Optimizing condition for production of protease and chitinase from Beauveriabassiana

تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطرBeauveriabassiana

أ. م. د. علي عبد الكاظم الغانمي
جامعة كربلاء - كلية العلوم – قسم علوم الحياة

* سرور محمد علي العبادي
جامعة كربلاء - كلية العلوم – قسم علوم الحياة

*البحث مستل من رسالة طالبة الماجستير سرور محمد

الخلاصة

درس تأثير الظروف المثلى في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر ***B. bassiana*** . وأظهرت النتائج إن أفضل الظروف البيئية والمزرعية للحصول على أعلى حصيلة من الإنزيمين أعلاه وكانت بإستخدام وسط مكوّن من خميرة الخبز بنسبة 1.5 % المدعم بـ 0.3% من كبريتات الأمونيوم وبرقم هيدروجيني ابتدائي 6.5 وحجم لقاح مقداره 16% والحضن في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 30 مْ بسرعة رج 150 دورة / دقيقة ولمدة 72 ساعة .

Abstract

Effect of environmental and cultural conditions in the production of the Protease and Chitinase enzymes from ***B. bassiana*** were studied . Results showed that the highest production of these enzymes were obtained by using medium composed of baker's yeast at concentration 1.5 % supplemented with 0.3 % $(NH_4)_2\ SO_4$, at initial pH 6.5 with an inoculum size 16 % , and incubated at 30 ˚C on a rotary shaker at 150 rpm for 72 h.

المقدمة (Introduction)

إن ظهور العديد من المشاكل البيئية والصحية للإنسان في العقود الأخيرة جراء الإستخدام المفرط للمبيدات الكيميائية أعطى دافعاً قوياً لتطوير عوامل السيطرة الحيوية المايكروبية (Microbial Biocontrol Agents , MBCAs) لإستخدامها في مجال السيطرة المتكاملة (Integrated control) على الحشرات الضارة .

وتمثل الفطريات الممرضة للحشرات (Entomopathogenic Fungi, EPF) المجموعة الأكثر أهمية من بين الـ MBCAs نظراً لسهولة إطلاقها إلى الطبيعة وتوفرعدد كبير من السلالات الممرضة منها وإمكانية تطويعها وراثياً من خلال زيادة تعبير البروتينات الداخلية (Endogenous proteins) أو السموم الخارجية (Exogenous toxins) [1] .

تمتلك الفطريات الممرضة للحشرات آليات متنوعة لتحطيم كيوتكل الحشرات لعل في مقدمتها إمكانية إفرازها للعديد من الإنزيمات المحللة للكيوتكل مثل إنزيمات البروتييز(Proteases) والكايتينيز(Chitinases) واللايبيز(Lipases)[2], التي لها القابلية على تحليل البروتين والكايتين والدهن المكونة للكيوتكل على التوالي , فضلاً عن إنتاجها للعديد من مواد الأيض الثانوي ذات التاثير السمي على الحشرات .

تصنف أنزيمات البروتييز(EC 3.4.21-24)والكايتينيز(EC 3.2.1.30)ضمن انزيمات التحلل المائي (Hydrolases) وتؤلف مجموعة كبيرة من الإنزيمات حيث يقوم إنزيم البروتييز بتحليل البروتينات إلى ببتيدات صغيرة وأحماض أمينية . في حين يعمل إنزيم الكايتينيز على تحليل الآصرة الكلايكوسيدية (β 1-4) التي تربط وحدات الكايتين . وتختلف هذه الإنزيمات فيما بينها في العديد من الخصائص خاصة فيما يتعلق بتخصصية مادة التفاعل (Substrate specificity) والموقع الفعال وآلية الحفز الإنزيمي ودرجتي الحرارة والرقمين الهيدروجينيين للفعالية والثبات [3,4].

و نظراً لأهمية النظام الإنزيمي المنتج من الفطر *B.bassiana*في إحداث الإصابة بالحشرات لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر ***B. bassiana*** .

المواد وطرائق العمل

العزلة الفطرية المستخدمة في الدراسة :

تم الحصول على عزلة من الفطر *Beauveriabassiana* من جامعة بابل/ كلية العلوم للبنات, وأستخدمت هذه العزلة في إنتاج وتنقية وتوصيف إنزيم البروتييز. نشطت العزلة الفطرية على طبق بتري يحتوي على أگار ديكستروز البطاطا (PDA) بدرجة حرارة (28) مْ ولمدة(7-10) أيام

تحضير اللقاح « البذرة » :

تم تحضير وسط اللقاح « البذرة , Seed culture »حسب الطريقة الموصوفة من قبل(Dhar&(2010Kaur[5]مع بعض التحوير, لقح هذا الوسط بقرص واحد من عزلة الفطر*B.bassiana*(يحتوي القرص الواحد على2×10^{7} سبور/ مل) وحضن الوسط في الحاضنة الهزازة بسرعة رج 150 دورة/ دقيقة وعلى درجة حرارة 30 مْ لمدة 72 ساعة .

تحضير وسط الإنتاج:

أستخدم وسط الإنتاج الموصوف من قبل(De La Cruz *et al.* (1995والمحور من قبلحيدر, (2011)[7]في التحري عن إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر*B. bassiana* . إذ تم تحضير الوسط الأنتاجي على النحو الآتي :أستخدمت خميرة الخبز (Baker's Yeast) بنسبة 1 % كمصدر كاربوني وحيد للوسط و أضيف إليها 0.1 % (وزن / حجم) من كل من كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و بعد إتمام عملية الإذابة لهذه المواد عُدِّل الرقم الهيدروجيني إلى 6.5 أعقبه عملية غليان للوسط لمدة ثلاث دقائق و من ثم ترشيحه بوساطة أوراق ترشيح ، وزع بعدها الوسط في دوارق زجاجية سعة 250 مليلتر بواقع 50 مليلتر / دورق وعقم بجهاز الموصدة على درجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة ، وبعد إنتهاء عملية التعقيم أخرجت الدوارق و بردت إلى درجة حرارة الغرفة لتهيئتها لعملية التلقيح .

تقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين

تقدير فعالية إنزيم البروتييز :

تم تقدير فعالية إنزيم البروتييز المنتج من الفطر*B. bassiana* تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل (2010)Sirisha*et al.*[7] مع بعض التحوير , وذلك بمزج 0.2 مل من المستخلص الإنزيمي مع 2 مل من محلول مادة التفاعل (والتي حضرت بمزج حجم واحد من محلول الكازائين بتركيز 2 % مع حجمين من الماء المقطر مع حجم واحد من محلول منظم الترس تركيز 1مولر ورقم هيدروجيني 8.5) في أنابيب إختبار وحضن المزيج في حمام مائي بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 20 دقيقة , أوقف التفاعل بإضافة 3 مل من محلول10 Trichloroacetic acid (TCA) %لكلأنبوبة,بعدها تمت قراءة الأمتصاصية على 280نانوميتر بإستخدام جهاز المطياف الضوئي .

وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتييز بأنها (كمية الإنزيم التي تسبب زيادة في الامتصاصية مقدارها 0.001 على طول موجي 280 نانوميتر وتحت ظروف التقدير) .

تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز :

تم تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز من الفطر*B.bassiana* تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل(Park *et al.* (2000[9]مع بعض التحويربالاعتماد على كمية البارانيتروفينول (p-Nitrophenol, pNP) المتحررة من تحلل مادة (p-Nitrophenyl N-acetyl β-D-glucosaminide , pNP-GlcNAc), وذلك بمزج 0.2 مل من المستخلص الإنزيمي مع 0.2 مل من محلول مادة التفاعل pNP-GlcNAc بتركيز 4 ملي مولر مع 0.6 مل محلول منظم الخلات بتركيز 0.1 مولر ورقم هيدروجيني 5.0 في أنابيب إختبار وحضن المزيج في حمام مائي بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 30 دقيقة , أوقف التفاعل بإضافة 1 مل من محلول كاربونات الصوديوم بتركيز 1مولرلكلأنبوبة,بعدها تمت قراءة الأمتصاصية على 420نانوميتر بإستخدام جهاز المطياف الضوئي .

وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكايتينيز بأنها (كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من مادة pNP في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التقدير) .

تقدير البروتين :

تم تقدير البروتين حسب طريقة [10](Bradford ,1976)بإستخدام البومين المصل البقري (BSA) كبروتين قياسي . وأستخدمت الفعالية النوعية كمقياس لتحديد أفضل إنتاج من الإنزيمين في مراحل الدراسة كلها .

تحديد الظروف البيئية والمزرعية المثلى لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر*Beauveriabassiana*:

تم دراسة عدد من العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B.bassiana*حيث لقحوسط الإنتاج بحجم لقاح مقدارها 2%من حجم الوسط وتم الحضن بالحاضنة الهزازة بسرعة رج 150 دورة / دقيقة و بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 72 ساعة ، وبعد إنتهاء مدة الحضن تم ترشيح الوسط لفصل الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الفطرية الذي أستخدم في تقدير فعالية إنزيمي البروتييز والكايتينيز فضلاً عن تقدير البروتين لحساب الفعالية النوعية . وتضمنت العوامل المدروسة :-

1- تأثير تركيز المصدر الكاربوني :-

استخدمت خميرة الخبز كمصدر كاربوني لوسط الإنتاج إذ أضيفت بتراكيز متدرجة (0.5 و 1 و 1.5 و 2)% إلى وسط إنتاج الإنزيمين .

2- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه :-

أستخدمت أربعة مصادر نيتروجينية هي(الجيلاتين واليوريا و كلوريدالأمونيوم و كبريتات الأمونيوم) حيث أضيفت الى الوسط الإنتاجي بنسبة 0.3 % وتركت إحدى المعاملات بدون إضافة مصدر نيتروجيني لغرض المقارنة . كما درس تأثير تراكيز متدرجة من كبريتات الأمونيوم (0.1 و 0.3 و 0.5 و0.7و1)% في إنتاج الإنزيمين .

3- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي :-
عُدِّل الرقم الهيدروجيني لوسط إنتاج الإنزيمين إلى (6.0 و 6.5 و 7.0 و 7.5 و 8.0) .

4- تأثير مدة الحضن :-
تم حضن النماذج في الحاضنة الهزازة لمدة 120 ساعة وتمت متابعة إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز وذلك بسحب مكررين كل 24 ساعة لتقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين و قياس الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج .

5- تأثير درجة حرارة الحضن :-
درس تأثير درجة الحرارة بحضن وسط الإنتاج الملقح بالفطر على درجات حرارة (25 و 30 و 35) مْ .

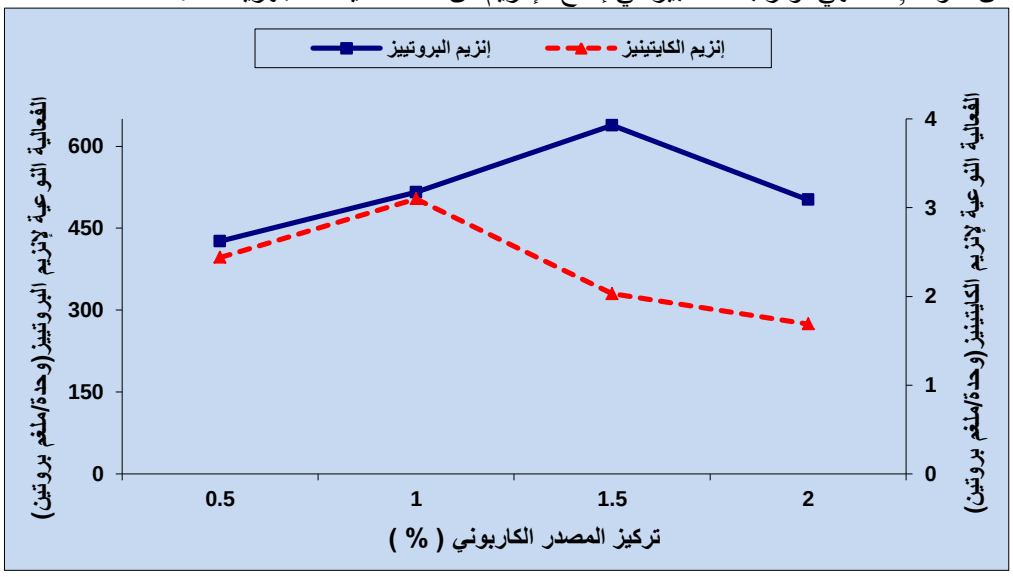
6- تأثير حجم اللقاح :-
لقح وسط الإنتاج بحجوم لقاح مقدارها (4و 8 و 12 و 16 و20)% من لقاح الفطر *B. Bassiana* وذلك لتحديد حجم اللقاح الأمثل لإنتاج الإنزيمين .

7- تأثير سرعة الرج :
حضن وسط إنتاج الإنزيمين و الملقح بالفطر *B.bassiana* في حاضنة هزازة بأستخدام سرع رج مختلفة هي (50 و 100 و 150 و200) دورة / دقيقة .

النتائج والمناقشة

تحديد الظروف البيئية والمزرعية المثلى لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B.bassiana*:

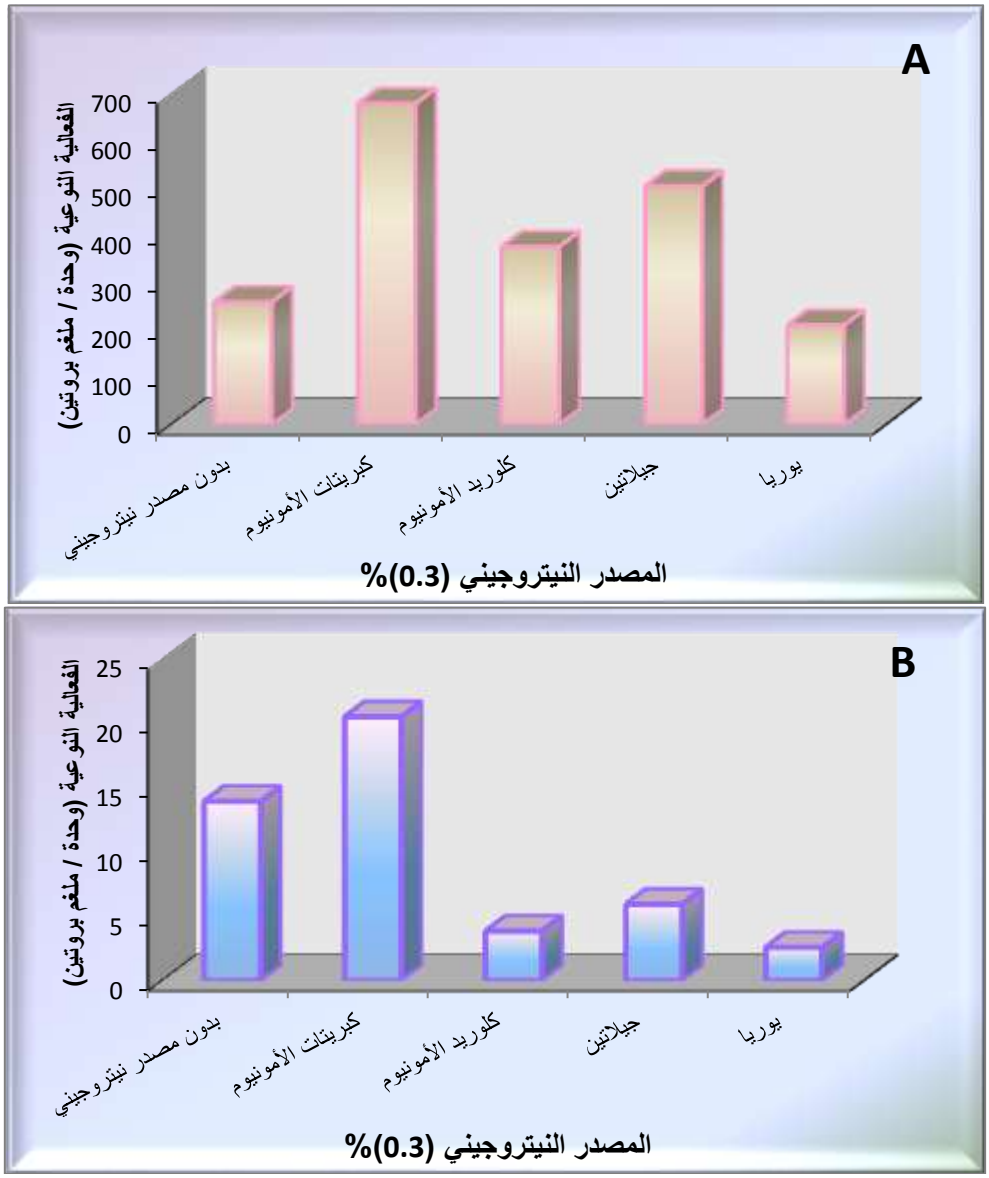
1-تأثير تركيز المصدر الكاربوني :-
أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (1) أن أفضل تركيز لخميرة الخبز لإنتاج إنزيم البروتييز هو 1.5% إذ بلغت الفعالية النوعية 638.2 وحدة /ملغم بروتين , بينما كان التركيز 1 % من خميرة الخبز قد أعطى أعلى فعالية نوعية لإنزيم الكايتينيز والتي بلغت 3.1 وحدة / ملغم بروتين . وفي ضوء هذه النتائج تم استخدام خميرة الخبز بتركيز 1.5 % لإنتاج كلا الإنزيمين في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها. إن توفر مصدر كاربون في الوسط ضروري لتحرير الطاقة التي تحتاجها الأحياء المجهرية للنمو وإن قلة تجهيزها بالوسط يقلل من نموها , لذا فهي تؤثر بشكل كبير في إنتاج الإنزيم من تلك الأحياء المجهرية[11] .



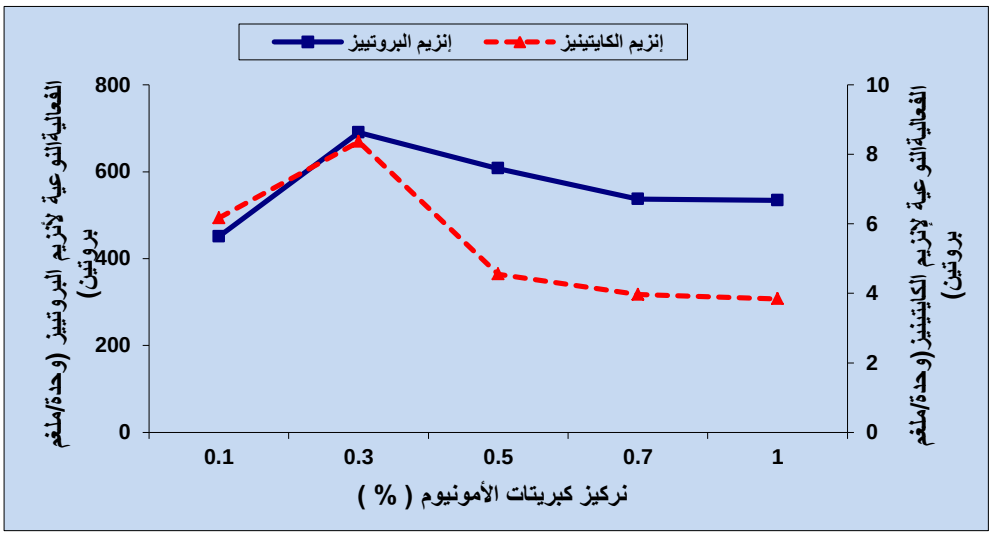
الشكل (1) : تأثير تركيز المصدر الكاربوني في إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز

2- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه :-
أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (2) أن كبريتاتالأمونيوم هي المصدر النيتروجيني الأكفأ في إنتاج الإنزيمين مقارنة بباقي المصادر النيتروجينية المستخدمة (الجيلاتين و اليوريا و كلوريد الأمونيوم), إذ بلغت الفعالية النوعية حدها الأقصى لإنزيمي البروتييز والكايتينيز (676.47و20.43) وحدة /ملغم بروتين , على التوالي . في حين ظهرت أوطأ فعالية نوعية للإنزيمين بوجودالليوريا حيث بلغت قيمتها (208.85 و2.55) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز , على التوالي أيضاً.وإستناداً لهذه النتائج تم إختيار كبريتاتالأمونيوم مصدراً نيتروجينياً لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز وأستخدم في مراحل الدراسة اللاحقة كافة .كما درست تراكيز مختلفة من كبريتات الأمونيوم لتحديد التركيز الأمثل منها لإنتاج الإنزيمين ,وقد سجلت أعلى فعالية نوعية لكلا الإنزيمين عند إستخدام كبريتات الأمونيوم بتركيز 0.3 % وكما موضح في الشكل 3 , إذ بلغت الفعالية النوعية (609.19 و8.37) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز, على التوالي. وإعتماداً على النتائج أعلاه يتضح أن كبريتات الأمونيوم بتركيز 0.3% كان فعالاً في إنتاج الإنزيمين وأستخدم في جميع التجارب اللاحقة . إن مصدر النيتروجين المستخدم في وسط الإنتاج هو أحد العوامل الرئيسة المؤثرة في إنتاج الإنزيمات[12] والذي له دور تنظيمي في تصنيع الإنزيم , إذ يتأيض هذا المصدر ليعطي أحماض أمينية تعد ضرورية لإنتاج الإنزيمات [13] . ومما تجدر الإشارة إليه أن الأعفان تستطيع إنتاج هذه الأحماض الأمينية من مصادر نيتروجينية غير عضوية[14] .

لقد إستخدمت كبريتات الأمونيوم كمصدر نيتروجيني لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر*T. reesei* QM 9414[15]. بينما كان لها تأثيراً سلبياً في إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر*Alternariaalternata*[16] .



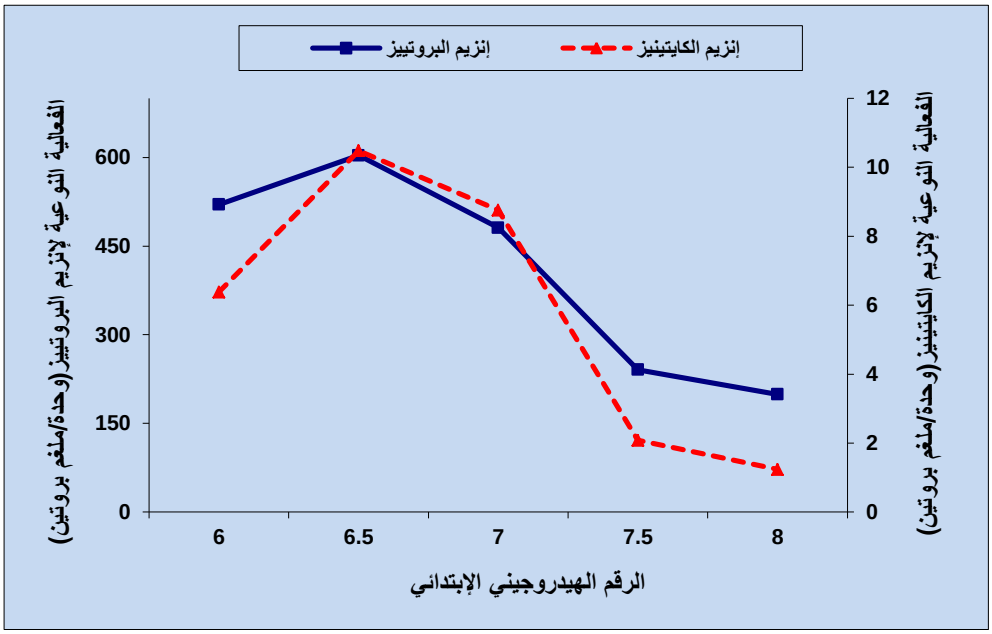
الشكل (2) : تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج إنزيمي : البروتييز(A) و الكايتينيز(B) من الفطر*B.bassiana*



الشكل (3) : تأثير تركيز كبريتات الامونيوم في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر*B. bassiana*

3- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي :-

يوضح الشكل (4) أن أعلى إنتاج ولكلا الإنزيمين تحقق عند الرقم الهيدروجيني 6.5 حيث بلغت الفعالية النوعية لإنزيمي البروتييز والكايتينيز (603.3 و10.48) وحدة / ملغم بروتين , على التوالي . كما يلاحظ بأن الفعالية النوعية أخذت بالإنخفاض تدريجياً حتى وصلت أوطأ قيمة لها عند الرقم الهيدروجيني 8.0 إذ بلغت (199.2 و1.23) وحدة / ملغم بروتينلإنزيمي البروتييز والكايتينيز, على التوالي . وقد كان الرقم الهيدروجيني 6.0 هو الأمثل لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *T. reesei* QM 9414[15] وإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطريات *M.anisoplea* و *B.bassiana*[17].إنإنتاج الإنزيمات بوساطة الأحياء المجهرية يعتمد بشكل كبير على الرقم الهيدروجيني الإبتدائي للوسط الزرعي لكونه يؤثر على العديد من العمليات الإنزيمية ونقل مركبات مختلفة عبر الغشاء الخلوي والذي بالمقابل يدعم نمو الخلية وإنتاج الإنزيم[18] .

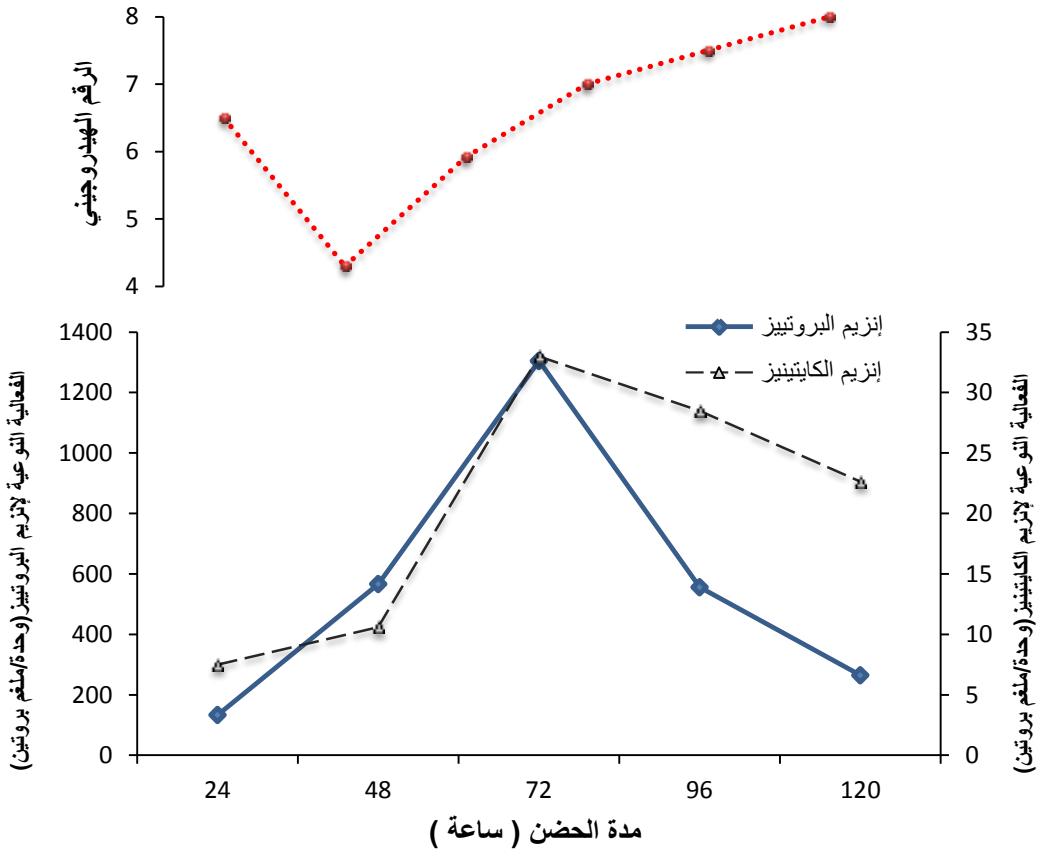


الشكل (4) : تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. Bassiana*

4- تأثير مدة الحضن :-

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (5) أن إنتاج الإنزيمين يبدأ بعد 24 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 133.3 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم البروتييز و 7.5 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز ليصل إلى أقصاه بعد 72 ساعة من التخمر بفعالية نوعية (1304.34و33) وحدة /ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز, على التوالي . وتتفق هذه النتيجة مع ما أشار إليه Campos *et al.* (2005)[19] إذ بلغ أقصى إنتاج لإنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B.bassiana* و *B.amorpha* بعد ثلاثة أيام من التخمر . بعد مدة الحضن المثالية يبدأ إنتاج الإنزيمين بالانخفاض تدريجياً حتى تصل الفعالية النوعية في اليوم الخامس إلى (265.15 و22.64) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز, على التوالي . إن إنخفاض إنتاج الإنزيمين في مدة الحضن الطويلة يعزى إلى انخفاض مستوى المواد الغذائية في الوسط وإنتاج مواد الأيض السامة [20] أو بسبب التحلل الذاتي للإنزيم بفعل الإنزيمات المحللة للبروتين الأخرى [21] .

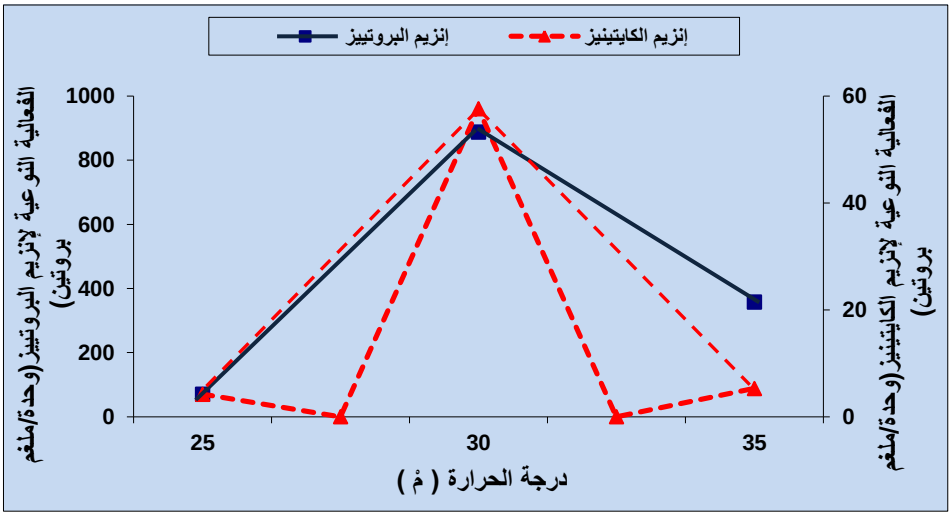
ويلاحظ من الشكل (5) أيضاً إنخفاض الرقم الهيدروجيني عن الرقم الهيدروجيني الأبتدائي 6.5لوسط التخمر إلى 4.3 بعد 24 ساعة من التخمر ثم إزدادت قيمته تدريجياً ليصل إلى 7.0 بعد 72ساعة حيث يصل إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز إلى أقصاه , و بلغت أعلى قيمة للرقم الهيدروجيني في اليوم الخامس 7.9 . إن إنخفاض قيمة هذا الرقم ربما يعزى إلى تراكم نواتج الأيض الثانوي الحامضية في الوسط مثل حامض الأوكزاليك (Oxalic acid)[22] .



الشكل (5) : تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر
B. bassiana

5- تأثير درجة الحرارة الحضن :-

يظهر من الشكل (6) أن أعلى إنتاج من الإنزيمين تحقق بإستخدام درجة حرارة 30 مْ حيث بلغت الفعالية النوعية (887.66 و57.64) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز , على التوالي . إن هذه النتيجة تؤيد ما ورد في العديد من الدراسات فقد كانت تلك الدرجة هي المثلى لإنتاج كلا الإنزيمين من الفطر*Isariafumosorose*[23]. وبالرجوع إلى الشكل 8 يلاحظ إنخفاض الفعالية النوعية للإنزيمين بإزدياد درجة الحرارة إلى 35مْ ويمكن تفسير ذلك بأن الحرارة العالية لها تأثير عكسي على العمليات الأيضية للأحياء المجهرية المنتجة للإنزيمات المحللة للبروتين مسببة تثبيط نمو الفطر وبالتالي إنتاج الإنزيم [24].



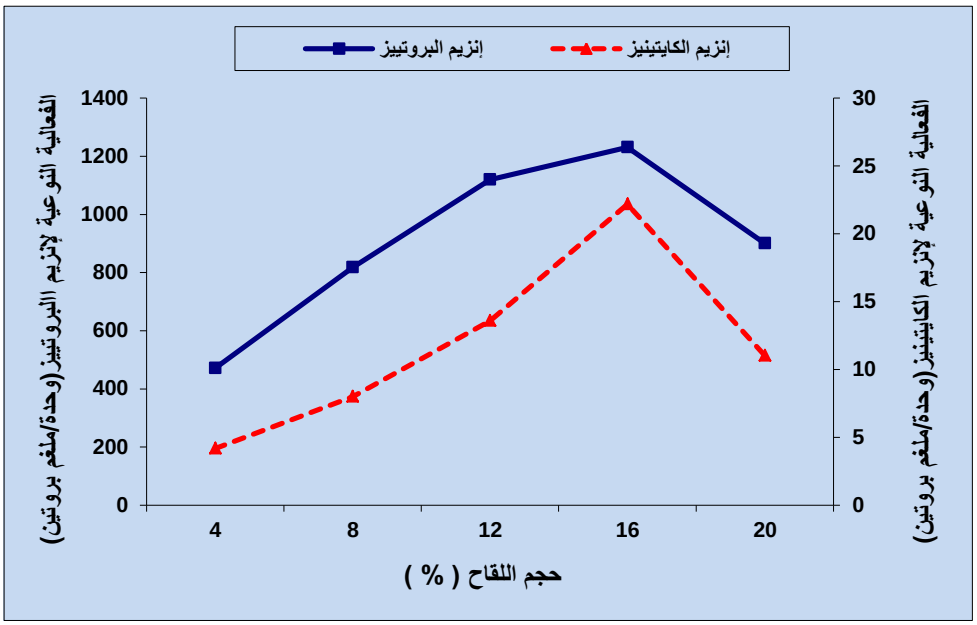
الشكل (6) : تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *B. bassiana*

6- تأثير حجم اللقاح :-

لوحظ زيادة تدريجية في إنتاج الإنزيمين مع زيادة أعداد الخلايا في كمية اللقاح المضافة إلى الوسط الزرعي حتى بلغت الفعالية النوعية أقصاها (1230.3 و22.2)وحدة / ملغم بروتين عند إضافة حجم لقاح مقداره 16% لإنزيمي البروتييز والكايتينيز , على

التوالي . إلا أنها إنخفضت بعد ذلك لتصل إلى (900.9 و11.04) وحدة /ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز , على التوالي أيضاً عند إستخدام حجم لقاح 20 % وكما موضح في الشكل (7) .

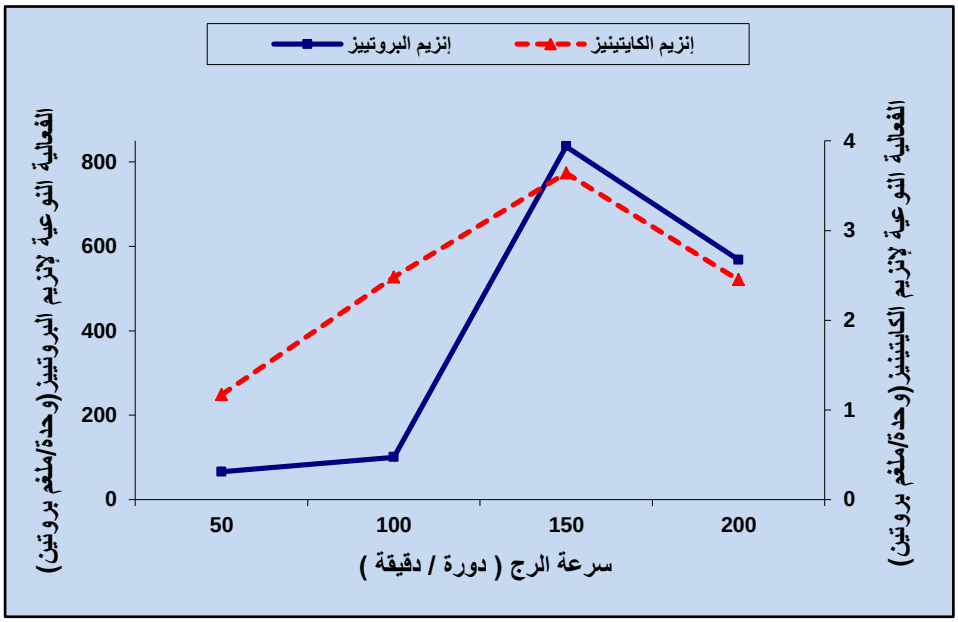
إن حجم اللقاح العالي ليس بالضرورة أن يعطي حصيلة عالية من الإنزيم وإنما ينتج عنه فقدان الأوكسجين ونفاذ المواد الغذائية من الوسط الزرعي [25] كذلك فأن النمو السريع للمزرعة وتكتل الخلايا ممكن أن يؤدي إلى إنخفاض نسبة السكر والأوكسجين المستهلكين وبالتالي إنخفاض إنتاج الإنزيم [20]. لم تتفق هذه النتيجة مع ما ذكر في دراسات سابقة فقد كان حجم اللقاحالأمثللإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Beauveria* sp. هو 10% [26].في حين كان حجم اللقاح الأمثل لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *B. bassiana* هو 1 % [27] .



الشكل (7) : تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana*

7- تأثير سرعة الرج :

يوضح الشكل (8) أن أعلى فعالية نوعية لإنزيمي البروتييز والكايتينيز والتي بلغت (836.84 و3.64) وحدة /ملغم بروتين , على التوالي كانت عند سرعة رج 150 دورة /دقيقة, حيث تزداد تهوية الوسط الزرعي عند هذه السرعة والتي تكفي لتجهيز الأوكسجين الذائب والمواد الغذائية في الوسط مما ينتج عنه زيادة الإنتاجية [28]. وتتفق النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة مع ما ورد في دراسات سابقة عدة إذ أستخدمت سرعة الرج 150 دورة / دقيقة لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز الداخلي (Endochitinase) من الفطر *B. bassiana* و *B. amorpha* [19],بينما أستخدمت سرعة الرج 180 دورة / دقيقة لإنتاجإنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *Trichodermaasperellum* [29] .



الشكل (8) : تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana*

وإستناداً للنتائج أعلاه فقد أستخدم وسط مكوّن من خميرة الخبز بنسبة1.5 % المدعم بـ 0.3% من كبريتات الأمونيوم برقم هيدروجيني ابتدائي 6.5 وحجم لقاح مقداره 16% والحضن في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 30 مْ بسرعة رج 150 دورة / دقيقة ولمدة 72 ساعةلإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر*B. bassiana*.

References

1. **Khan**,S. ; Guo,L. ; Maimaiti,Y. ; Mijit,M. &Qiu,D. (2012). Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent . Molecular Plant Breeding . Vol.3. No.7 .
2. **Inglis**,D.G. ; Goettel,M.S. ; Butt,T.M. &Strasser,H. (2001). Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pest.In: Butt,T.M. ; Jackson,C.W. &Magan,N.(eds):Fungi as Biocontrol Agents-Progress Problems and Potential. CAB International, Wallingford. UK. pp. 23-69 . (Cited from Dhar&Kour , 2010).
3. **Nirmal**,N.; Shankar,S. &Laxman,R. (2011). Fungal proteases :An Overview. Int. J. Biotech &Biosci. Vol. 1(1): pp.1-40 .
4. **Hartl**,L. ; Zach,S. &Siedl-Seiboth,V.(2012).Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. ApplMicrobiol Biotechnol.93:533-543.
5. **Dhar**,P. &Kaur,G. (2010). Production of cuticle-degrading proteases by *Beauveriabassiana*and their induction in different Media.African Journal of Biochemistry Research.Vol.4(3). pp.65-72.
6. **De La Cruz**, J. ; Pintor-Toro, J. ; Benitez, T. ; Llobell, A. and Romero, L. (1995) . A Novel Endo-β-1,3-Glucanase, BGN13.1, Involved in the Mycoparasitism of *Trichodermaharzianum* .Journal of Bacteriology , 177(23): 6937-6945 .
7. **حيدر**,حوراء عباس .(2011). إنتاج وتوصيف إنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز من الفطر*Trichoderma fertile*6 . المعزول محلياً . رسالة ماجستير/ كلية العلوم / جامعة كربلاء .
8. **Sirisha**,S. ; Gurvinder, K .S. &Padmini,P.P.C. (2010). Strain improvement of entomopathogenig fungal species *Beauveriabassiana* and *Metarhiziumanisopliae*by Protoplast Fusion. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology.Vol.1: Issue-3.
9. **Park**,S.H. ; Lee,J.-H. &Lee,H.K. (2000) . Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio* sp.98CJ11027. The Journal of Microbiology. 38(4) : 224-229.
10. **Bradford**, M. M. (1976) . A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding . Analytical Biochemistry , 72: 248-254 .
11. **Haq,** I.-U. ; Mukhtar, H. & Umber, H. (2008). Fermentation Medium Optimization For The Biosynthesis of Protease by *Penicilliumchrysogenum* in shake flasks. Pakistan J. Zool. Vol. 40. (2): pp. 69-73.
12. **Abd-Aziz**, S. ; Sin, T. L.; Alitheen, N.; Shahab, N. &Kamaruddin, K.(2008).Microbial Degradation of Chitin Materials by *Trichodermavirens* UKM1 . Journal of Biological Sciences . 8(1): 52-59 .
13. **Saurabh**,S.; Jasmine, I.; Pritesh, G. & Kumar, R.S. (2007). Enhanced productivity of serine alkaline protease by *Bacillus* sp. Using soybean as substrate. Malaysian Journal of Microbiology . Vol.3(1). pp.1 – 6.
14. **Chutmanop**, J.; Chuichulcherm, S.; Chisti, Y. &Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillusoryzae*in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 83:1012–1018.
15. **Dienes**, D. ; Börjesson, J. ; Hägglund, P. ; Tjerneld, F. ; Lidén, G. ; Réczey, K. &Stålbrand, H. (2007). Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichodermareesei*QM9414. Enzyme and MicrobialTechnology. 40: 1087-1094.
16. **Ghanem**, K.M. ; AL-Fassi, F. A. & Farsi, R.M.(2011). Statistical optimization of cultural condition for chitinase production from shrimp shellfish waste by *Alternaria alternate* . African Journal of Microbiology Research. Vol. 5(13).pp.1649-1659.
17. **St.Leger**, R.J.; Joshi, L.; Bidochka, M.J.; Rizzo, N.W. &Roberts,D.W.(1996). Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhiziumanisopliae*, *M.flavoviride* , and *Beauveriabassiana* during fungal invasion of host (*Manduca*) Cuticle. Applied and Environmental Microbiology.Vol. 62. No.3. pp. 907-912.

18. Akujobi ,CO. ; Odu, NN. ; Okorondu,SI. &Ike,GN.(2012) . Production of protease by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from abattoir environment . Journal of Research in Biology. Vol.2. No.2:077-082 .

19. Campos, R.A.; Arruda, W.; Boldo, J.T.; da Silva, M.V.; de Barros, N.M.; de Azevado, J.L.; Schrank, A. &Vainstein, M.H. (2005). *Boophilusmicroplus* Infection by *Beauveriaamorpha*and *Beauveriabassiana*: SEM Analysis and Regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. Current Microbiology.Vol. 50. pp. 257-261.

20. Muthulakshmi,C.; Gomathi, D.; Kumar, D.G.; Ravikumar, G. ; Kalaiselvi, M. & Uma, C.(2011). Production ,purification and characterization of protease by *Aspergillusflavus* under solid state fermentation .Jordan Journal of Biological Sciences. Vol.4. No. 3. pp.137-148.

21. Ferracini-Santos,L. &Sato,H.H.(2009).Production of Alkaline protease from *Cellulosimicrobiumcellulans*. Brazilian Journal of Microbiology. 40:54-60.

22. Dias, B.A.; Neves, P.M.O.J.; Furlaneto-Maia, L. &Furlaneto,M.C. (2008). Cuticle - degrading proteases produced by the entomo-pathogenic fungus *Beauveriabassiana*in the presence of coffee berry borer cuticle. Brazilian Journal of Microbiology. 39: 301-306.

23. Ali,S. ; Huang,Z. &Ren,S. (2010). Production of cuticle degrading enzymes by *Isariafumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. J. Pest. Sci. 83: 361–370.

24. Irfan,M. ; Abdul Rauf, ; Syed,Q. ; Nadeem,M. &Baig,S. (2011). Exploitation of Different Agro-residues for Acid protease Production by *Rhizopus sp.*in Koji Fermentation. IJAVMS. Vol. 5. Issue 1:43-52.

25. Haritha, R. ;SivaKumar,K. ;Swathi,A. ;Mohan,Y.S. &Ramana,T.(2011). Characterization of marine *Streptomyces carpaticus* and optimization of condition for production of extracellular protease.Microbiology Journal.pp.1-13.

26. Shankar, S. ; Rao, M. &Laxman, R. S. (2011), Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria*sp. .Process Biochemistry.Vol. 46. pp. 579-585.

27. Sassá,D.C. ; Varéa-Pereira,G. ; Neves,P.M.O.J. & Garcia J.E. (2009) . Genetic variation in a chitinase gene of *Beauveriabassiana* : lack of association between enzyme activity and virulence against *Hypothenemushampei*. Journal of Entomology. 6(1) : 35-41.

28. Sepahy,A.A. &Jabalameli, L. (2011) . Effect of culture conditions on the production of an extracellular protease by *Bacillus* sp. Isolated from soil sample of Lavizan Jungle park. Enzyme Research. pp. 1-7 .

29. Silva,B.D.S. ; Ulhoa,C.J. ; Batista,K.A. ; Yamashita,F. &Fernandes, K . F. (2011). Potential Fungal Inhibition by Immobilized Hydrolytic Enzymes from *Trichodermaasperellum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59: 8148–8154.