGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAG CGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC CCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGT CGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTAT GGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAAACAACCATTTTTTCCAGGT TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGGAGGAAAAGAAACCAAC CGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGGGTCC GCATTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGGTGCGGCCCCTGTCTAAGTGCCCTGGAACGGGCCGTCAGAGA GGGTGAGAATCCCGTCTGGGATGGGGTGTCCGCGCCCGTGTGAAGCTCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGG GAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTCATCTAAAGCTAAATACTGGCCGGAGACCGATAGCGCACAA GTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGA AGCGCTTGCGACCAGACTCGCCTCCAGGGTTCAGCCGGCATTCGTGCCGGTGTACTTCCCTGGGGGCGGG CCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCTCCCGGAATGTAGTGCCCTCCGGGGCACCTTATAGCCGG GAGTGCAATGCGGCCAGCCTGGACCGAGGAACGCGCTTCGGCACGGACGCTGGCATAATGGTCGTAAACG ACCCGTCTTGAAACACGGACCAAGGAGTCTAACATCTACGCGAGTGTTCGGGTGTCAAACCCGTACGCGC AGTGAAAGCGAACGGAGGTGGGAGCCCCCTCGTGGGGCGCACCATCGACCGATCCTGAAGTCTTCGGATG GATTTGAGTAAGAGCGTAAATGTGGGGACCCGAAAGATGGTGAACTATGCCTGAATAGGGCGAAGCCAGA GGAAACTCTGGTGGAGGCTCGCAGCGGTTCTGACGTGCAAATCGATCGTCAAATTTGGGTATAGGGGCGA AAGACTAATCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCCTGCCGAAGTTTCCCTCAGGATAGCAGTAACGCGAATTC AGTTTTATGAGGTAAAGCGAATGATTAGAGGCATTGGGGTTGAAACAACCTTAACCTATTCTCAAACTTT AAATATGTAAGAAGCCCTTGTTGCTTAGTTGAACGTGGGCATTAGAATGGAGC		

الملـــــخـــص

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم قابلية فطر *Aspergillus oryzae* المعزول من تربة مالحة (سبخة البيضاء، ولاية سطيف) على إنتاج المستقلبات الثانوية ذات الأهمية البيوتكنولوجية. من بين ثلاث عزلات فطرية المتحصل عليها (S1، S2 و S3)، والتي أخضعت إلى إختبار النشاطية المضادة للبكتيريا، كانت العزلة (S1) والتي تم تحديد نمطها الوراثي بـ *A. oryzae* 18HG80، الأكثر نشاطا (التركيز الأدنى للتثبيط بين 7.28 و 21.81 ميكروغرام/مل). بالنسبة للنشاطية المضادة للفطريات الممرضة، فقد كانت فعالية المستخلص للسلالة *A. oryzae* 18HG80، منخفضة إلى متوسطة (9.3% بالنسبة لـ *Alternaria solani*، 46% بالنسبة لـ*Aspergillus flavus* و 37% لـ *Fusarium oxysporum*). من جهة أخرى تم إختبار هذه العزلة من حيث قدرتها على إنتاج أنزيمات الليباز، الأميلاز والبروتياز،و قد أظهرت دراسة المقارنة لإنتاج الإنزيمات من خلال عمليتي التخمر الصلبة باستعمال نخالة القمح (SSF) و السائلة (SmF) أن الإنتاج كان أكثر في SSF مقارنة بـ Smf. كما شملت هذه الدراسة أيضا على تعريف الجزيئات الحيوية المفرزة من طرف السلالة *A. oryzae* 18HG80 باستعمال كروماتوغرافيا الطور الغازي مع طيف الكتلة (GC/MS)، حيث أظهرت النتائج أن الفطر ينتج بالدرجة الأولى حمضي السيكسينيك والكوجيك بنسبة 42.284% و24.845% على الترتيب بالنسبة لمستخلص التخمر في الحالة السائلة، أما بالنسبة للتخمر في الحالة الصلبة فكانت نسبة إنتاج الحمضين أكبر نوعا ما (48% و 25.097% على الترتيب). كما اوضحت التجارب المخبرية لدراسة النشاطية المضادة للفيروسات للمستخلص الفطري، أن هذا الأخير ليس له أي تأثير على فيروس Herpes simplex-2 (HSV-2)، أما بالنسبة لإختبار السمية الخلوية فلم يبد المستخلص الفطري أي سمية للخلايا المختبرة.

حددت بعض الظروف المثلى لإنتاج الجزيئات الحيوية ذات نشاطية مضادة للميكروبات. إذ تم الحصول على أعلى تثبيط في درجة حرارة 30°م، ودرجة أس هيدروجيني4، 6 ، ومدة حضن 28 يوما. أما بالنسبة لإنتاج الأنزيمات باستعمال التخمر على وسط نخالة القمح الصلب، فقد تم الحصول على أعلى إنتاج للأنزيمات الثلاث في درجة حرارة 30°م ورطوبة بنسبة 100 % ، أما أفضل مصدر نيتروجيني وكربوني لنشاط أنزيمي الأميلاز والليباز هو نيترات الصوديوم و الغليسيرول على التوالي ، وحجم اللقاح 2 مل بالنسبة لأنزيم الأميلاز، أما بالنسبة لأنزيمي البروتياز والليباز فكان حجم اللقاح 1مل هو الأمثل.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus oryzae*، الجزيئات الحيوية، الأنزيمات الميكروبية، النشاطية المضادة للبكتيريا والفطريات، استخلاص المستقلبات الثانوية

Abstract

This study was conducted to assess the susceptibility of *Aspergillus oryzae* isolated from saline soils (Sebkha El Bayda, Setif) to the production of secondary metabolites that have biotechnological importance, as among three fungal isolates (S1, S2 and S3), which were subjected to an anti-bacterial activity test with following disc diffusion method, after extracting its secondary metabolites using ethyl acetate, the isolate (S1) whose genotype was determined was A. oryzae 18HG80, was the most active either against positive gram bacteria or negative gram bacteria, or tested resistance bacteria) .MIC is between 7.28 and 21.81µg/ml .Antifungal activity, of *A. oryzae* 18HG80 was low to moderate (9.3% for *Alternaria solani*, 46% for *Aspergillus flavus* and 37% for *Fusarium oxysporum*). On the other hand, this strain was tested in terms of its ability to produce the extracellular enzymes, lipase, amylase and protease. The comparative study of enzyme production through two fermentation processes (SSF) and (SmF) showed that enzyme production was more in SSF compared with Smf. Metabolite profiles of the fungus revealed by gas chromatography mass spectrometry GC/MS, allowed to identify bioactive compounds, where butanedioic (succinic) acid and kojic acid were the major compounds with total percentage of 42,284% and 24,845% respectively in SmF, while for SSF, the percentage of acid production was somewhat greater (48% and 25.097%), respectively. Antiviral activity of the fungal extract showed that the latter had no effect on the Herpes simplex-2 (HSV-2) virus. As for cellular toxicity testing, the fungal extract did not show any toxicity to the tested cells.

Optimization of cultural conditions for the production of biomolecules with antimicrobial activity showed that the highest inhibition was obtained at 30 ° C, pH 4, 6 and incubation period of 28 days. As for the production of enzymes using SSF, the highest production of the three enzymes was obtained at a temperature of 30 ° C and 100% humidity. The best nitrogen source for the amylase and lipase activity was sodium nitrate, while glycerol was the best one for the production of amylase, and the size of the inoculum was 2 ml for Amylase. As for protease and lipase enzymes, the size of the inoculum was1ml.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, biomolecules, microbial enzymes, antibacterial and antifungal activity, extraction of secondary metabolites

Résumé

Le but de cette étude est pour évaluer la capacité de champignon *Aspergillus oryzae* isolé à partir des sols salins (Sebkha el-Baida, Sétif) à la production de métabolites secondaires d'importance biotechnologique. Parmi les trois isolats fongiques obtenus (S1, S2 et S3), qui ont été soumis à un test d'activité antimicrobien, en suivant la méthode du disque de diffusion des extrait d'acétate d'éthyle, l'isolat (S1) dont le génotype a été déterminé était *A. oryzae* 18HG80, était le plus actif (CMI entre 7,28 et 21,81 µg / ml). L'activité antifongique, de l'extrait de la souche *A. oryzae* 18HG80 était faible à modérée (9,3% pour *Alternaria solani,* 46% pour *Aspergillus flavus* et 37% pour *Fusarium oxysporum*). D'autre part, cette souche a été testée en termes de sa capacité à produire des enzymes extracellulaires, lipase, amylase et protéase.

L'étude comparative de la production d'enzyme à travers deux processus de fermentation solide utilisant du son de blé (SSF) et liquide (SmF) a montré que la production était supérieure pour SSF par rapport au Smf. Cette étude a également inclus la définition des biomolécules sécrétées par la souche *A. oryzae* 18HG80 en utilisant la chromatographie en phase gazeuse avec spectre de masse (GC / MS), où les résultats ont montré que le champignon produit principalement de l'acide succinique et du kojic de 42,284% et 24,845%, respectivement lorsque l'extrait de fermentation était à l'état liquide, alors que pour la fermentation à l'état solide, le rapport de production était légèrement supérieur (48% et 25,097%), respectivement. L'activité antivirale de l'extrait fongique a montré que ce dernier n'avait aucun effet sur le virus Herpes simplex-2 (HSV-2). Quant aux tests de toxicité cellulaire, l'extrait fongique n'a montré aucune toxicité pour les cellules testées.

Certaines conditions optimales ont été déterminés pour la production de biomolécules à activité antimicrobienne. L'inhibition la plus élevée a été obtenue à 30 ° C, pH 6, 4, et durée de 28 jours. Quant à la production d'enzymes par fermentation solide, la production la plus élevée des trois enzymes a été obtenue à une température de 30 ° C et 100% d'humidité. La meilleure source d'azote et de carbone pour l'activité enzymatique de l'amylase et de la lipase est le nitrate de sodium et le glycérol, respectivement avec le volume d'inoculum est de 2 ml pour Amylase. Quant aux enzymes protéase et lipase, le volume d'inoculum optimale était de 1 ml.

Mots-clés: *Aspergillus oryzae*, biomolécules, enzymes microbiennes, activité antibactérienne et antifongique, extraction des métabolites secondaires.

Available online on 15.07.2020 at http://jddtonline.info

Journal of Drug Delivery and Therapeutics

Open Access to Pharmaceutical and Medical Research

© 2011-20, publisher and licensee JDDT, This is an Open Access article which permits unrestricted non-commercial use, provided the original work is properly cited

Open Access Research Article

In Vitro Antimicrobial, Antiviral and Cytotoxicity Activities of *Aspergillus oryzae* Isolated From El-Baida Marsh in Algeria

***Nacef Houda Sara[1], Belhattab Rachid[2], Galvez Julio[3], Rodriguez-Sojo María Jesus[3,4], Vezza Teresa[3,4]**

[1] Department of Microbiology and Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas Setif 1 University, Algeria

[2] Department of Biochemistry and Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas Setif1 University, Algeria

[3] Department of Pharmacology, Biomedical Research Center (CIBM), 18071-Granada University, Spain

[4] Institute of Biosanitary Research of Granada (ibs.GRANADA), 18012-Granada, Spain

ABSTRACT

This work covers the study of antimicrobial and antiviral activities of the *Aspergillus oryzae* strain isolated from saline soil (El-Baida marsh in Algeria). The crude extract obtained with ethyl acetate displayed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and the yeast *Candida albicans* with a mean of 16.69 mm of inhibition zone and a minimal inhibitory concentrations MICs between 7.28 and 21.85 μgmL^{-1}. We also assessed the antiviral activity against Herpes simplex-2 Virus (HSV-2), in which no inhibitory effect was exhibited. In addition, cytotoxicity activity was tested in Caco-2 and RAW 264, a human epithelial and a murine macrophage cell line, respectively, revealing a no-toxic effect of the extract. The studied isolate extract possesses an antimicrobial property and its non-toxicity to the host cells becomes very important, and can be exploited for the production of new pharmacological and biotechnological agents.

Keywords: *Aspergillus oryzae,* antimicrobial activity, antiviral activity, cytotoxicity, fungal extraction.

Article Info: Received 19 April 2020; Review Completed 24 June 2020; Accepted 07 July 2020; Available online 15 July 2020

Cite this article as:

Nacef HS, Belhattab R, Galvez J, Rodriguez SMJ, Vezza T, *In Vitro* Antimicrobial, Antiviral and Cytotoxicity Activities of *Aspergillus oryzae* Isolated From El-Baida Marsh in Algeria, Journal of Drug Delivery and Therapeutics. 2020; 10(4):191-195 http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v10i4.4261

***Address for Correspondence:**

Nacef Houda Sara, Department of Microbiology and Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Nature and Life Sciences, Ferhat Abbas Setif 1 University, Algeria

1. INTRODUCTION

Filamentous fungi are extensive in the environment, and since a number of antibiotics have been isolated from different fungi such as *Penicillium janczewskii*, *P. Canescens* [1,2] the interest of the researchers towards bioactive compounds having different biological activities had increased. The discovery of penicillin was a real invention in medicine, and the research's interest for searching new antimicrobial metabolites from microorganisms is continued. Many intensive studies, mainly on terrestrial-derived and marine-derived fungi, displayed that fungi are a rich source of unique bioactive substances.[3]

Fungi are important source of secondary metabolites with novel biological activities.[4] Many fungal extracts substances have been found for their antimicrobial activity mainly from the fungus *Penicillium*,[5] that they supply a rich source of compounds for therapeutic applications including antibacterial, antifungal and antiviral agents .[2] *Aspergillus oryzae* is an important filamentous fungi in Japanese fermentation industry, as well as its capacity of the production of various enzymes makes it an perfect model for the research of protein secretion and gene expression .

A. oryzae has a great medicinal and pharmaceutical importance due to its ability to produce substances with antifungal activity such as Asperfuran and Oryzachlorin, in addition to antibiotics such as Penicillin. These countenances support the idea that *A. oryzae* is a suitable microorganism for fermentation and use in biotechnology.[6]

Because of the increased interest of researchers in microorganisms and their applications in food as nutritional supplements, in health as therapeutic pharmaceuticals, and in industry as cosmetics, detergents. In addition, the interest of researchers is also attributed to the problem of salinity,

due to the transformation of vast agricultural areas annually into areas not suitable for agriculture. The question that arises is: If this soil is not suitable for agriculture, can it be exploited in other indirect ways in various fields? The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antiviral activities of the crude ethyl acetate extract of *A. oryzae*, isolated from saline soil, against some common pathogenic microorganisms, in addition to the study of its cytotoxicity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study area

El-Baida marsh is one of the natural saline soils. It is located between latitudes 5° 53' 20" E - 5° 53' 30" E and latitudes 35° 57' 80" N - 35° 54' 20" N near Hammam El-Sukhna area (Setif region), an area of approximately 12.223 hectares. Soil surrounding the site is characterized by being less salty to salty, alkaline clay with a gradient composition.[7]

2.2. Culture media

The synthetic (Yeast Extract Saccharose) YES medium consisting of sucrose 15% (w/v), yeast extract 2%, $MgSO_4$ 0.05%, metal traces 0.1% ($ZnSO_4$,$7H_2O$ 1%, $CuSO_4$,$7H_2O$ 0.5%)) was used for secondary metabolites production. Muller Hinton agar MHA and broth MHB were used for bacterial isolates culture and sensitivity tests.

2.3. Fermentation and Antimicrobial assay

Seven days (potato dextrose agar) PDA plate fungal pure cultures were used to prepare discs. They were cut (6mm diameter) and placed into 250 mL Erlenmeyer flask containing 100mL of YES medium. The flasks were then incubated at 30 °C for 7 days. After fermentation, the mycelium with the medium was frozen at -10 °C for 2-3 hours, then crushed and centrifuged at 15000 rpm / 15 min.[8] Finally; samples were extracted twice with equal volumes (1:1 v/v) of ethyl acetate. The organic layers were evaporated to dryness in a rotary evaporator at 40 ± 1°C, the dry crude extracts were then dissolved in DMSO 50% and stored at 4 °C until used.[9,10]

2.3.1. Screening assay for antimicrobial activity using disc diffusion method

Ethyl acetate extract of *A. oryzae* was tested against a panel of human pathogenic microorganisms including, five Gram positive bacteria, (*Bcillus aureus ATCC*10876, *Staphylococcus aureus ATCC*25923, *Staphylococcus aureus resistant to methicillin (SARM) ATCC*43300, *Listeria sp.* and *Enterococcus sp.*), seven Gram negative bacteria (*Salmonella typhi ATCC*14028, *Escherichia coli ATCC*25922, *Salmonella typhimirium ATCC*13311, *Pseudomonas aeruginosa ATCC*27853, *Klebsiella pneumonia ATCC*700603, *Escherichia coli* resistant to a bactericide *ATCC*35218, and *Salmonella entarica*), and the yeast *Candida albicans.* Plates were prepared by spreading MHA and Sabouraud culture media by bacteria suspension 10^8 (Colony forming unit) CFU/mL and *C.albicans* 10^6 CFU/mL respectively, afterwards filter paper discs of 6 mm diameter were soaked with 20 µl of the fungal extracts and placed on the inoculated agar. The plates were then incubated at 37 °C, 24 h for bacterial isolates and 48-72 h for the yeast.[8]

Negative controls were prepared using the same solvents employed to dissolve the extracts. Antimicrobial activity was evaluated by measuring the zone of inhibition developed round the discs. Each assay in this experiment was performed in triplicate.

2.3.2. Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

MIC is the lowest concentration that inhibits visible growth after time incubation period of 18-24 hours; here, its determination was made from the measurement of the turbidity induced by the growth of the studied germs.[11] The MIC (µg/mL) of the crude extract of the fungus was determined using dilution method ELISA plate, where a series of two-fold dilutions (dissolved in DMSO up to 5% final DMSO concentration), were prepared in a 96 well-sterile microplate. 100 µl of corresponding media (Muller Hinton Broth) MHB for the bacteria and PDB (Potato Dextrose Broth) for the yeast were added, then 100 µl of the diluted extract was introduced in each well. These dilutions were inoculated with 25 µl of a solution containing 6 x 10^7 Colony Formatting Unit colony- forming unite per mL (CFU/mL) of bacterial suspension (*Bcillus aureus ATCC*10876, *S. aureus ATCC*25923, *SARM ATCC*43300, *E. coli ATCC*25922, *P. aeruginosa ATCC*27853*, K. pneumonia, ATCC*700603*)* and 7 x 10^7 CFU/mL of yeast suspension Candida *albicans.*[12,8] The well-which used as a negative control was prepared using the inoculum alone. The microplate was incubated at 37 °C for 24 hour. The data was the mean of triplicates.[13]

2.4. Antiviral activity essay

Antiviral activity of *A. oryzae* extract was examined against Herpes simplex-2 (HSV-2), according to Anand et al.[10] method. Briefly, 60µl of HEp-2 monolayer cells (a type of human epithelial cell) were grown in a plate of 96 wells and 40µl of viral suspension, obtained by seven successive ten-fold dilution in 2% FBS MEM (cow's serum / medium Minimum Basic), was added into five wells of microtiter plates (Four for antiviral, one as positive control and one without virus as negative control). The 96 well microplates were incubated at 37°C in 5% CO_2 atmosphere for 60 minutes to facilitate adsorption of virus to the cell line. The following concentrations of non-toxic fungal extracts of 40 µg, 30 µg, 20 µg and 10 µg were diluted with 2% FBS, MEM and 100 µl of each concentration with the medium were transferred into the virus inoculated monolayer cell lines and reincubated at 37 °C temperature for 3-4 days to allow multiplication of virus and subsequent development of cytopathic effect (CPE). Each well was observed under Inverted microscope every day for presence or absence of cytopathic effect. The experiment was conducted under sterile conditions in duplicates.

2.5. *In vitro* cytotoxicity test of *A. oryzae* extract in Caco-2 cells and Raw 264 cells

Cytotoxic activity of *A. oryzae* extract in murine macrophage RAW 264 and human epithelial Caco-2 cells was performed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. This test is indicative for mitochondrial NADH-dependent dehydrogenase activity, which is proportional to both cell viability and proliferation rates of treated cultures.[14] Both cell lines used, RAW 264 and Caco-2, were provided by the Cell Culture Unit of the University of Granada (Granada, Spain) and cultured in RPMI Medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, L-glutamine (2 mmol/L), penicillin (100 units/mL) and streptomycin (1 mg/mL) in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37 °C. Cells were seeded into 96 well plates at a density of 5 x 10^5 cells/well, grown until the formation of a monolayer, and thus incubated with different concentrations of the extract (50 and 100 µg/mL), not exceeding 1 % DMSO in content, for 24 h. Untreated and DMSO-treated cells were used as controls. The effect of the

extract on cell viability was checked with the CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's protocol [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] solution was added to each well and incubated for 1-4 h. The absorbance of the media was measured at 490 nm on a MRX Dynex microplate reader (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). The cellular viability was calculated from the absorbance value and compared with that of the untreated control cells.

3. RESULTS

3.1. Antimicrobial assay

A. oryzae isolate was tested for its antimicrobial activity, by disc diffusion method, it showed strong effects against the species tested with an inhibition zone diameters ranging from 17.66 mm to 26 mm, the largest of which was against *P. aeroginosa*, followed by ERBC with 25 mm, then *B. aureus* by 24 mm, and SARM by 23 mm. Meanwhile, there was no effect on the bacteria *Listeria sp., Enterococcus sp* and *Salmonella entarica*. As for the yeast, *C.allbicans* the isolate had a clear effect with 18 mm (Figure 1).

- The results showed that the MIC was 7.28 µg / ml for *B. aureus* and *P. aeruginosa* and 21.85 µg / ml for *C. albicans* and other tested bacteria (Table).

3.2. *In vitro* cytotoxicity assay

Incubation of Caco-2 and RAW 264 cells with different concentrations of *A. oryzae* extract (50 and 100 µg/ml) for 24 h, did not exhibit cytotoxicity as determined by MTT assay. In fact, the viability in treated cells reached similar values of those in untreated and DMSO-treated controls (Figure 2 and 3).

3.3. *In vitro* antiviral assay

The non-toxic concentrations of secondary metabolites of 40 µg, 30 µg, 20 µg and 10 µg were used for anti HSV-2 study. The secondary metabolites of *A. oryzae* did not show any inhibitory effect on HSV-2 and the complete cytopathic effect were observed (data not shown).

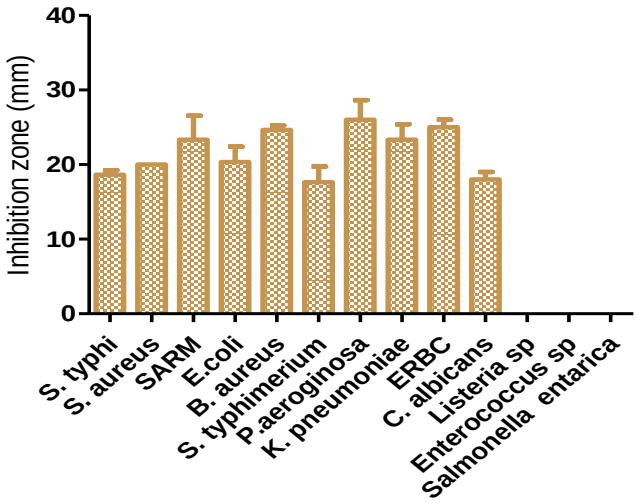


Figure1: Antimicrobial activity of *A. oryzae* ethyl acetate extract expressed as diameter inhibition zone (mm) in disc diffusion method

Table 1: Minimal inhibitory concentrations of *A. oryzae* ethyl acetate extract developed against a panel of bacteria and yeast

Microorganisms	*E. coli*	*K. pneumoniae*	*S. aureus*	*SARM*	*C. albicans*	*B. aureus*	*P. aeruginosae*
MIC (µg/mL)			21.85±0.35				07.28±0.13

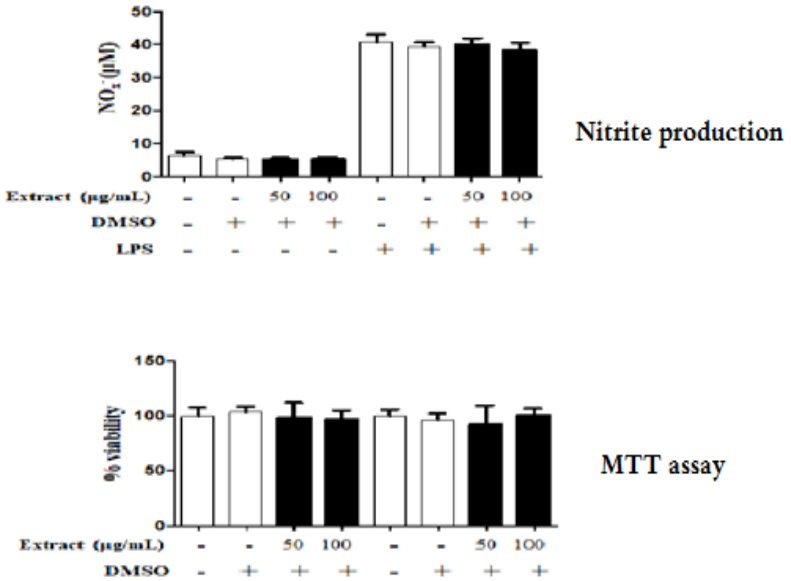


Figure 2: Effects of *A. oryzae* extract on nitric oxide production in RAW 264 cells. The experiments were performed three times.

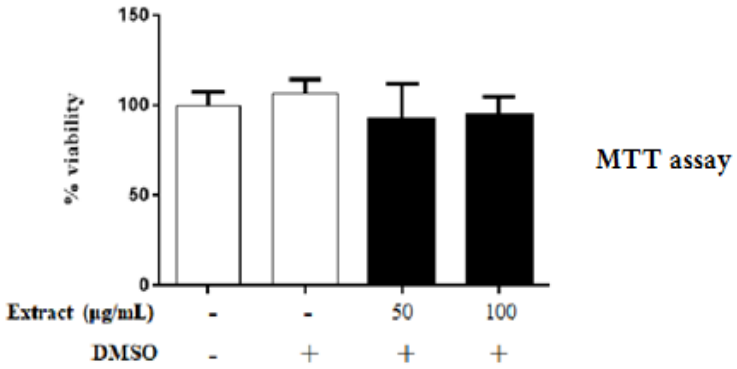


Figure 3: Cytotoxicity test of *A. oryzae* extract in CaCo-2 cells. The experiments were performed three times

4. DISCUSSION

The marsh (very salty lakes) constitutes rare regions in the world that seem to be promoter environments to isolate fungi source of new antimicrobial molecules.[15] Fungal derived natural products have foremost served as lead structures for the development of antibacterial and antiviral agents.[16]

In the present study, the fungal extract achieved the most activity against *P. aeruginosa*, *B. aureus, E. coli*-resistant and *S. aureus*-resistant bacteria. These findings are consistent with Bhattacharyya and Jha[17] in their study of the antimicrobial activity of *A. niger* against *Bacillus subtilis* and *C. albicans* yeast. Same results obtained by Al-fakih and Almaqtri[3] when testing the antibacterial activity of *A. oryzae* extract on seven bacterial species. However, the inhibition diameter ranged between 10-17.3 mm and the minimal inhibitory concentration (MIC) was between 176-285 µg / ml. Comparing with our results, this suggests that the isolated strain is better and more effective.

These results obtained are important since these bacteria are known to be pathogenic and resistant to many antibiotics, as they are responsible for hospital infections[18], such as *S. aureus* which is considered to cause skin infections[19], and *B. aureus* responsible of infections in many diseases, and causes food poisoning.[20]

Both *Penicilium* and *Aspergillus* are known for their extensive production of the same metabolites with various biological activities, including antibacterial and antifungal activities.[3] However initially, the antibiotics produced by *Aspergilli* were called aspirgillin, but recent studies have found that *A. oryzae* is able to produce several secondary metabolites with antibiotic effect such as aspergillormarasmine, cyclopiazonic acid (CPA), kojic acid, 3-nitropropionic acid, maltorizine, violacetin, whose production has been investigated only on barley extract as an antibiotic[21], in addition to Asperfuran as an antifungal agent[22], as well as CJ-17.665A isolated from *A. ochraceus*.[3]

A. oryzae fungus belongs to the family of *A. flavus*, but it doesn't produce aflatoxin[23], however, some mycotoxins have been isolated from *A. oryzae*, including kojic acid, and β-nitropropionic acid (BNP).), and cyclopiazonic acid (CPA), and some researchers have reported that kojic acid has strong inhibiting activity against tyrosinase and anti-bacterial activity, while recent studies have shown that kojic acid may be a possible carcinogen.[24] Unlike Seshime[25], it is believed that the fungus contains the gene responsible for producing aflatoxin toxins but is inactive due to mutations in some regulatory genes. Regarding toxicity, our results demonstrate that the isolate *A. oryzae* has non-toxic effect. In fact, incubation of both murine macrophage RAW 264 and human epithelial Caco-2 cell lines with different concentrations of the extract for 24 hours did not affect cell viability. These results are consistent with the study of Sosa et al.[26], who found that the fungus did not produce aflatoxin B1, B2, G1 , G2 as well as ochratoxin. As a result, *A. oryzae* is a safe fungus and was listed as "Generally Recognized as Safe" by the Food and Drug Administration (FDA), and its safety was supported by the World Health Organization (WHO).[24] Fungal strains used in industrial biotechnology have a long and documented history of a safe use of food and feed applications. Strains of *A. niger* and *A. oryzae* species have been used to ferment food for more than two thousand years and to manufacture food enzymes for more than 50 years. Regulatory authorities consider hundreds of enzymes produced in these species safe.[27]

The fact that the studied isolate extract possesses an antimicrobial property and its non-toxicity to the host cells becomes very necessary especially when it is used to prepare sterile or antiseptic substances or integrate it as one of the chemical components.[28]

CONCLUSION

From the above study, it is concluded that *A. oryzae* extract showed an antimicrobial activity against sensitive and resistant pathogenic microorganisms. Thus, it is of great importance in the treatment of pathologies associated with them because these strains exhibit high resistance to the antibiotics used in current therapeutic applications. However, to value this work it is necessary to follow it with purification and application *in vivo* of these bioactive substances, especially for its non-toxicity, so this isolate can be exploited for production of new pharmacological and biotechnological agents.

Acknowledgement

The authors want to thank the Biomedical Research Centre of Granada University for their help with the cytotoxicity assay and the Algerian ministry of higher education and scientific research.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Takahashi JA, Castro MCM de, Souza GG, et al. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Streptococcus pyogenes*and *Listeria monocytogenes*. JMM. 2008; 18:198–204. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.08.001
2. Kaur H, Onsare JG, Sharma V, Arora DS. Isolation, purification and characterization of novel antimicrobial compound 7-methoxy-2, 2-dimethyl-4-octa-4′, 6′-dienyl-2 H-napthalene-1-one from *Penicillium sp*. and its cytotoxicity studies. AMB Express. 2015; 5:40. DOI: 10.1186/s13568-015-0120-9.
3. Al-Fakih A A, and Almaqtri W Q A. Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp. Mycol. 2019; 10:191-209. DOI: 10.1080/21501203.2019.1604576.
4. Baker DD and Alvi KA. Small-molecule natural products: new structures, new activities. Curr Opin Biotech. 2004; 15:576–583. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.09.003.
5. Petit P, Lucas EM, Abreu LM, et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium sp.* isolated from Brazilian cerrado soil. EJBiotechnology. 2009; 12:8–9 DOI: 10.2225.
6. Junichiro M, Sumiko O-K, Tomohiro A, Nishimura M, Koike H, Masayuki M. Penicillin biosynthesis in *Aspergillus oryzae* and its overproduction by genetic engineering. J. Biosc. Bioeng. 2010; 110: 8-11. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.01.001.
7. Aliat T and Kaabeche M. Phytoecological characterization of the wetland Chott El Beida (Setif, Algeria). Bulletin de l'Institut Scientifique Rabat. 2013; 35:35–41.
8. Chaudhary R and Tripathy A. Isolation and Identification of Bioactive Compounds from *IrpexLacteus* Wild Fleshy Fungi. J Pharm Sci. 2015; 7:11
9. Sadrati N, Daoud H, Zerroug A, et al. Screening of Antimicrobial and Antioxidant Secondary Metabolites from Endophytic Fungi Isolated from Wheat (*Triticum Durum*).J Plant Prot Res. 2013; 53:129-136. https://doi.org/10.2478/jppr-2013-0019.
10. Anand D, Marimuthu S, Saravanan P, Rajarajan S. *In Vitro* Antiviral Activity of Fungal Secondary Metabolites against *Herpes Simplex* Virus-2. Int. J. Pharm. Sci.2016; 38:73-77.
11. Moroh J L A, Bahi C, Dje K, Loukou Y, Guede-Guina F. Study of the antibacterial activity of *Morindamorindoides* (Baker) milne-redheat (*rubiaceae*) acetatique extract (ACE) *in-vitro* growth of *Escherichia coli* strains. Bulletin de la sociétéroyale des sciences de Liège. 2008; 77:44-61.
12. Qadri M, Johri S, Shah BA, et al. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. Springerplus. 2013; 2:8. https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-8.
13. Rahmoun NM, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, et al. Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. Med Mal Infect. 2012; 42:270–275. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2012.05.002.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65(1–2):55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
15. Boughachiche F, Reghioua S, Oulmi L, et al. Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha de AïnMLila. Sciences & Technologie C, Biotechnologies. 2005 ; 23:5–10.
16. Hussain H, Kliche-Spory C, Al-Harrasi A, et al. Antimicrobial constituents from three endophytic fungi. Asian Pac J Trop Med. 2014; 7:S224–S227. https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60236-4.
17. Bhattacharyya P, Jha DK. Optimization of cultural conditions affecting growth and improved bioactive metabolite production by a subsurface *Aspergillus* strain. Int. j. appl. biol. pharm. 2011; 2:133-143.
18. Sahu M C, Debata N K, Padhy R N. Antibacterial activity of *Argemone mexicana* L. against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from clinical samples. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2012; S800-S807. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60316-5.
19. Camporese A, Balick MJ, Arvigo R, Esposito RG, Morsellino N, De Simone F, Tubaro A. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). J. Ethnopharmacol. 2003; 87:103–107. DOI: 10.1016/s0378-8741(03)00115-6.
20. Kumar VP, Chauhan N S, Padh H, Rajani M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 2006; 107:182– 188. DOI: 10.1016/j.jep.2006.03.013.
21. Blumenthal CZ. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichodermareesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. Regul Toxicol Pharmacol. 2004; 39:214–228. DOI: 10.1016/j.yrtph.2003.09.002
22. Farid M A F, Hoda M, and Abdel Halim S. Amylase production from *Aspergillus oryzae* LS1 by solid-state fermentation and its use for the hydrolysis of wheat flour. Iran J Biotechnol. 2011; 9: 267-274.
23. Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B. Mini-review On the safety of *Asperyillus oryzae*: a review. Appl Microbiol Biotechnol. 1992; 36: 569-572. DOI: 10.1007/BF00183230.
24. He B, Tu Y, Jiang C, Zhang Z, Li Y, Zeng B. Functional Genomics of *Aspergillus oryzae*. Strategies and Progress. Microorganisms. 2019; *7*(4):103. DOI: 10.3390/microorganisms7040103.
25. Seshime Y, Juvvadi PR, Fujii I, Kitamoto K. Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. BiochemBiophys Res Commun. 2005; 331:253–260. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.03.160.
26. Sosa A, Kobashigawa E, Galindo J, et al. Mycotoxicological studies of an *Aspergillus oryzae* strain. J. Yeast Fungal Res. 2013; 4:26–32. DOI: 10.5897/JYFR13.0111.
27. Frisvad J C, Møller L L, Larsen T O, Kumar R, Arnau J. Safety of the fungalworkhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger, Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2018; 102(22):9481-9515. doi: 10.1007/s00253-018-9354-1.
28. Muhammad Jamal Ali Abu Majdad, N. *In vitro* Antibacterial activity of bitter melon and turmeric extracts. Thi-Qar University Journal. 2009; 04:04.