تأثيرُ بنـزواتِ الصّـوديـوم على النُّمـوّ والأيْضِ النّيتروجينيّ لبعْضِ أنواعِ الفطريّاتِ الكيسيّة

تاريخ استلام البحث ١٩/٥/١٩٩٢ تاريخ قبوله ١٤/١٢/١٩٩٢

جوليت أيواز* منهل النّعمة مكارم العبدال
جامعة البصرة

Abstract

The study involved the effect of inhibitor concentration ID_{50} for sodium benzoate on the growth of various fungi: *E. striata, A. terreus, P. notatum* in solid and liquid cultures. The results showed that the growth of *E. striata* is strongly inhibited by sodium benzoate with ID_{50} of 35 mM; while the fungi *A. terreus* and *P. notatum* showed relatively mild inhibition on their growth with ID_{50} of 50 mM and 60 mM, respectively.

The effect of the inhibitor on the fungi growth was studied and found to have strong inhibition on protein contents for the fungi studied with percentage of inhibition ranged between (40% – 60%). Also, our study showed the inhibitor effect of sodium benzoate on the activity of the enzyme D– animo acid oxidase (D–AAO) and the inhibition percentages were estimated as 12.2%, 13.6% and 23.4% decrease for the fungi *E. striata, A. terrues* and *P. notatum,* respectively.

ملخّـــص

تضمّن البحْثُ دراسـةَ تأثير الجُرعةِ المثبّطة ID (Inhibition Dose 50)، وهو تركيزُ المادّة المثبّطةِ الذي يحْدثُ عنده تثبيط بنسبة ٥٠٪ في النموّ من بنزوات الصّوديوم على نُموّ الفطريّات النّامية في الوسَطِ الزّراعيّ الصّلب *Penicillium notatum, Aspergillus terreus, Emericella striata* والسّـائل. وأظهرت النتائج وُجودَ تأثيرٍ شديدٍ لبنزوات الصّوديوم على نُموّ الفطر *E. striata* ؛ اذ كانت قيمةُ الجرعةِ المثبّطة لها (٣٥) ملمول؛ بينما كانَ تأثيرُ المثبّط سلبيًّا نسبياً على نُموّ الفطرين *P. notatum, A.terreus* ، حيث قُدّرت الجرعة المثبّطة لها بـ(٥٠) ملمول و(٦٠) ملمول على التـوالي. وقـد لوحظ أنّ بنـزوات الصّوديوم لها تأثيرٌ مثبّط على المُحتوى البروتينيّ للفطريّات المُستخدمة. وقد تراوحَتْ نِسَبُ التّثبيطِ بين (٤٠٪) و(٦٠٪) أو أكثر في بعضِ الحالات. كما بيّنت الدّراسةُ انّ للمثبّط تأثيراً غير ملموس في تخْفيضِ فعاليّة الأنزيم D-Amino Acid Oxidase (D-AAO) ، وقُـدّرت نسبـةُ تثبيطِ فعـاليّة هذا الأنـزيم بـ(١٢,٢٪)، (١٣,٦٪)، (٢٣,٤٪) للفطريّات المدروسة *E. striata* و *A. Terreus* و *P. notatum* على التّوالي.

* أستاذ مُساعِد في قسم علوم الحياة، كلّيّة التّربية؛ جامعة البصرة/ البصرة/ العِراق.

مقدمـــــة

من الشـائـع أن كثيراً من المـواد الكيميائيّة تستخـدم لتعـطيل ومنع نمو الأحياء المجهرية . وبصورة عامة ، فإن أي مادة من هذه المواد قد تكون سامة لأي من العمليات الحياتية الضرورية ، وسوف تعطى أثراً معوقاً على النمو، وقد تؤدي إلى موت الفطر إذا توافرت بكميات كبيرة . ومما يجدر ذكره أنه تم تشخيص بعض المثبطات لنمو الأحياء المجهرية ؛ فقد أثبت Freese وجماعته[١] ان مادة البنزوات تثبط نمو بعض أنواع الأحياء المجهرية ، وهي ذات تأثيرات سمية على الإنسان نتيجة تداخلها مع الأعضاء الوظيفية المهمة . ومن جهة أخرى فقد لاحظ Iwuagwu وIzuagbe[٢] و Webster وجماعته[٣] التأثير المثبط لمادة بنزوات الصوديوم على نمو الخمائر وبعض أنواع من البكتريا ، كما وجدوا أن مادة البنزوات قد تزيد من حموضة الخلية مما يؤدي الى اختزال جهد الغشاء البلازمي الذي بدوره يثبط نقل المواد الأساسية إلى داخل الخلية من الوسط الخارجي .

أما عن تأثير المثبطات على فعالية الأنزيمات وخاصة الأنزيم (D–AAO) ، فقد بينت الدراسات السابقة أن هناك تثبيطاً مباشراً لحامض البنزويك على فعالية الأنزيم (D–AAO) في أكسدة الأحماض الأمينية (D– – Amino Acids) . وقد أشار العالمان Kamin و Klein[٤] إلى أن حامض البنزويك يؤدي إلى إعاقة فعالية الأنزيم (D–AAO) عند استعمال مستخلص الكبد أو كلية الفأر، وكان مقدار الانخفاض في الأكسدة للأنزيم حوالي (٦٠٪) عند استعمال (١ , ٠)ملمول من حامض البنزويك مع (٣٠) ملمول من الحامض الأميني (DL-alanine) . كذلك أوضح العالم Bartelett[٥] أن الحامض الأميني (D–alanine) والبنـزوات يتنافسان عكسياً حول الأنزيم المستخلص من كلية الخروف والخنزير لمدى واسع من التراكيز، وأن (٥٠٪) من تثبيط الأنزيم كان عند نسبة ١٠٠ : ١ من الـ D–Alanine إلى البنـزويت . كما أكد العالم Horowitz[٦] أن أكسدة الحامض الأميني (D–methionine) بانـزيم (D–AAO) المعزول من الفطر *N. crassa* يثبط تثبيطاً تنافسياً مع Isovaline ولكن لا يؤثر عليه كل من السيانيد أو البنزويت . كما بين العالم Emerson وجماعته[٧] تأثير (١ , ٠) ملمول من المثبطات الكيميائية على أنزيم (D–AAO) المستخلص من الأعفان كالفطر *P. chrysogenum* من خلال تأثيرها على معدل أكسدة الحامض الأميني DL-methionine . كذلك أظهرت الدراسات أن البنزوات ومشتقاته، وخاصة amino benzoate هي مثبطات تنافسية قوية للأنزيم (D–AAO) المستخلص من كلية الخنزير[٨] .

إنّ الهدف من هذه الدراسة معرفة تركيز بنزوات الصوديوم التي تعمل على تثبيط نمو الفطريات المدروسة. ويضاف إلى ذلك دراسة تأثير هذه المادة على فعالية الأنزيم (D–AAO) والمحتوى البروتيني لهذه الفطريات، وذلك لأن بعض الباعة المختصين بصنع المخللات يضيفون كميات غير محددة من هذه المادة المثبطة إلى مخللاتهم لغرض الحفاظ عليها من التعفن مما يضر بصحة الإنسان عند تناولها. اما فيما يتعلق باختيار هذه المجموعة من الفطريات لهذه الدراسة فيعود سبب ذلك إلى كونها نموذجاً من بين المئات من الأحياء المجهرية التي تعيش بصورة مترممة على هذه الأنواع من المواد الغذائية.

المواد وطرق العمل

الفطريات المستخدمة

استخدمت ثلاثة أنواع من الفطريات في هذه الدراسة المعزولة من التربة العراقية، وهي: *Emericella striata* (Rai, Tewari and Mukergi) Mollock and Cain., *Aspergillus terreus* Thom., *Penicillium notatum* Thom.

الوسط الغذائي

استخدم وسط خلاصة الشعير Malt extract (ME) بشكل صلب وسائل لغرض تنمية الفطريات وتقدير الجرع المثبطة ID من بنزوات الصوديوم للفطريات الثلاثة[٩].

تحضير خلاصة الخام للفطر

استخدمت لذلك طريقة العالم Gomori [١٠]؛ إذ أُخذ وزن من الخيوط الفطرية (وزن رطب) مع قليل من الرمل المغسول بالحامض (sea sand acid washed) وأضيف إليه محلول منظم (٢ , ٠) مول Tris–HCl بارد عند اس هيدروجيني[٣،٨]، وسحق سحقاً جيداً لمدة (٥) دقائق بواسطة المدقة والجفنة الموضوعة في إناء يحتوي على مسحوق الثلج، ثم رشحت الخلاصة بواسطة أوراق الترشيح من نوع (GF/A) قطر (٧) سم وجمع الراشح واستخدم مباشرة لأغراض التفاعل.

تعيين فعالية الأنزيم (D–AAO)

تعتمد طريقة تعيين فعالية الأنزيم (D–AAO) في الخلاصة الخام للفطر على أكسدة الحامض الأميني من نوع (D– –AA) إلى حامض كيتوني وتحرير الأمونيا[٦،١١].

حضـر مزيج التفاعل الأنزيمي بإضافة (٠,٥) مليلتر من المحلول المنظم Tris–HCl والحاوي على (١٠) ملمول من المادة الأساس (D– – phenyl alanine) في أنبوبة اختبار (نظيفة). وابتدأ التفاعل بإضافة (٢,٥) مليلتر من الخلاصة الخام وبعد رجه جيداً في حمام مائي حاضن لمدة ساعة واحدة بدرجة حرارة (٣٧°س. بعد ذلك أوقف التفاعل باضافة (٣) مليلتر من حامض البركلوريك (PCA) بتركيز (٤٪). وعلى الشاكلة نفسها، اعيد الاختبار الأنزيمي أعلاه بوجود الجرعة المثبطة ID_{50} من بنزوات الصوديوم لكل فطر من الفطريات المستخدمة.

أ) تعيين كمية الأمونيا المتحررة

تعين كمية الأمونيا المتحررة حسب طريقة Umberit وجماعته[١٢]. أضيف كاشف نسلر إلى الراشح (الخلاصة الخام للفطر) ثم قيست شدة اللون المتكون عند طول موجي قدرُهُ (٤٧٠) نانومتراً باستخدام جهاز المطياف الضوئي (LKB 5040 Spect) . واحتسبت كمية الأمونيا المتحررة بشكل مايكرومول أمونيا لكل غم من النسيج الطري للفطر في الساعة (μ mol NH_3/gm / hr) .

ب) تعيين كمية الحامض الكيتوني فنيل بايروفيت

قدرت كمية الحامض الكيتوني المتكون حسب طريقة Greenberg [١٣] وقيست شدة اللون الناتج من التفاعل بجهاز المطياف الضوئي (LKB 5040) تحت طول موجي قدره (٥١٥) نانـومتـراً. واحتسبت كمية الحـامض الكيتـوني المتكـون بشكـل مايكرومول فينل بايروفيت لكل غم من النسيج الطري للفطر في الساعة (μ mol Phenyl Pyr. / gm / hr)

جـ) تعيين البروتين

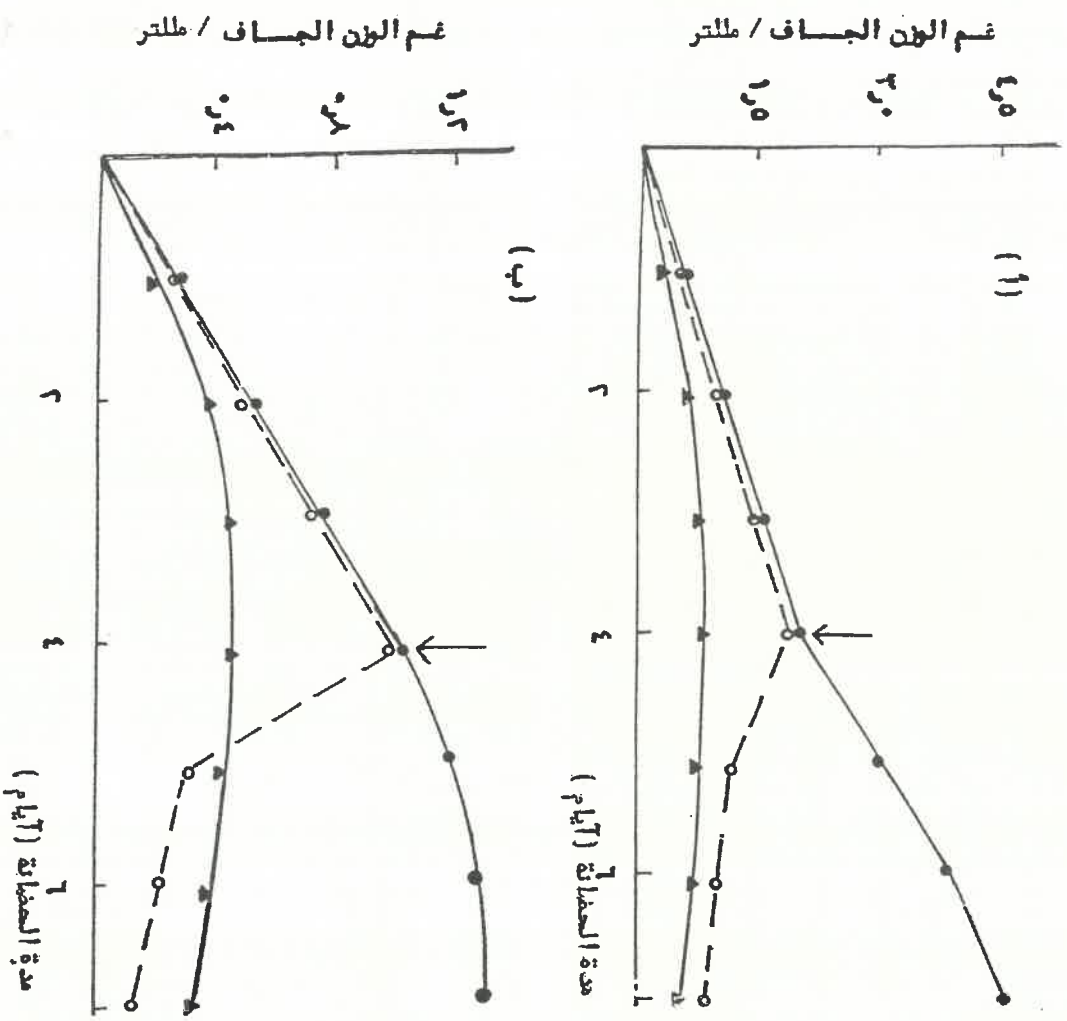
قدرت كمية البروتين الذائب في الخلاصة الخام للفطريات حسب الطريقة التي استخـدمهـا Lowery وجمـاعته[١٤] باستخدام البومين مصل البقر (BSA) ، حيث قيست الكثافة الضوئية للمحلول بجهاز المطياف الضوئي (LKB 5040) عند طول موجي قدره (٧٤٥) نانومتراً ثم حسبت كمية البروتين الموجود في خلايا الفطريات. وقد اعتمدت لهذا الغرض وحدات ملغم بروتين لكل غم من النسيج الطري للفطر (mg Protein / gm.) .

النتائج

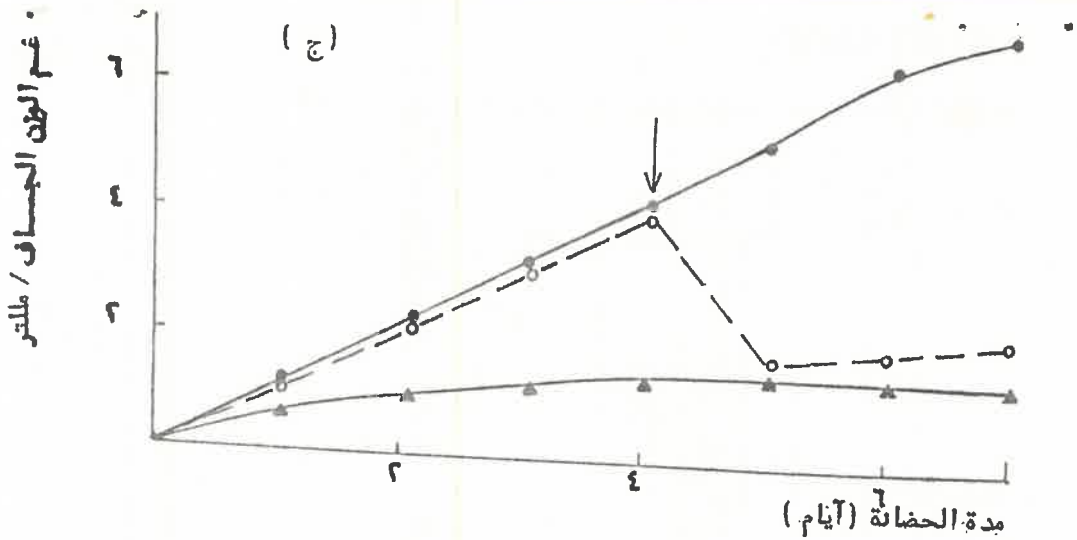
أوضحت النتـائـج أن المثبط بنزوات الصوديوم يؤدّي دوراً مثبطاً فعلياً على نمو الفطريات المدروسة في أوساط زرعية سائلة حاوية على الجرع المثبطة لكل نوع من العزلات الفطرية (شكل ـ ١ ـ أ، ب، ج). فقد لوحظ تثبيط حاد ومفاجىء على الفطر *E. striata* عند إضافة الجرعة المثبطة ID_{50} إلى أوساطها الزرعية بعد أربعة أيام من التحضين المسبق في أوساط زرعية غير معاملة بالمادة المثبطة (شكل ـ ١ ـ أ). كما لوحظ تأثر نمو الفطرين *A. terreus* و*P. notatum* الناميين في الوسط الزرعي السائل والمعامل بالجرعة المثبطة ID_{50} لكل منها مقارنة بالاختبار الضابط؛ إذ حصل تثبيط حاد في النمو (قل الوزن الجاف) للفطرين ولجميع الأيام عند إضافة المثبط إلى أوساطها الزرعية بعد أربعة أيام من التحضين المسبق في أوساط زرعية غير معاملة بالمادّة المثبطة (شكل ـ ١ ـ ب، ج).

كذلـك بينت النتائج تأثير بنزوات الصوديوم على المحتوى البَروتيني للفطريات المـدروسـة؛ فقـد تبين تثبيط المحتـوى البروتيني للفطر *E. striata* في الوسط الزرعي المعامل بالجرعة المثبطة لفترة أيام الحضن مقارنة بالاختبار الضابط الشكل (٢ـأ)؛ في حين تذبذب انتاج البروتين للفطر *A. terreus* في جميع أيام الحضن في الوسط المعامل بالجـرعـة المثبـطة مقـارنة بالاختبار الضابط [شكل (٢ ـ ب)]. هذا ولوحظ ايضاً ان المحتـوى البـروتيني ارتفع في الفطر *P. notatum* عندما عومل بالجرعة المثبطة مقارنة بالاختبار الضابط لجميع فترات الحضن شكل (٢ ـ ج).

وقد قدر النشاط الأنزيمي لليوم الثالث من التحضين فقط، فلم يظهر أي نشاط أنـزيمي (D–AAO) للأيام البـاقية من الحضن سواء كانت قبـل هذه المدة أو بعدها. ويلاحظ من الجدول (١) أن هناك تثبيطاً غير ملموس لفعالية الأنزيم (D–AAO) الذي قدر بـ(٢ , ١٢٪) بالنسبـة للحامض الكيتوني المتكون و(١ , ١٤٪) بالنسبة الى الأمونيا المتحررة في حالة الفطر *E. striata*؛ في حين كانت نسبة التثبيط حوالي (٦ , ١٣٪) من الحامض الكيتوني المتكون للفطر *A. terreus*. أما فيما يتعلق بالفطر *P. notatum* فقد كانت نسبـة التثبيط اعلى نسبياً من الفـطرين السـابقين، حيث قيست النسبـة المئوية لانخفـاض الأنـزيم (٤ , ٢٣٪) و(٦ , ٢٤٪) من الحـامض الكيتـوني النـاتـج والأمونيا المتحررة على التوالي.



شكل (١)



الشكل ١ : تأثير الجرع المثبطة ID_{50} لمادة بنزوات الصوديوم على نمو الفطريات الثلاثة :

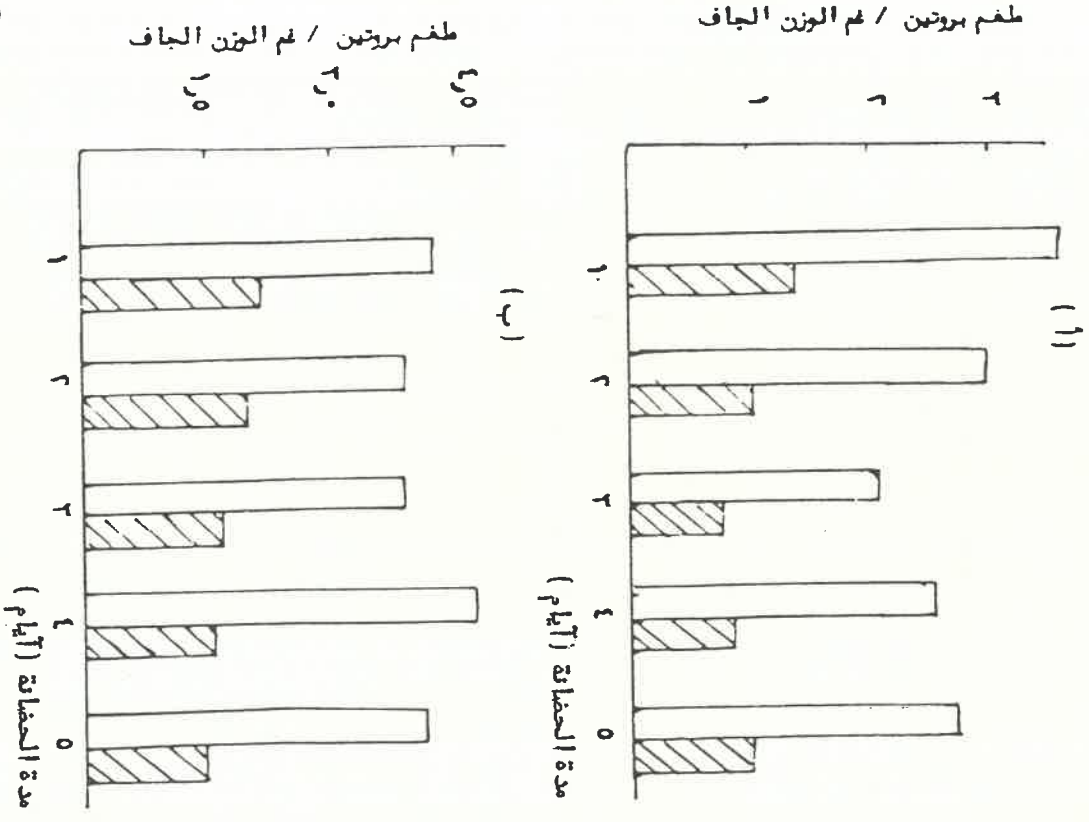
أ ـ *E. striata* ب ـ *A. terreus* ج ـ *P. notatum* بعد حضن الفطريات في وسط غذائي سائل (ME) تحت درجة حرارة ٣٠°س ولمدة ثمانية أيام . النتائج هي معدل ثلاث قراءات .

وتمثل المنحنيات التالية :

●——● وسط غذائي غير معامل بالمثبط (الاختبار الضابط) .

▲——▲ وسط غذائي عومل بالجرعة المثبطة ID_{50} لبنزوات الصوديوم لكل فطر (*E. striata = 35 mM; A. terreus = 50mM; P. notatum = 60mM*) من البداية .

O- - -O وسط غذائي أضيفت إليه الجرعة المثبطة ID_{50} ، ويشير السهم إلى وقت إضافة المثبط .



شكل (٢)

الشكل ٢ : رسم بياني يوضح تأثير الجرع المثبطة لمادة بنزوات الصوديوم على المحتوى البروتيني للفطريات: أ- *E. striata* ب - *A. terreus* ج - *P. notatum* ، حيث حضن الفطر في وسط غذائي (ME) تحت درجة حرارة ٣٠°س ولمدة خمسة أيام مضافاً إليه أو غير مضاف الجرعة المثبطة ID_{50} لكل فطر:

(*E. striata = 35mM; A. terreus = 50 mM; P. notatum = 60 mM*).

تم قياس البروتين حسب طريقة لوري وجماعته (Lowrey et al., 1951) والنتائج هي معدل ثلاث قراءات.

□ : المحتوى البروتيني للفطر غير المعامل بالمثبط (الاختبار الضابط).

■ : المحتوى البروتيني للفطر المعامل بالجرعة المثبطة.

الجدول ١ : تأثير الجرعة المثبطة من بنزوات الصوديوم على فعالية الانزيم D–AAO لثلاثة انواع من الفطريات المحضنة بدرجة حرارة ٣٠°س لمدة سبعة أيام .

فعالية الانزيم D–AAO	مايكرومول فينل متكون لكل غم من النسيج الطري / ساعة			مايكرومول أمونيا متحررة لكل غم من النسيج الطري / ساعة		
اسم الفطر	الاختبار الضابط	الاختبار بوجود المثبط	النسبة المئوية للانخفاض	الاختبار الضابط	الاختبار بوجود المثبط	النسبة المئوية للانخفاض
E. striata	٥,٧	٥,٠	٪١٢,٢	٦,٤	٥,٥	٪١٤,١
A. terreus	٥,٩	٥,١	٪١٣,٦	-	-	-
P. notatum	٦,٤	٤,٩	٪٢٣,٤	٦,٩	٥,٢	٪٢٤,٦

كل قيمة تمثل معدل ثلاث قراءات . (-) هذه العلامة تعني فعالية الانزيم لم تقدر. الانخفاض ذو دلالة مميزة احصائياً ($P = 0.05$) باستخدام معادلة التشتت Student "t" test .

المناقشـــة

أكـدت الـدراسة الحالية السلوك المثبط لبنزوات الصوديوم على نمو الفطريات الثلاثة النامية في الوسط الزراعي السائل، حيث نلاحظ من الشكل (١ ـ أ، ب، ج) أن نمو الفطريات يثبط فعلاً في الأوساط الزرعية السائلة المعاملة بالجرع المثبطة من مادة بنزوات الصوديوم، وهذه تتفق مع النتائج التي توصل اليها العلماء السابقون[١٥،٢] وهو تأثير بنزوات الصوديوم على الخميرة *S. servisiae* المزروعة في أوساط زرعية سائلة . ومما هو جدير بالاهتمام التثبيط الحاد والمفاجىء للنمو عند إضافة المثبط بعد أربعة أيام من زرع الفطريات مما يشير إلى أن التثبيط حصل على النمو فعلاً[١٦،٩] .

وقد لوحظ أن المحتوى البروتيني للفطريات *E. striata* و *A. terreus* و *P. notatum* النامية في الأوساط الزرعية غير الحاوية على المثبط يكون متغيراً باختلاف نوع الفطر وعمره (الشكل ٢ ـ أ، ب، ج) فقد بينت مثل هذه الدراسة ما توصل إليه العالمان Anis-worth و Sussman [١٧] . ومن المـلاحظ أيضـاً أن المحتـوى البـروتينيّ لهذه الفطريات ينخفض عند استخدام المثبط أثناء فترة الحضانة . كما لوحظ هذا في بعض الفطريات، ومنهـا *Endogone pisiformis* والفـطر *Cryphonectria cubenis* [١٨،١٩] . وربمـا يعـزى

النقصان في المحتوى البروتيني إلى تحول جزء من البروتين إلى نيتروجين ذائب أو أحماض أمينية[١٨] أو تحول جزء من البروتين إلى مركبات مخزونة مثل الكاربوهيدرات[٢٠]. وهذا مشابه للدراسة الحالية التي أثبتت أن هناك تثبيطاً للمحتوى البروتيني لهذه الفطريات بإضافة الجرع المثبطة، حيث تتراوح نسبة الانخفاض بين (٤٠٪ - ٦٠٪) مقارنة بالاختبار الضابط (شكل ٢- أ، ب، ج). وقد أجريت بحوث مشابهة حول تأثير بعض المثبطات على بروتين الخلايا؛ إذ نشر العالمان Moss و Badii [٢١] بحثاً وضّحا فيه حدوث نقصان في المحتوى البروتيني لجدران الفطر *A. niger* من (١١٪) في الخلايا الطبيعية غير المعاملة بالمثبط (rubratoxin B) إلى (٨٪) في الخلايا المعاملة بالمثبط نفسه. كما أشار الباحث Valcarcel وجماعته[٢٢] إلى تأثير مادة بنزوات الصوديوم على الأيض الكاربوهيدراتي للأحياء المجهرية. أما عن تأثير بنزوات الصوديوم على فعالية الأنزيم (D-AAO) في الفطريات الثلاثة المدروسة *P. notatum, A. terreus, E. striata* (جدول ١) فنلاحظ أن كمية الأمونيا المتحررة للفطرين *E. striata* و *P. notatum* في الاختبار الضابط هي (٦,٤ و٦,٨) مايكرومول لكل غم في الساعة على التوالي، وهي مقاربة إلى كمية الحامض الكيتوني فينيل بايروفيت المتكون لنفس الاختبار الضابط (٥,٧ و٦,٤) مايكرومول لكل غم في الساعة. وهذا يؤكد الـ Stoichiometry للتفاعل الأنزيمي، وحيث يتحرر مول واحد من الأمونيا ومول واحد من الحامض الكيتوني لكل نصف مول من الأوكسجين المستهلك بواسطة الأنزيم (D-AAO) [٢٣]. وهذه النتائج تتفق مع استنتاج العالم Emerson وجماعته[٧] الذين درسوا نشاط الأنزيم (D-AAO) عند الفطر *P. chrysogenum* وكذلك الحال في الفطر *N. crassa* [٢٤]. ولكن فيما يتعلق بخصوص تأثير المثبط بنزوات الصوديوم على نشاط الأنزيم (D-AAO) فان أعلى نسبة تثبيط هي (٢٤,٦٪ و٢٣,٤٪) للفطر *P. notatum* عند استعمال الجرعة المثبطة، وهذا مشابه لما حصل عليه العالم Emerson وجماعته[٧] عند دراستهم للفطر *P. chrysogenum*، حيث حصلوا على نسبة تثبيط هي (٢٣٪ و ٢٤٪) عند استخدامهم مثبطات مختلفة. كذلك هو الحال بالنسبة للفطرين *E. striata* و *A. terreus*، حيث حصلنا على نقصان في نشاط الأنزيم (D-AAO) بشكل واضح كما هو مبين في الجدول (١) لكل من الأمونيا المتحررة والحامض الكيتوني المتكون عند إضافة الجرع المثبطة من بنزوات الصوديوم لكل فطر. وهذا يتفق مع الدراسات السابقة، حيث وجد ان هناك تأثيراً شديداً وواضحاً على فعالية الأنزيم (D-AAO-) المستخلص من خلايا مختلفة المصادر[٥،٧،٨،٢٥].

وخلاصة القول: يمكن تلخيص ما توصلنا إليه من هذه الدراسة بأن الفطريات التي اختيرت في هذا البحث قد تثبط نموها عند استخدام بنزوات الصوديوم، ويمكن حصر مدى التراكيز من هذه المادة للتأثير على نمو الفطريات بين (٣٥-٦٠) ملمول التي تقدر بين (٦-٨) غم/لتر لكي تفي بالغرض.

References

1. Freese, L.R., Chingju, W.S. and Galliers, E., Function of lipopholic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 1973; 241: 321-325.
2. Iwuagun, Y.O.U. and Izuagba, Y.S., Studies on the preservation and bottling of Oyokpo—a Nigerian beer from millet. *Pennisetum typholideum. J Appl Bact.*, 1985; 59: 487—492.
3. Webster, S.N., Fowler, D.R. and Cooke, R.D., Control of a range of food related micro-organism by a multi-parameter preservation system. *J Food Tech.* 1985; 20: 311-318.
4. Klein, J.R. and Kamin, H., Inhibition of the D— amino acid oxidase by benzoic acid. *J Biol Chem.* 1941; 138: 507—512.
5. Bartlett, G.R., The inhibition of D— amino acid oxidase by benzoic acid and various mono-substituted benzoic acid derivatives. *J Am Chem Soc.* 1948; 70: 1010—1011.
6. Horowitz, N.H., The D— amino acid oxidase. *J Biol Chem.* 1944; 154: 141—145.
7. Emerson, R.L., Puziss, M. and Knight, S.G., The D— amino acid oxidase of mold. *Arch Biochem.* 1950; 25: 299—308.
8. Nishina, Y., Shiga, A., Tojo, H., Njura, R., Wateri, H. and Yamono T., Resonance raman study of D—amino acid oxidase inhibitor complex. *J Biochem.* 1981; 90(5): 1515—1520.
9. Albdal, M.A., M. Sc. Thesis, University of Basrah, 1988.
10. Gomori, G., Methods in enzymology. Vol. I, *Academic press,* New York, London, 1955; p138—146.
11. Massey, V., Palmer, G. and Bennett, R., The purification and some properties of D— amino acid oxidase, *Biochem Biophys.* 1961; 48: 1—9.
12. Umberit, W.W., Burris, R.H. and Stavfler, J.R., Manometric techniques. *Burgess,* U.S.A., 1959; p238—256.
13. Greenberg, D.M., Methods in enzymology. Vol. V, *Academinc press,* New York, London, 1962; p92—951.
14. Lowery, O.H., Rosebourgh, N.J., Farr, A.L. and Randall, J., Protein measurements with Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 165-175.
15. Beuchat, L.R. Effect of potasium sorbate and sodium benzoate on the lactivating yeast heated in broths containing sodium chloride and sucrose. *J Food Prot.* 1981; 44(10): 765—769.
16. Martin, S.M. Effect of ferrocynide on growth and acid protection of *A. niger, Can J Microb.* 1955; 1: 644—652.
17. Ainsworth, G.C. and Sussman, A.S., The fungi: an advanced treatise. Vol. I, Academic press, New York, 1965; p 1—748.

18. Jabagi–Hare, S., Tremblay, M.F. and Parent, S., Changes in concentration of total fatty acids, soluble proteins, nitrogen and phosphate activity in mycellia of *E. pisiformis* during growth. *Mycologia.* 1988; 80(1): 54–62.
19. Alfenas, A.C., Hodges, C.S. and Jengs, R., Isoenzymes and protein patterns of isolates of *C. cubesis* differing invirulence. *Can J Bot.* 1984; 62: 1756–1762.
20. Righelato, R.C., Fungal wall and hyphal growth. Cambridge University press, London, 1979; p385–401.
21. Moss, M.O. and Badi, F., Effect of Rubratoxin B on amino acid composition of the hyphal wall of *A. niger. Trans Brit Mycol Soc.* 1981; 77(1): 189–192.
22. Valcarcel, R., Bennet, J.W. and Vitanza, J., Effect of selected inhibitors on growth, pigmentation and aflatoxin production by *A. niger.* Mycopathologia. 1988; 94: 7–10.
23. Dixon, M. and Webb, E.C., Enzymes, Academic press, New York, London, 1979.
24. Rosenfeld, M.G. and Leiter, E.H., Isolation and characterization of mitochondrial D–amino acid oxidase from *N. crassa. Can J Biochem.* 1977; 55: 66–74.
25. Klein, J.R., Inhibition of D–amino acid oxidase by aromatic acids. *J Biol Chem.* 1953; 205: 725–731.