عزل وتشخيص فطر *Penicillium sp.* من مصادر محلية مختلفة وتقييم مدى قدرته على إنتاج غلوكوز أوكسيداز

[1] سمر عيسى [2] أنور الحاج علي [3] صباح يازجي

الملخص

تم عزل 20 عزلة من فطر *Penicillium sp.* من مصادر محلية متنوعة (هواء، تربة ، عصائر ، مربيات...) وشخصت العزلات مظهرياً و مجهرياً، ثم تمت غربلتها لمعرفة مدى مقدرتها على إنتاج غلوكوز أوكسيداز باستخدام طريقة مرجعية، بعد تنميتها لمدة أربعة أيام على وسط يحتوي على O-anisidine ثم قيس مقدار إنتاج الأنزيم بالاعتماد على قطر الهالة اللونية حول المستعمرات الفطرية بعد إضافة البيروكسيداز . أثبتت الدراسة أن العزلات المحلية الخمس التالية Jm3 (*P.citrinum*) و Fr1(*P.citrinum*) و Jm4(*Penicillium sp*) و Be1 (*P.expansum*) و Ju1 (*P.paraherquei*) قادرة على إنتاج الأنزيم مقارنة بباقي العزلات ، بينما كانت العزلة Jm3 ذات كفاءة إفرازية أعلى حيث وصل متوسط قطر الهالة حول المستعمرة إلى 6.3±0.12 مم وتبين من التشخيص أن هذه العزلة تنتمي إلى النوع *Penicillium citrinum* ، مما يوضح أهمية هذه العزلة في إنتاج غلوكوز أوكسيداز لاستخدامه لاحقاً في مجالي الأغذية و الصيدلة .

الكلمات المفتاحية:

Penicillium ، أنزيم غلوكوز أوكسيداز ، O-anisidine

(١)طالبة ماجستير ، (٢،٣) أستاذ مساعد ، كلية الزراعة، قسم علوم الأغذية ، ص . ب ٣٠٩٢١. جامعة دمشق سوريا.

المقدمة

تعد الفطريات من أهم الكائنات الحية الدقيقة القادرة على النمو السريع في ظروف هوائية وإنتاج الأنزيمات ومنها غلوكوز أوكسيداز (B-D-glucoseO2-1-oxidoreductase EC 1.1.3.4) الذي يعتبر من أهم الأنزيمات المنتجة من الفطريات (Witteveen et al.,1992) حيث ينتمي إلى مجموعة أنزيمات الأكسدة و الأرجاع Oxidoreductase و يسمى أيضاً aerodehydrogenase آيروديهايدروجيناز (Witteveen et al., 1990) , يتوسط هذا الأنزيم عملية أكسدة B-D- Glucose ($C_6H_{12}O_6$) إلى غلوكونولاكتون ($C_6H_{10}O_6$) و H_2O , ثم يتفكك غلوكونولاكتون تلقائياً أو أنزيمياً إلى حمض غلوكونيك ($C_6H_{12}O_7$) (Leskovac et al., 2005 ; Betancol et al., 2006) , وقد عزل الأنزيم من *Aspergillus niger* و*Penicillium glaucum* لأول مرة من قبل Muller عام 1928 (Muller, 1928) و صناعياً يعد كلاً من *Aspergillus* و *Penicillium* المنتج لغلوكوز أوكسيداز(Bhatti and Saleem, 2009) , علماً أنه ينتج من قبل *P. paxilli, Penicillium notatum, P.chrysosporium, , Botrytis cinerea, P. italicum* , *Aspergillus niger, P.pinophilum, Talaromyces flavus* إضافة إلى أنواع أخرى من *Penicillium* (Lium et al.,1998; Rando et al .,1997; Hafiz etal.,2003).

يملك غلوكوز أوكسيداز بشكليه الخام و النقي تطبيقات تكنولوجية واسعة في مجالات عديدة (Kona et al.,2001) ، حيث يستخدم في تقدير كمية الغلوكوز المتبقي في السائل الناتج عن عمليات التخمير(Sierra et al.,1997;Petruccioli et al.,1999) و في إنتاج حمض الغلوكونيك $C_6H_{12}O_7$ و إزالة الأوكسجين و الغلوكوز في العديد من الأغذية مثل المشروبات الكحولية كالبيرة والنبيذ وعصائر الفواكه والبيض المجفف (Anastassiadi et al., 2003) , كما يستخدم هذا الأنزيم في إزالة الأوكسجين من الفراغ الرأسي للأغذية المعلبة وبالتالي الحد من تغيرات اللون و النكهة و إطالة فترة الصلاحية (Field et al.,1986), ويؤدي نشاط غلوكوز أوكسيداز إلى إنتاج H_2O_2 الذي يلعب دوراً هاماً في تثبيط العديد من الجراثيم الممرضة في الأغذية *Salmonella infantis* , *Listeria monocytogenes* , *Clostridium perfringens* , *Bacillus cereus* , *Staphylococcus aureus,* و *Campylobacter jejune* (Kapata et al.,1998)

كما و يستخدم أيضاً في صناعة الخبز لتقوية الشبكة الغلوتينية وتحسين القوام كبديل عن برومات البوتاسيوم (Enzyme technical association, 2001) ويدخل مع نظام LP-Lactoperoxidase المؤلف من LP , SCN^- , H_2O_2 حيث يعطي الأنزيم H_2O_2 الضروري لهذا النظام , ويستخدم (LP-GOX system) في عمليات نقل و تخزين الحليب

لحمايته من الفساد, وفي منتجات الألبان لإبطال مفعول البكتريا , ويساهم حمض الغلوكونيك الناتج عن نشاط غلوكوز أوكسيداز بشكل مباشر في حموضة الأجبان
(Seifu et al.2005). وإن إضافة GOX قبل عملية تخمير النبيذ يعطي نبيذ منخفض الكحول (Pickering et al. 1998). و يوجد هذا الأنزيم في العسل و يلعب دور مادة حافظة طبيعية عن طريق إرجاع الأوكسجين إلى H_2O_2 الذي يعمل كمضاد ميكروبي.

وفي مجال الصيدلة يستخدم في تقدير مستوى السكر في الدم والكشف عن مرض السكري (Gerristen et al., 2001) و يدخل في تكوين رقائق اختبار تكشف عن وجود الغلوكوز في البول عن طريق التغير اللوني الذي يحصل في الرقاقة عند غمسها في العينة
(Hunt et al., 1956;Adams et al., 1957) وقد استخدم في المخابر بهدف الكشف النوعي عن الغلوكوز بوجود السكاكر الأخرى. ومن التطبيقات الحديثة للأنزيم استخدامه في تصنيع معاجين الأسنان (Petruccioli et al.,1999) وفي المجسات الحيوية (Biosensors) (Malhotra et al., 2005; Sunga and Beab, 2006).

أما من ناحية كشف الكفاءة الإفرازية للإنزيم فتعتمد على إضافة كاشف O-anisidine إلى أوساط زرعية صلبة تحتوي على الغلوكوز كمادة أساسية في الوسط ثم يقارن بين العزلات من خلال مساحة الهالة التي تحدثها العزلات عند استخدام كاشف بيروكسيداز والتي تتناسب طرداً مع قابلية العزلات على إنتاج الأنزيم المذكور
(Witteveen et al.,1990) .لذالك هدف هذا البحث إلى إيجاد مصادر ميكروبية منتجة للأنزيم من عزلات محلية لفطر *Penicillium* من خلال :

١- عزل وتشخيص فطر *Penicillium* من مصادر محلية مختلفة .

٢- دراسة كفاءة العزلات على إنتاج غلوكوز أوكسيداز من خلال إجراء عملية غربلة لها.

مواد البحث وطرائقه

1 - جمع العينات:

جمعت عينات مختلفة من مواد غذائية تشمل كلا" من المربى و العصير و الخبز و البسكويت و التربة و الهواء خلال عامي 2010 - 2009 و عزلت أنواع فطور البنسليوم استنادا" إلى الشكل الظاهري و الفحص المجهري حسب (Samson et al ., 2000) أعطيت العزلات رموزا" مرقمة.

2- المستنبتات الغذائية المستخدمة:

- وسط أغار البطاطا و الدكستروز لتنمية الفطور Potato Dextrose Agar (PDA):

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة 39 غرام من الوسط في لتر من الماء المقطر و بعد ضبط درجة الـ pH على 6.6 وزع الوسط على دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 150 مل لكل دورق .وعقمت الدوارق على درجة 121 °م لمدة 15 دقيقة على ضغط 15 باوند / أنش² ثم بردت الدوارق على درجة حرارة 45 °م و صبت الأوساط في أطباق بتري معقمة وتركت حتى تصلبها.

-وسط تشابيك آغار:

حضر هذا الوسط من 30 غ سكروز ، 1غ $NaNO_3$ ، 1غ $K_2H_2PO_4$ ، 0.5غ KCl ، 0.5غ $MgSO_4.7H2O$ ، 0.01غ $FeSO_4.7H2O$ ، 15غ آغار ، 1000مل ماء مقطر ، وضبط pH النهائي على 6.2 ثم وزع على دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 150 مل لكل دورق .ثم عقمت الدوارق على درجة 121 °م لمدة 15 دقيقة على ضغط 15 باوند / أنش² ثم بردت الدوارق على درجة حرارة 45 °م و صبت الأوساط في أطباق بتري معقمة وتركت حتى تصلبها .

- وسط اختبار الفعالية الأنزيمية:

حضر الوسط وفق طريقة (Witteveen et al.,1990) والذي يتكون من:

(g/L) $NaNO_3$, 6 ; KH_2PO_4 , 1.5 ; KCl , 0.5 ; $MgSO_4.7H2O$, 0.5 ;$FeSO_4.7H_2O$, 0.01 ; O-anisidine , 0.3 ; glucose , 9 ; agar , 15 ;

(µg/L) $Mncl_2.4H_2O$, 5 ; $ZnSO_4.7H_2O$, 35 ; $CuSO_4.5H_2O$, 25

وزع الوسط على دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 150 مل لكل دورق .ثم عقمت الدوارق على درجة 121 °م لمدة 15 دقيقة على ضغط 15 باوند / أنش² ثم بردت الدوارق على درجة حرارة 45 °م و صبت الأوساط في أطباق بتري معقمة وتركت حتى تصلبها.

- وسط اللقاح :

لقحت أطباق بتري الحاوية على الوسط السابق بقطعة آغار بقطر 7 مم مأخوذة من مستعمرة الفطر النامي على الوسط الغذائي PDA و بعمر 3 أيام ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 26 °م لمدة أربعة أيام و بواقع ثلاثة مكررات , و أجريت معاملة المقارنة مع الشاهد

3 - طريقة العزل :

- عزل الفطر من التربة باستخدام طريقة تخفيف محلول التربة حيث وضعت كمية 10 غرامات من التربة المغربلة ضمن دورق مخروطي سعة 250 مل يحوي على 90 مل من الماء المقطر ورجت بشكل متقطع لمدة 30 دقيقة ثم رُشحت محتوياته للحصول على تخفيف1/10. بعد ذلك تجري التخفيفات بأخذ 1 مل من كل تخفيف مع 9 مل من الماء المقطر و المعقم للحصول على التخفيف الأدنى تركيزا" مع مراعاة الرج و التجانس قبل اخذ الحجم المحدد و بهذه الطريقة حضرت التخفيفات ($10X10^{-2}$ ، $10X10^{-3}$و $10X10^{-4}$). أخذ 1 مل من كل تخفيف ووضع في طبق بتري فوق مستنبت PDA الحاوي على المضاد الحيوي ستربتومايسين (1/1000) وحدة لمنع نمو البكتريا ثم حرك الطبق حركة رحوية لضمان توزيع التخفيف على سطح المستنبت و تم تحضير خمسة أطباق بتري لكل تخفيف ووضع كل طبق من الأطباق ضمن كيس بلاستيكي شفاف معقم و أغلق بإحكام لمنع التلوث . وُضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 1±25 °م و ظلام مستمر لمدة أسبوع مع الفحص يوميا" بعد اليوم الثالث .

- عزل الفطر من الهواء عن طريق وضع طبق بتري حاوي على وسط PDA مفتوحا" لمدة 10-20 دقائق وحضن بعد إغلاقه على درجة حرارة 25°م ولمدة خمسة أيام حسب طريقة (Samson et al .., 2000)

- عزل فطر البنسليوم من البسكويت و الفواكه بأخذ جزء من النموات الفطرية الموجودة على العينة وتخطيطها فوق مستنبت PDA في طبق بتري .

- عزل الفطر من المربى و العصير عن طريق إضافة 25غ من المربى أو العصير إلى 1000مل وسط آغار البطاطا و الدكستروز وهو بحالة سائلة في كأس بيشر سعته 1000 مل , وبعد التصلب حضن على درجة حرارة ٢٥ °م لمدة خمسة أيام وهي مدة كافية لنمو الفطر على سطح الوسط حيث نقل بعدها الفطر وخطط فوق مستنبت PDA.

4- تشخيص عزلات الفطر:

صنفت الفطور استنادا" إلى الصفات المورفولوجية مثل لون مستعمرة الفطر وشكل الحوامل الكونيدية وطريقة تفرعه وتماثله أو عدم تماثله (حامل كونيدي أحادي الصف Monoverticillate , ثنائي الصف Biverticillate , عديد الصفوف Polyverticillate) وصفات الأبواغ من حيث الشكل و اللون.

5- الكشف عن إنتاج غلوكوز أوكسيداز:

لقحت أطباق بتري الحاوية على وسط الغربلة بقطر 7 مم مأخوذة من المستعمرات النامية علي بيئة أغار الدكستروز و البطاطا (PDA) وبعمر (3) أيام ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 م° لمدة أربعة أيام وبواقع ثلاثة مكررات لكل عينة وطبقين بدون تلقيح كشاهد , قيس قطر الهالة المتشكلة بعد غمر الأطباق بمحلول مكون من محلول واقي درجة حموضته pH=7 من فوسفات الصوديوم تركيزه (20mM) وغلوكوز تركيزه (0.1 M), و بيروكسيداز بتركيز (20µg/mL) وقيس قطر الهالة المتشكلة حول المستعمرات باستخدام مقياس بيكاليبس الرقمي بالميليمتر(Yu and Zhang , 2004) .

٦- التحليل الإحصائي :

أجري التحليل الإحصائي للبيانات بإيجاد المتوسط الحسابي والانحراف المعياري،

.(Russell,1991)

النتائج و المناقشة

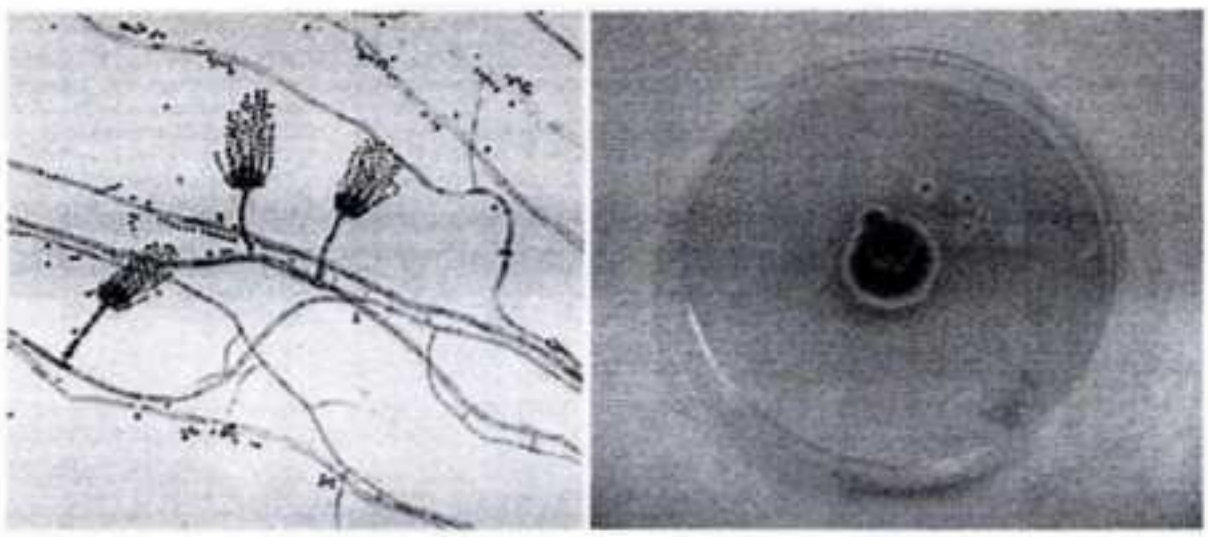
أولاً - تشخيص العزلات الفطرية :

يبين الجدول (١) مصادر العزلات الفطرية و تشخيصها , حيث يلاحظ من الجدول أنه تم عزل 20 عزلة تابعة لجنس *Penicillium* وشخصت مجهرياً باستخدام طريقة التحميل بالنشر باللاكتوفينول لمعرفة الصفات المجهرية للميسليوم و الحوامل الكونيدية و شكل الأبواغ وأبعادها استناداً إلى الصفات الظاهرية للمستعمرة بعد تنميتها على مستنبت تشابيك آغار وتحضينها لمدة سبعة أيام على درجة حرارة 25°م كما هو موضح بالشكل (١) و صنفت العزلات استناداً إلى ماسبق إلى ما يلي :

- *P.citrinum* Thom ويتبع له العزلات Jm3 , Fr1, SS1 حيث كانت المستعمرة مخملية خضراء مزرقة وتحمل الحوامل الكونيدية أذنابا" تنتهي بـــــــ 6-10 فياليدات مخروطية وأبواغها خضراء دائرية الشكل.
- *P.expansum* Link وتتبع له العزلة Be1 والمستعمرة ذات لون أصفر إلى أخضر مزرق والحوامل الكونيدية أسطوانية تحمل 5-8 فياليدات قصيرة العنق والأبواغ خضراء شبه دائرية.
- *P.digitatum* Sacc. وتتبع له العزلات Fr5, Fr4 والمستعمرة شعاعية بلون أصفر إلى بني مخضر و أهم ما يميزها هي أبواغها البيضوية التي تتوضع بشكل سلاسل.
- *P.griseofulvum* Direckx. وتتبع له العزلة Jm2 والمستعمرة رمادية مخضرة و الحامل الكونيدي ثنائي الصف متفرع عشوائيا" يحمل أذنابا" أسطوانية تحمل بنهايتها فياليدات مفلطحة قصيرة و أبواغها خضراء دائرية.
- *P.verrucosum* وتتبع له العزلتان Be2,SS4 وتتميز بمستعمرة خضراء تتجمع عليها قطرات وحامل كونيدي ثنائي الصفوف و أبواغ دائرية .
- *P.italicum* Wahmer وتتبع له العزلتان Fr2, Fr3 و المستعمرة خضراء رمادية تتجمع عليها قطرات والحوامل الكونيدية تحمل 2-4 أذناب وفي نهايتها 3-6 فياليدات اسطوانية ضيقة العنق و الأبواغ اسطوانية إلى بيضوية الشكل .
- *Penicillium paraherquei Abe exG.Smith* وتتبع له العزلتان *Ju1,SS4* والتي تتميز بمستعمرة مخملية بلون أزرق مخضر وبلغ قطرها *2.5-3 cm* بعد تنميتها لمدة سبعة أيام على بيئة تشابيك آغار , والحوامل الكونيدية خشنة تتفرع إلى صف واحد و نادراً إلى صفين وتحمل 4-10 فياليدات دورقية الشكل , و الأبواغ دائرية إلى بيضوية الشكل .

جدول رقم -١- تشخيص العزلات الفطرية و رموزها و مصدر كل عزلة

رقم العزلة	رمز العزلة	مصدر العزلة	التشخيص	كفاءة الإفراز
1	Jm1	مربى تين- منزلي- ريف دمشق	*Penicillium sp.*	-
2	Jm2	مربى مشمش- منزلي - دمشق	*P.griseofulvum*	-
3	Jm3	مربى مشمش - منزلي- دمشق	*P.citrinum*	+
4	Jm4	مربى فريز - منزلي - ريف دمشق	*Penicillium sp.*	+
5	Ju1	عصير مانغو - بامبا - دمشق	*P.paraherquei*	+
6	Ju2	عصير برتقال- منزلي - دمشق	*Penicillium sp.*	-
7	Ju3	عصير برتقال - منزلي - السويداء	*Penicillium sp.*	-
8	Fr1	ثمرة كاكي - ريف دمشق	*P.citrinum*	+
9	Fr2	يوسفي - دمشق	*P.italicum*	-
10	Fr3	برتقالة - دمشق	*P.italicum*	-
11	Fr4	برتقالة - دمشق	*P.digitatum*	-
12	Fr5	بوميلو - دمشق	*Penicillium spp.*	-
13	Be1	بسكويت غلوكوز - دمشق	*P.expansum*	+
14	Be2	خبز - فرن مساكن برزة - دمشق	*P.verrucosum*	-
15	SS1	تربة - كلية الزراعة - دمشق	*P.corylophilum*	-
16	SS2	تربة - كلية الزراعة - دمشق	*Penicillium sp.*	-
17	SS3	تربة - القطيفة - ريف دمشق	*Penicillium sp.*	-
18	SS4	هواء - كلية الزراعة - دمشق	*P.paraherquei*	-
19	SS5	هواء - كلية الزراعة - دمشق	*Penicillium sp.*	-
20	SS6	تربة - مصياف - حماة	*Penicillium sp.*	-
مجموع العينات الكلية				20
عدد العينات الإيجابية				5
النسبة المئوية المفرزة لغلوكوز أوكسيداز				25%



B A

الشكل (١) A- نمو مستعمرة الفطر المعزولة,B- شكل المسيليوم والأبواغ.

اختبار قابلية العزلات الفطرية على إنتاج غلوكوز أوكسيداز على الأوساط الصلبة :

تبين نتيجة فحص كفاءة إفراز غلوكوز أوكسيداز لـ 20 عزلة من فطر *Penicillium* بأن خمسة عزلات فقط تمتلك هذه الكفاءة أي بمعدل 25% من العزلات الكلية, كما هو موضح في الجدول (٢) والشكل (2) حيث أعطت العزلات Jm3, Fr1, Jm4, Be1, Ju1 التابعة لـ *P.citrinum, P.paraherquei,P.expansum and Penicillium sp* كفاءة إفرازية جيدة تراوح قطر الهالة بالميلليمتر , 4.1, 3.5, 4.5, 6.3 4.2 لكل منها على التوالي.حيث اعطى الفطر *P.paraherquei* (Ju1) أدنى كفاءة لإفراز الأنزيم بقطر هالة 3.5 مم , في حين أعطى فطر *P. citrinum* (Jm3) أعلى كفاءة إفرازية بقطر هالة 6.3 مم ,أما *P.citrinum* (Fr1) *P.expansum* (Be1) و *Penicillium sp.*(Jm4), فكانت الكفاءة متوسطة , في حين لم تظهر العزلات المتبقية في الجدول (1) كفاءة لإفراز غلوكوز أوكسيداز. وقد تبين أن مزارع الأحياء الدقيقة و إن انتمت إلى المجموعة نفسها تتباين وراثياً فيما بينها من حيث خصائص نموها و فعاليتها الإستقلابية ولاسيما بين المزارع و العزلات التي تنتمي إلى الجنس و النوع ذاتهما*(P.citrinum)* وهذا يكون نابعاً عن استجابة العزلات للظروف البيئية فالبناء الوراثي بقدر ما يتصف بالثبات فإنه يتميز بالمقابل بمرونة مذهلة في الإستجابة للتغيرات البيئية , أي أن البيئة تؤثر بشكل جذري في التعبير عن الصفات المظهرية للجينات

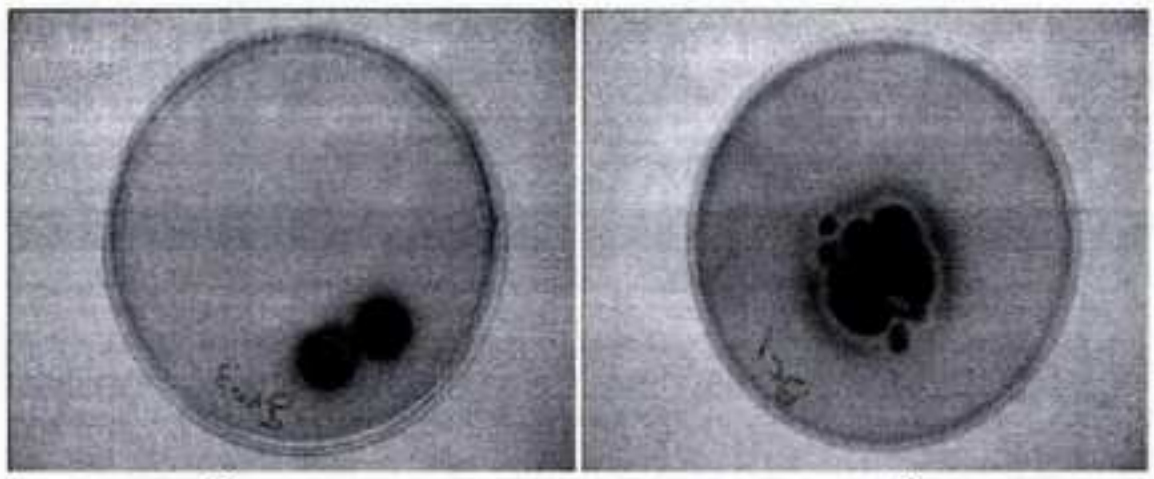
(Elander and Chang , 1979) وقد تطابقت هذه النتائج مع نتائج

(Petruccioli et al.,1993) في دراسته حول غربلة انواع مختلفة من البنسيليوم المفرزة للأنزيم .ويوضح الجدول (2) و المخطط (1) كفاءة العزلات المنتجة لغلوكوز أوكسيداز مقدرة بالميلليمتر اعتمادا" على متوسط قطر الهالة حول المستعمرة

جدول(2) كفاءة العزلات المنتجة لغلوكوز أوكسيداز مقدرة بالميلليمتر اعتمادا" على متوسط قطر الهالة•

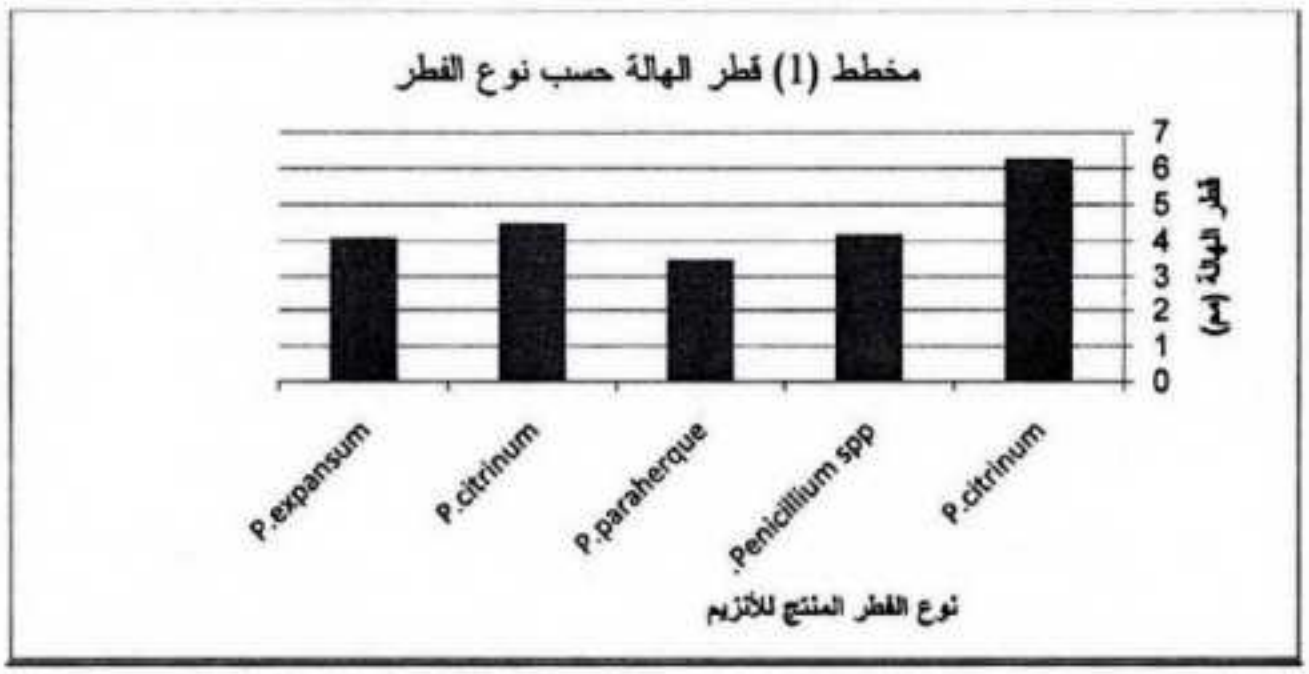
رقم العزلة	مصدرها	التشخيص	متوسط قطر الهالة(مم)
3	مربى مشمش منزلي – دمشق	*P.citrinum*	6.3±0.12
4	مربى فريز منزلي – ريف دمشق	*Penicillium Sp.*	4.2±0.15
5	عصير مانغو – بامبا	*P.paraherquei*	3.5±0.20
8	ثمرة كاكي – ريف دمشق	*P.citrinum*	4.5±0.17
13	بسكويت (غلوكوز)- دمشق	*P.expansum*	4.1±0.18

• القيمة تمثل متوسط ثلاث مكررات



D C

الشكل (٢) الهالات المتشكلة حول المستعمرات الفطرية



الاستنتاجات

١- تواجد فطر جنس *Penicillium* في كافة العينات المدروسة .

٣- صنفت العزلات إلى سبعة أنواع كالتالي :

P.expansum, P. paraherquei, P.digitatum, P.verrucosum, P.griseofulvum, P.italicum و *P.citrinum*.

٤- تميزت أربعة أنواع من الفطور المصنفة سابقاً بكفاءة إنتاج غلوكوز أوكسيداز وهي : (*P.expansum, P. paraherquei, P.citrinum, P.sp*)، و تفوقت العزلة Jm3 (*P.citrinum*) المعزولة من مربى تين منزلي على بقية العزلات الأخرى .

٥- يمكن الاعتماد على طريقة الغربلة بالأطباق الصلبة المذكورة في مواد و طرائق البحث للتمييز بين قدرة عزلات فطر *Penicillium* على إنتاج غلوكوز أوكسيداز .

التوصيات

الاهتمام بإنتاج غلوكوز أوكسيداز من مصادر محلية متنوعة باستخدام المزارع الصلبة وتنقيتها على مستوى تجاري بغية استخدامها في بعض التطبيقات الغذائية والصيدلانية.

المراجع العلمية

- ADAMS E. C.,BURKHART C. E., and FREE A. H.,1957- **Specificity of a glucose oxidasetest for urine glucose**. Science, 125st .ed.,1082-1083.

- ANASTASSIADIS S., AIVASIDIS A., WANDREY C., 2003- **Continuos gluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of *Aureobasidium pullulans***. Microbial Biotechnol,61st.ed,.110-117.

- BETANCOL L., LOPEZ F., HIDALGO A., ALONSO N., DELLAMORA G., GUISAN J.M., FERNANDEZ R., 2006- **Preparation of a very stable immobilized biocatalyst of glucose oxidase from *Aspergillus niger***. *J. Biotechnol*,**121**:284–289

- BHATTI H.N and SALEEM N., 2009- **Characterization of glucose oxidase from *Penicillium notatum*** .Food Technol. Biotechnol . **47(3)** 331-335.

- ELANDER R.P and CHANG L.T.,1979-**Microbial Culture Selection.** In Microbial Technology.Vol.**2**, New York.

- **Enzyme Technical Association** ., 2001- Enzymes A Primer on use and benefits today and tomorrow.

- FIELD C E, PIVARNIK L F, BARNETT, L S M, and RANDA Jr A G.,1986- **Utilizing of glucose oxidase for extending the shelf-life of fish**.*J. Food Sci*. ***51***:66–70.

- GERRISTEN M, KROS A, LUTTERMAN J A, NOLTE R J M, JANSEN J A., 2001-**A percutaneous device as model to study the in vivo performance of implantable amperometric glucose sensors**. J. Mater. Sci. **12(2)** 129-134.

- HAFIZ M, HAMID M, KHALIL–UR–REHMAN, ANJUM ZIA and ASGHER M., 2003- **Optimization of Various Parameters for the Production of Glucose Oxidase from Rice Polishing Using *Aspergillus niger*.***Biotechnology*, 2nd.ed, 1–7.

- HUNT J A, GRAY C H, and THOROGOOD E., 1956- **Enzyme tests for the detection of glucose.** Brit. Med. J., **4**, 586-588

- KAPATA A, PARK J K H, HONG S Y and CHO H K.,1998- **Effect of agitation and aeration on the extracellular glucose oxidase from a recombinant *Saccaromycess cervisiae*.** Bioprocess Eng, **18**: 347-351.

- KONA R P, QURESHI N and PAI J S., 2001- **Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor**. *Bioresource Technol.*,**78**: 123–2

- LESKOVAC V, TRIVIC S, WHOLFAHRT G, KANDRAC J and PERICINA D., 2005- **Glucose oxidase from *Aspergillus niger:* The mechanism of action whith molecular oxygen, quinons and one electron acceptors**. Int. J. Bichem. Cell Biol., **371**: 731-750.

- LIUM S, OELEJEKLAUS S, GERHARDH B and TUDZYNKI B., 1998- **Purification and characterization of glucose oxidase of *Botyits cinerea.*** *J. Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **53**: 123–32

- MALHOTRA B D,SINGHAL R,CHOUBEY A,SHARMA S K and KUMAR A., 2005-**Recent trends in biosensors**. Curr. Appl. Phys,**5**:92-97.

- MULLER D ., 1928- **Oxidation von Glukose mit Extrakten aus *Aspegillus niger.*** Biochem Z **199**:136–170

- PETRUCCIOLI M ,CECCARELLI M and FEDERICI F ., 1993- **Screening of *Penicillium species* for the production of extracellular glucose oxidase.** World J. Microbiol. Biotechnol,**9**: 77-79.

- PETRUCCIOLI M, FEDERICI F , BUCKE C, and KESHAVARZ T., 1999- **Enhancement of glucose oxidase production by *Penicillium variabile P16.*** Enzyme Microb.Technol, **24**:397-401.

- PICKERING G J, HEATHERBELL D A, BARNES M F., 1998- **Optimising glucoseconversion in the production of reduced alcohol wine using glucose oxidase**. Food Res Int **31**:685–692

- RANDO D, KOHRING G.W, and GIFFHORN F., 1997- **Production, Purification and characterization of glucose oxidase from newly isolated strain of *Penicillium pinophilum***. Appl. Microbial. Biotechnol. **48:** 34-40

- RUSSELL F., 1991-**MASTATC director crop and soil Sciences department**(version 2.10) Michigan State Uni. USA

- SAMSON R,HOEKSTRA E,FRISVAD J,FILTENBORG., 2000-**Introduction to food born fungi** .5th ed , Bearn Netherlands :Centraabreau voor Schimmel cultures.

- SEIFU E, BUYS E M, DONKIN E F ., 2005- **Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications,**a review,Trends Food Sci Tech **16**:137–154

- SIERRA J.F, GALBAN J and CASTILLO J.R., 1997- **Determination of glucose in blood based on the intrinsic fuorescence of glucose oxidase**. Anal. Chem., **69**: 1471-1476.

- SUNGA W.J, BAEB Y.H., 2006- **Glucose oxidase, lactate oxidase, and galactose oxidase enzyme electrode based on polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme conjugate dopant**. Sensors and Actuators B ;**114**:164–169.

- WITTEEVEEN C F B, VEENHUIS, M. and VISSER, J., 1992- **Loccalization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger.*** Applied Environ. Microbial., **58**: 1190-1194.

- WITTEVEEN C F B, VONDERVOORT P Van de, SWART K. and VISSER J., 1990- **Glucose oxidase overproducing and negative mutants of *Aspergillus nidulans***. Appl. Environ. Microbial., **33**:683-86

- YU Z. and ZHANG H., 2004- **Ethanol fermentation of acid hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*** Bioresource Technology., **93**: 199-204.

Isolation and diagnose of Fungi *Penicillium sp.* from various local sources and the estimation of its ability to produce Glucose oxidase enzyme

(1) Issa,Samar (2) AlhajAli, Anwar (3) Yazaji, Sabah

ABSTRACT

20 samples were isolated from *Penicillium* fungi from various local sources (air , soil , juices , jams...) and then samples were classified morphologically and microscopic criteria using lactophinol dye method. samples were screened to determine the ability to produce Glucose oxidase enzymes using a reference method after they were cultured for four days on a synthetic medium containing O-anisidine .The activity of Glucose oxidase were measured using diameter (mm) of enzyme diffusion zones around the colonies after staining with Peroxidase enzyme . The study proved that isolates Jm3 , Jm4 , Fr1,Be1, Ju1, of the top level of effectiveness were compared to other samples. The Jm3 isolate was the highest level with the average zone of 6.3±0.12 and the classification of this isolate reveals that it was *Penicillium citrinum* which illustrates the importance of these isolates in the production of Glucose oxidase for further use in food and Pharmacology sectors.

Keywords:

Penicillium sp., Glucose oxidase enzyme ,O-anisidine.

(1)Ms student, (2,3) Assistant Prof., Faculty of Agriculture, Food Science Department P. O. Box 30621.Damascus University. Syria.