استخدام كلوتين الذرة كوسط ملائم لتنمية الفطر *Trichoderma harzianum* وانتاج انزيم االبروتييز الحامضي

Using of Corn Gluten Growing of *Trichoderma harzianum* and production of acid protease

بتول زينل علي لينا جاسم محمد *د. زهرة محمود الخفاجي

كلية تربية ابن الهيثم – قسم علوم الحياة
*معهد الهندسة الوراثية

المستخلص :

استهدفت الدراسة الحالية امكانية استخدام احد المخلفات الزراعية وهو كلوتين (Gluten) الذرة الجزء غير الذائب ولأول مرة كوسط زرعي لتنمية الفطر *Trichoderma harzianum* وانتاج انزيم البروتييز الحامضي بأسلوب التخمرات الصلبة . أظهرت النتائج قابلية الفطر العالية للنمو في وسط الكلوتين بكفاءة تضاهي كفاءة النمو على وسط المالت النموذجي لنمو الفطريات . كما أظهر الفطر كفاءة في انتاج البروتييز الحامضي على هذا الوسط ، اذ أظهر الانزيم فعالية تقدر بقيمة (151.41) وحدة/مل وانتاجية (908.96) وحدة/غم وفعالية نوعية (258.69) وحدة/ملغم وبظروف مثلى للدالة الحامضية لفعالية وثباتية الانزيم بقيمة (6) و(7) على التوالي . اما الظروف المثلى لانتاج الانزيم فكانت بدالة حامضية (6) ودرجة حرارة (35) م وأفضل مدة حضانة لانتاج الانزيم كانت (4) أيام . واستخدام محلول الفوسفات الداريء كمحلول مرطب أمثل للانتاجية ، أما أفضل محلول للأستخلاص فكان داريء الخلات ، وأفضل نسبة ترطيب للكلوتين كانت بنسبة (2 : 1) وحجم لقاح (10^7) سبور/غم ، تعطي هذه النتائج مؤشراً ناجحاً لامكانية استخدام هذا الوسط لانتاج البروتييز الحامضي من قبل الفطريات .

Abstract

The study was conducted to evaluate the utilization of corn gluten which is one of the agricultural waste products "especially the insoluble solid phase" for the first time as a culturing medium for *Trichoderma harzianum* and production of acid protease enzyme by solid state fermentation. Results showed that the fungus had high efficiency to grow on gluten medium which was similar to its growth on malt agar medium, which is ideal for growth of fungi. In addition the fungus showed the ability produce acid protease enzyme on this medium with enzyme activity of (151.41) unit/ml and productivity of (908.96) unit/gm and specific activity (258.69) unit/mg under optimum conditions applied. pH values for enzyme activity and

stability were (6) and (7) respectively . Whereas the optimum conditions for production of acid protease were: pH (6), temperature (35)°C optimum incubation was (4) days, wetting solution was phosphate buffer and extracting solution acetate buffer, whereas the best wetting ratio was (2:1) and optimum inoculums size was (10^7) spore/gm gluten. These results give successful indication of possible utilization of gluten as a culture medium and production of acid protease by the fungi.

المقدمة :

تحتل الانزيمات المحللة للبروتينات (البروتييزات) موقع الصدارة بين الانزيمات ذات الاهمية الصناعية. وقد توجه الاهتمام الى انزيمات البروتييز المنتجة من الاحياء المجهرية كبدائل للانزيمات الحيوانية والنباتية نظراً لسهولة تنمية هذه الاحياء والتعامل معها وامكانية السيطرة على ظروف الانتاج وقصر مدته مقارنة بالمصادر الاخرى [1] .

ولايكاد يخلو اي كائن مجهري من انزيمات البروتييز التي تقسم حسب موقعها من الخلية الى انزيمات داخلية Intracellular protease وانزيمات خارجية Extracellular protease ، تفرز الاخيرة الى خارج الخلية لتحلل المواد البروتينية المعقدة الى مواد بسيطة يمكن ان تستفيد منها الخلية لتلبية متطلباتها التغذوية . وتنتج الانزيمات الخارجية بكمية كبيرة ، وهناك عشرات الاطنان من هذه الانزيمات الخارجية تنتج سنوياً بوساطة الاحياء المجهرية لاسيما من قبل انواع جنس البكتريا *Bacillus* وانواع الفطر *Aspergillus* [2] .

تصنف البروتييزات الى بروتييزات قاعدية وحامضية ومتعادلة . تعد الفطريات من اهم الاحياء المنتجة للبروتييزات الحامضية . تقسم البروتييزات الحامضية الى نوعين : بروتييزات مشابهة للببسين Pepsin-like acid protease و بروتييزات مشابهة للرنين Rennin-like acid protease .

وقد وجد ان البروتييزات المشابهة للببسين يكاد ينحصر انتاجها في مجموعة الفطر *Aspergillus* وانواع قليلة من جنس *Penicillium* اما المجموعة المشابهة للرنين فيكاد ينحصر انتاجها في انواع جنس *Mucor* و *Rhizopus* [3] .

تعد مزارع التخمرات الصلبة الاسلوب الامثل لانتاج الانزيمات من الفطريات فهي بمثابة محاكاة للطبيعة فضلاً عن كونها تهيء فرصة لاستغلال مخلفات نباتية (صناعية) رخيصة كأوساط زرعية ملائمة لنمو الفطريات وانتاج الانزيمات وتتوافر فيها مؤشرات الجدوى الاقتصادية .

من بين المخلفات الصناعية التي يمكن استغلالها هي مخلفات صناعة نشأ الذرة المنتج من قبل شركة الفرات العامة (وزارة الصناعة والمعادن) التي تنتج مادة بروتين الذرة (الكلوتين) كناتج عرضي يستعمل بشكل رئيس علفا حيوانيا ولكن امكن استغلاله في تحضير بعض الاوساط الزرعية الغذائية لتنمية الاحياء المجهرية (بكتريا وفطريات) [4 ، 5] .

وبالنظر لاهمية انزيمات البروتييز وتوفر المواد البروتينية غير المستغلة مثل كلوتين الذرة، استهدفت الدراسة الحالية امكانية استغلال كلوتين الذرة (الجزء

غير الذائب) كوسط زرعي صلب لتنمية الفطر *Trichoderma harzianum* وانتاج انزيم البروتييز الحامضي باسلوب تخمرات المواد الصلبة.

المواد وطرائق العمل :

- الفطر *T. harzianum* والذي كان مصدره من التربة تم الحصول عليه من مختبر الفطريات المتقدم/كلية التربية ابن الهيثم .

- تم الحصول على كلوتين الذرة الخام من شركة الفرات العامة للصناعات الكيمياوية (وزارة الصناعة والمعادن) بشكل كتل صلبة مفتتة وتمت معاملته للحصول على الجزء غير الذائب منه [6] .

- اختبار استهلاك الفطر لكازيين الحليب

تمت على وسط اكار الحليب الارجواني برقم هيدروجيني (6) طبقا لما معتمد في هذه الدراسات [7] ، وتم قياس قطر منطقة التحلل وقطر المستعمرة النامية . النتيجة الموجبة (ظهور منطقة التحلل) تدل على قدرة الفطر على انتاج انزيمات البروتييز. وكذلك اختبرت كفاءة الفطر على تحليل الكازيين اذ حضر وسط الكازيين (8) ونظم الرقم الهيدروجيني للوسط على قيم تراوحت بين (4-6) . بعد تنمية الفطر بشكل قرص (مأخوذ من نمو الفطر على وسط صلب) في مركز الطبق تم قياس نسبة تحليل البروتين (قطر منطقة التحلل / قطر المستعمرة) .

- اختبار كفاءة نمو الفطر على وسط اكار الكلوتين بقيم هيدروجينية حامضية :

بعد اختبار قابلية الفطر الموجبة على تحليل وسط الحليب الارجواني في الفقرة السابقة زرع على وسط اكار الكلوتين الصلب المحضر من مستحضر الكلوتين غير الذائب بعد تنظيم الرقم الهيدروجيني (pH) له الى قيم مختلفة تراوحت بين (4-6) وحسب في اطباق زجاجية [6] . وزرع الفطر على وسط مستخلص المالت الذي يعتبر وسطا ملائما لنمو العديد من الفطريات للمقارنة وتم قياس اقطار المستعمرات على الوسطين .

- اختبار كفاءة الفطر للنمو على وسط الكازيين :

بعد التأكد من قابلية الفطر على انتاج انزيمات البروتييز في الفقرات السابقة نمو الفطر على وسط التخمر الصلب [9] وهو الكلوتين المرطب الذي حضر ببعض التحويرات [6] حيث وضع مقدار(5) غم من مستحضر الكلوتين غير الذائب في قناني زجاجية سعة (200) مل ، رطب المستحضر باضافة (10) مل من محلول الفوسفات الداريء برقم هيدروجيني (5) اي بنسبة ترطيب (1:2)حجم : وزن ثم عقم الوسط بالمؤصدة وبرد . لقح الوسط بعالق ابواغ الفطر بحجم (2.5) مل (3×10^6) بوغ/غم كلوتين (10) وحضن الوسط بدرجة حرارة 30م لمدة (4) ايام ، بعدها استخلصت انزيمات البروتييز [6] . قدرت فعالية انزيم البروتييز في المستخلص وفق الطريقة المتبعة [11] وقدرت وحدات الفعالية الانزيمية ، وعرفت وحدة الفعالية بانها كمية الانزيم التي تحرر 1 مايكرومولار من التايروسين في الدقيقة عند ظروف القياس . كما تم تقدير البروتين حسب الطريقة المطلقة لتقدير البروتين[12] وتم تقدير الفعالية النوعية للانزيم حسب المعادلة :

$$\text{الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)} = \frac{\text{فعالية الانزيم (وحدة/مل)}}{\text{تركيز البروتين(ملغم/مل)}}$$

- تعيين الظروف المثلى لفعالية وثبات الانزيم الخام: استخدم محلول التفاعل 1% كازيين بقيم هيدروجينية مختلفة (2-7) لتعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم . كما تم تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات الانزيم واستخدم محلول الخلات الداريء بقيم هيدروجينية تراوحت بين (2-6) ومحلول الفوسفات الداريء برقم هيدروجيني (7) لتعيين ثبات الانزيم [6] .

- تعيين الظروف المثلى لانتاج الانزيم :

1. الدالة الحامضية الامثل : استخدم لذلك محلول الفوسفات الداريء بتركيز (0.2) مولار كمحلول مرطب وبقيم هيدروجينية (3-7) بنسب ترطيب (1:2) (حجم : وزن) .

2. درجة الحرارة المثلى : حضنت مزارع الفطر المنمى على وسط الكلوتين المرطب بمحلول الفوسفات بدرجات حرارة تراوحت بين (25-35) م لمدة (4) ايام واستخلص الانزيم .

3. محلول الترطيب الامثل : استخدمت ثلاث محاليل لترطيب الكلوتين وهي : محلول الفوسفات الداريء بتركيز (0.2) مولار ورقم الهيدروجيني (5) ، الماء المقطر ورقم الهيدروجيني (5.5- 6) ، ماء الحنفية ورقم الهيدروجيني (5.5) واستخلص الانزيم .

4- محلول الاستخلاص الامثل : استخدمت محاليل مختلفة لاستخلاص الانزيم تضمنت : محلول الفوسفات الداريء ، محلول الخلات الداريء ، محلول السترات الداريء بتركيز (0.2) مولار ورقم الهيدروجيني بقيمة (5) لكل من المحاليل الثلاثة كما استخدم الماء المقطر كمحلول استخلاص ايضاً .

5- نسبة الترطيب المثلى : رطب كلوتين الذرة بمحلول الفوسفات الداريء بنسبة ترطيب (1 : 1) و(2 : 1) حجم:وزن .

6- حجم اللقاح الامثل : استخدمت اعداد مختلفة من ابواغ الفطر كلقاح تراوحت بين (10^5-10^7) بوغ/غم كلوتين .

7- مدة الحضانة المثلى : رطب كلوتين الذرة بمحلول الفوسفات بنسبة (2 : 1) ولقح بابواغ الفطر وحضنت المزارع لمدة زمنية تراوحت بين (1-8) يوم واستخلص الانزيم بصورة دورية كل (24) ساعة بمحلول الخلات الداريء .

النتائـج والمناقشـة :

يختلف كلوتين الذرة قيد الدراسة عن باقي المخلفات الصناعية كونه مادة بروتينية فقط مقارنة بالمخلفات الزراعية والصناعية الاخرى التي تكون غنية بمصادر الكاربوهيدرات والمواد الاخرى [13 ، 14] ، كما ان الرقم الهيدروجيني لنقيعه يتراوح بين (3- 4) [4 ، 5] ، فلذلك فان كلوتين الذرة يعد حالة خاصة جداً ويعد من المواد غير قابلة للتفكك أو الذوبان بالمواد والمعاملات اللاحيوية حيث أخفقت محاولات اذابته بالحوامض أو القواعد القوية أو المواد المؤكسدة أو المختزلة (دراسات غير منشورة)

والفطر المستعمل ينتج البروتييز الحامضي حيث أظهرت نتائج تنمية الفطر على اكار الحليب الارجواني كفاءة الفطر على تحليل الكازيين وذلك بظهور هالة التحلل حول مستعمرة الفطر النامي وتحول لون الوسط الارجواني الى الاصفر . بلغت نسبة التحلل بحساب قطر منطقة التحلل/قطر مستعمرة الفطر (1 : 1) . يعود تغير لون الوسط الاصفر الى انخفاض الرقم الهيدروجيني للوسط الى القيم الحامضية وذلك بفعل انتاج احماض عضوية من تخمر سكريات الحليب بفعل الفطر وهكذا يكون

هذا الوسط اكثر ملائمة لانتاج البروتييزات الحامضية ، وتغير اللون يعد مؤشراً أولياً لقابلية هذا الفطر على انتاج البروتييز الحامضي عندما يكون مترافقاً بظهور منطقة تحلل حول المستعمرات [15] وقد استخدم هذا الوسط من قبل العديد من الباحثين للكشف عن قابلية الفطريات لتحليل الكازيين [16 ، 17 ، 18] . أما تنمية الفطر على وسط الكازيين بقيم هيدروجينية مختلفة فكانت نسبة التحلل على هذا الوسط (1 : 1) وبالقيم الهيدروجينية المختلفة (4 ، 5 ، 6) مما يدل على كفاءة الفطر في انتاج البروتييز الحامضي .

أظهرت نتائج تنمية الفطر على اكار الكلوتين ومقارنتها بوسط المالت النموذجي لنمو الفطريات وبارقام هيدروجينية مختلفة قدرة الفطر على النمو على وسط اكار الكلوتين بنفس كفاءة نموه على وسط المالت وبالقيم الهيدروجينية (4 ، 5، 6) جدول (1) .

جدول (1) نمو الفطر (أقطار المستعمرات) *T. harzianum* على وسط اكار الكلوتين والمالت بقيم هيدروجينية مختلفة ودرجة حرارة (30) م لمدة 5 أيام .

فترة الحضانة / الدالة الحامضية	أقطار المســـتعمرات (ســم)									
	اليوم الأول		اليوم الثاني		اليوم الثالث		اليوم الرابع		اليوم الخامس	
	G*	M**	G	M	G	M	G	M	G	M
4	2.3	1.5	4.8	4.1	8.2	7.8	9.0	8.8	-	9.0
5	2.2	2.5	5.1	5.5	8.7	9.0	9.0	-	-	-
6	2.7	1.7	7.5	7.5	8.5	7.2	9.0	-	-	-

* وسط اكار الكلوتين

** وسط اكار مستخلص المالت

- امتلاء الطبق باكمله بالفطر (قطر الطبق 9 سم)

كما أظهر الفطر قابلية عالية على انتاج الابواغ مقارنة بوسط المالت ، مما يدل على كفاءة وسط كلوتين الذرة على توفير المتطلبات الغذائية له . يعود السبب في ملائمة وسط اكار الكلوتين لنمو الفطر لاحتواءه على نسبة عالية من البروتين (42%) ونتروجين كلي يقدر بقيمة (8.3%) ونسبة قليلة جداً من النتروجين الاميني وانخفاض نسبة الكربوهيدرات أو انعدامها كلياً ولكنه يحوي على العناصر الضرورية للنمو [4 ، 5] .

أظهرت نتائج تنمية الفطر على وسط الكلوتين المرطب بمحلول الفوسفات الداريء وبرقم هيدروجيني (5) ونسبة ترطيب (2 : 1) حجم : وزن واستخلاص الانزيم كفاءة الفطر في انتاج البروتيز الحامضي على هذا الوسط . جدول (2) يوضح الفعالية الانزيمية والنوعية والانتاجية للبروتييز المنتج من قبل الفطر .

جدول (2) الفعالية الانزيمية والنوعية والانتاجية للبروتييز المنتج على وسط اكار الكلوتين المرطب

فعالية الانزيم (وحدة/مل)	الانتاجية (وحدة/غم)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)
151.41	908.46	258.69

- تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية وثبات الانزيم

أظهرت نتائج تنمية الفطر في وسط كلوتين الذرة بقيم هيدروجينية مختلفة تراوحت بين (2-7) وقياس فعالية انزيم البروتييز الخام شكل (1-A) ان المدى الامثل لفعالية الانزيم كانت بين (4-6) واعلى فعالية للانزيم في الدالة الحامضية (6) وبلغت (135.58) وحدة /مل وبانتاجية تعادل (813.46) وحدة/غم أما ادنى فعالية انزيمية فكانت في الرقم الهيدروجيني (7) وبقيمة (107.63) وحدة/مل وانتاجية (645.78) وحدة/غم كلوتين . لذلك يمكن اعتبار الانزيم المستخلص من البروتييزات الحامضية بغياب المواصفات الاخرى [19 ، 20] . أما ثبات الانزيم بالقيم الهيدروجينية المختلفة فشهدت الفعالية استقراراً نسبياً في القيم الهيدروجينية (2-5) ثم ازدادت في القيمة الهيدروجينية (7) كذلك الحال في انتاجية هذا الفطر للانزيم شكل (1-B) مما يدل على ان ثباتية الانزيم لهذا الفطر تزداد بزيادة الدالة الحامضية حتى بلغ اعلاها في الدالة (7) ، وقد لاحظ عدد من الباحثين ان القيم الهيدروجينية المثلى لثبات البروتييزات الحامضية تراوحت بين (2-6) [21 ، 22] .

- تعيين الظروف المثلى لانتاج البروتييز الحامضي

1- الدالة الحامضية المثلى : من المعروف ان لغالبية الفطريات القابلية على النمو في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني (2-8) ولكنها تفضل الوسط الحامضي [23] . يوضح شكل (2-A) تأثير الرقم الهيدروجيني في انتاجية الفطر لانزيم البروتييز اذ حصلت زيادة في قيمة الانتاجية بزيادة الرقم الهيدروجيني الى ان بلغت اعلاها في القيمة (6) اذ بلغت (1128.46) وحدة/غم كلوتين ومن ثم حدث انخفاض حاد بلغ (50%) من قيمة الانتاجية في الرقم الهيدروجيني (7) حيث بلغت (713.65) وحدة/غم وهذا يشابه نتائج تأثير الرقم الهيدروجيني اذ بلغت (6) في فطريات اخرى [18] .

2- درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم : يتأثر انتاج الانزيم بمدى تغير درجة الحرارة فقد أظهرت نتائج تنمية الفطر بدرجات حرارية مختلفة تراوحت بين (25-35) م شكل (2-B) عدم اختلاف الانتاجية بزيادة درجات الحرارة وبلغت بدرجة 35 م قيمة (1143.84) وحدة/غم كلوتين . لقد توافقت درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم هذه مع نتائج دراسات اخرى تناولت انتاج البروتييزات من انواع جنس *Aspergillus* اذ تراوحت درجات الحرارة المثلى لانتاج هذه البروتييزات بين (28-32) م وقد أوضحت هذه الدراسات ان أي تغير في درجات الحرارة عن الحدود المذكورة اعلاه يؤدي الى خفض فعالية الانزيم [24 ، 25] .

3- محلول الترطيب الأمثل لانتاج الانزيم : أظهرت نتائج ترطيب الكلوتين بمحاليل ترطيب مختلفة وبنسبة (2 : 1)حجم:وزن شكل (2-C) بأن لمحلول الترطيب تأثيراً كبيراً في انتاجية الانزيم اذ أظهر الفطر أعلى انتاجية بوجود محلول الفوسفات الداريء وبقيمة (950.19) وحدة/غم وأقل انتاجية كانت بوجود محلول الترطيب الماء المقطر (846.53) وحدة/غم . مما يدل على أهمية املاح الفوسفات التي تعمل كدواريء مفيدة للسيطرة على تغيرات الرقم الهيدروجيني أي لها القابلية في المحافظة عليه وأهم وظيفة لاملاح الفوسفات هي اشتراكها في تحولات الطاقة وانتاج ATP التي تستعمل في تخليق البروتينات .

4- محلول الاستخلاص الامثل : أظهرت نتائج استخلاص الانزيم بمحاليل استخلاص مختلفة وبقيم هيدروجينية (5-5.5) شكل (2-D) تباينا في الفعالية

النوعية للانزيم باختلاف محاليل الاستخلاص ، اذ أظهر الانزيم المستخلص أعلى فعالية نوعية بمحلول الخلات الداريء (359.97) وحدة/غم رقم هيدروجيني (5) ، وانخفضت الفعالية نسبياً في محاليل الاستخلاص الفوسفات والماء المقطر والسترات . وهذا ما يتوافق مع نتائج اخرى [17] كما في استخلاص البروتييز القاعدي من الفطر *A. oryzae* . وقد استخدم الماء المقطر في استخلاص الانزيمات من فطريات مختلفة في دراسات عديدة [25، 26] . كما استخدم محلول الفوسفات الداريء كذلك من قبل عدد من الباحثين [18 ، 27] . ويعود سبب اختلاف كفاءة المحاليل في استخلاص الانزيمات من تخمرات المواد الصلبة الى اختلاف المحاليل في قدرتها على اذابة الانزيمات وفصلها من مكونات الوسط غير الذائبة بسبب القوة الايونية للمحاليل وتركيزها فضلاً عن اختلاف صفات الانزيمات ذاتها كنقاط تعادلها الكهربائي وثباتها تجاه القيم الهيدروجينية وغيرها .

5- نسبة الترطيب المثلى لانتاج البروتييز : ان رطوبة المواد الصلبة يجب ان لاتقل عن (12-15%) باعتبارها الحد الادنى الذي يؤدي الى توقف الفعاليات الحيوية للاحياء المجهرية [28] . اما الحدود العليا للرطوبة فتعتمد على قابلية المواد الاولية في امتصاص الماء والمحاليل المرطبة التي تعتمد بدورها على حجم دقائق المواد الاولية ودرجة مساميتها ولذلك كانت نسبة الترطيب (2:1) حجم:وزن ملائمة جداً حيث أظهرت نتائج ترطيب الكلوتين بمحلول الفوسفات الداريء برقم هيدروجيني (5) تقارب في الانتاجية باختلاف نسبة الترطيب اذ بلغت الانتاجية اعلاها في نسبة ترطيب (2 : 1) وهي (908.30) وحدة/غم ، وفي نسبة ترطيب (1 : 1) قلت الانتاجية بشكل طفيف حيث بلغت (817.30) وحدة/غم شكل (2-E) . اما استعمال نسبة ترطيب أعلى من (2 : 1) فقد أدى الى بقاء قسم من المحلول دون امتصاص مما يؤدي الى ظهور الطور السائل في المحلول لذلك استبعدت نسبة الترطيب الاعلى من (2 : 1) نظراً لقابلية الكلوتين الواطئة نوعاً ما في امتصاص الماء مقارنة باوساط التخمر الاخرى مثل النخالة . ان حدود الترطيب يجب ان تكون متلائمة مع قابلية الامتصاص فبقاء الماء أو المحلول المرطب بين المسافات البينية سيزيح الهواء فيما يؤثر سلباً في نمو الفطر وانتاج الانزيمات الخارجية [29] .

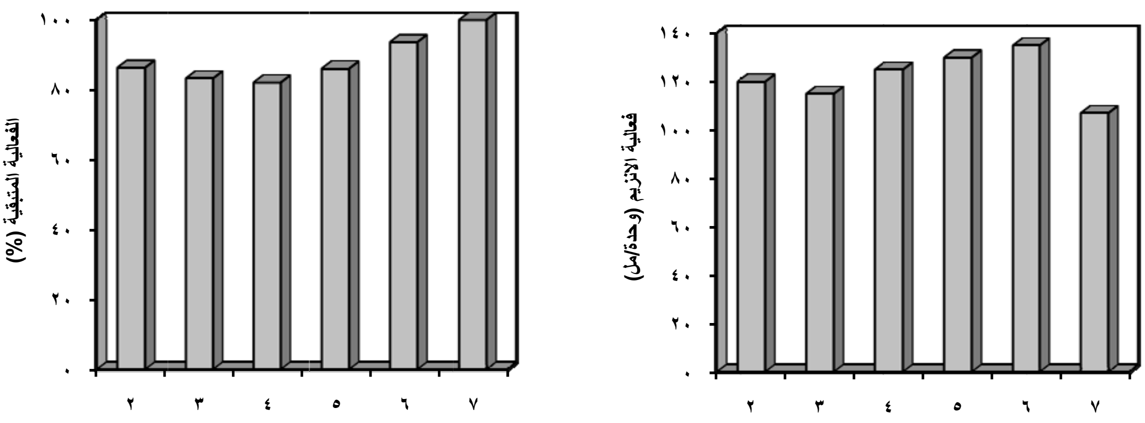
وقد تباينت نسبة الترطيب المثلى لانتاج انزيمات البروتييز في الدراسات المختلفة [17 ، 18 ، 30] وذلك لاختلاف الاوساط والسلالات والظروف المستخدمة .

6- حجم اللقاح الامثل لانتاج الانزيم : أظهرت النتائج شكل (2-F) تبايناً في الانتاجية اذ اظهرت أعلى انتاجية عند استعمال مستوى لقاح (10^7) بوغ/غم وزن الكلوتين وبقيمة (1050.57) وحدة/غم كلوتين . تتفق هذه النتائج مع العديد من الباحثين في مثل هذه الدراسات [17 ، 18] .

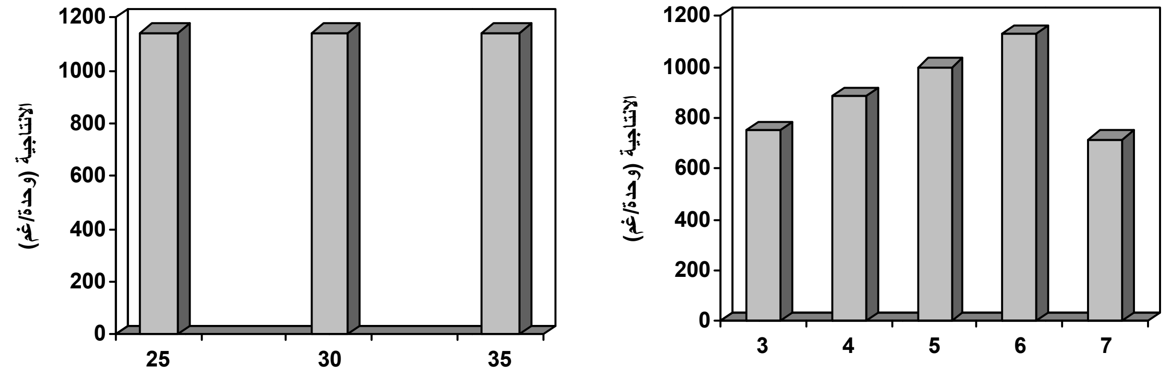
7- مدة الحضانة المثلى لانتاج الانزيم : يوضح الشكل (2-G) تأثير مدة الحضانة في انتاج الانزيم حيث أظهر أعلى انتاجية في اليوم الرابع من الحضانة بقيمة (933.07) وحدة/غم كلوتين وانخفضت بعد ذلك تدريجياً ابتداءاً من اليوم الخامس وحتى نهاية مدة الحضانة . ان الانخفاض الحاصل قد يعود الى تأثير الانزيمات نفسها بفعل الهضم بالبروتييزات الاخرى وكذلك التأثر بالنواتج العرضية التي تكثر في البيئات الموضعية التي تنشأ حول الخلايا والتي تتفاقم مشكلتها في حالة تخمرات المواد الصلبة باعتبارها أنظمة مفيدة نوعاً ما [17 ،

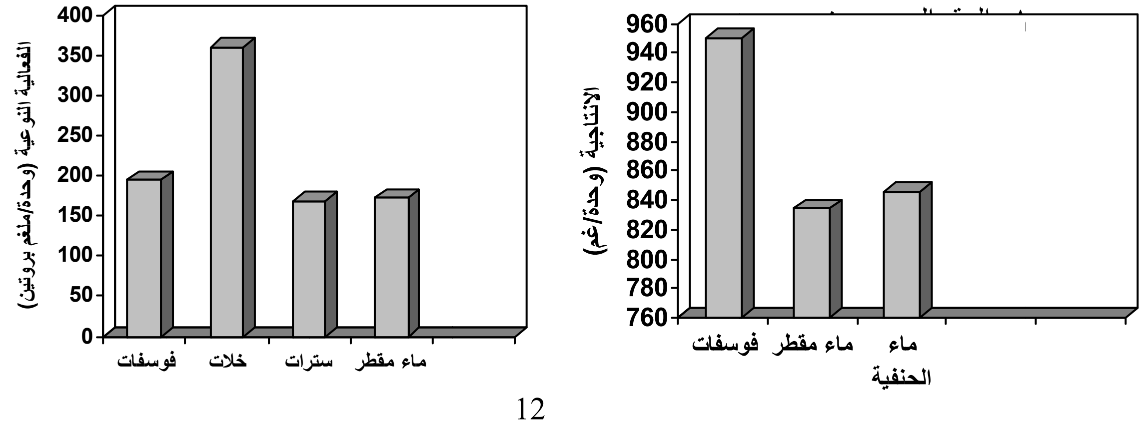
28] . تتفق هذه الدراسة مع عدد من الدراسات التي أشارت بان المدة المثلى لانتاج الانزيمات باسلوب تخمرات المواد الصلبة تراوحت بين (2-7) أيام [31 ، 32] ويعتمد ذلك على نوع الكائن المستخدم والوسط وظروف التنمية .

مما تقدم يتضح من نتائج هذه الدراسة قابلية فطر *T. harzianum* العالية للنمو في مادة كلوتين الذرة (الجزء غير الذائب) وهي احدى المخلفات النباتية المحلية غير المستغلة بالشكل الامثل ولاول مرة لذا يوصى باستغلالها لعمل أوساط زرعية لتنمية الفطريات فضلاً عن امكانية استخدامها كأوساط تخمرات صلبة لانتاج البروتييزات . كما ان الفطر *T. harzianum* أظهر كفاءة في انتاج البروتييز الحامضي والذي يحتمل ان يعود الى مجموعة البروتييزات السستينية أو الثايولية اعتماداً على الدالة الحامضية التي تنشط في القيم الحامضية القريبة من التعادل.



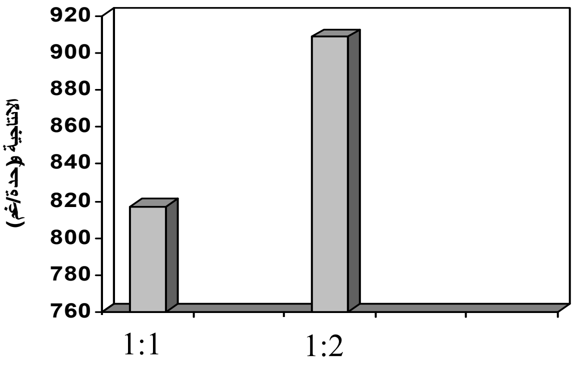
شكل (1) تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية (A)، وثبات الانزيم(B) بدرجة حرارة (30)م



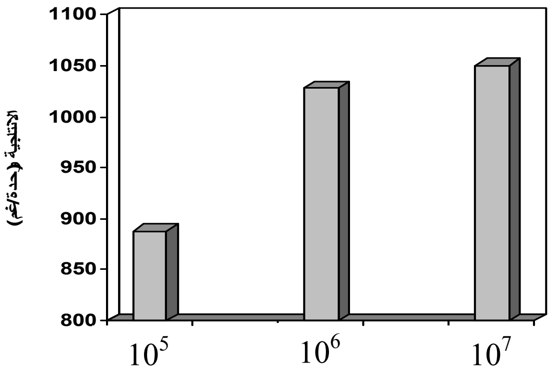


C- محاليل الترطيب

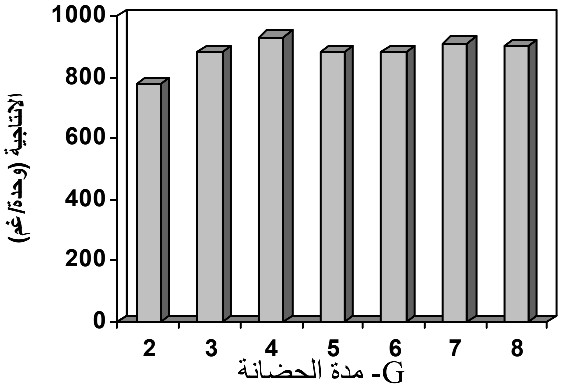
D- محاليل الاستخلاص



E- نسب الترطيب



F- حجم اللقاح



G- مدة الحضانة

شكل (2) تعيين الظروف المثلى لانتاج البروتييز الحامضي

المصادر

1. Trevan, M.D.; Boffey, S.; Goulding, K.H. and Stanbury, P. (1995). Biotechnology: The biological principles. McGraw Hill Pub.Co.Ltd, New Delhi.
2. Dunill, P. (1980). The current status of enzymes technology, In: "Enzymatic and Nonenzymatic Catalysis" P. Dunill,; A. Wiseman, and N. Blakerough, (Eds.) . Hartwood Arnold. England.
3. Böing, J.T.P. (1982). Enzyme production. In: "Prescott and Dunn's Industrial Microbiology. G. Reed, (Ed.) . AVI Publ. Company Inc. West Port, C.T. USA. PP 634-708.
4. الخفاجي، زهرة محمود؛ القاضي، مها طارق؛ عبد الحميد ، ريم فالح والحكاك ، ثريا صادق (2002a). تحضير اوساط زرعية لتنمية وعزل

بكتريا حلمض اللاكتيك . المؤتمر العلمي الثامن للتعليم التقني .

5. الخفاجي، زهرة محمود ; ابراهيم، ثريا خليل; القاضي، مها طارق وعبد الحميد ، ريم فالح (2002b) . استعمال مخلفات صناعة نشأ الذرة لتنمية الفطريات . المؤتمر العلمي الثامن للتعليم المهني .

6. محمد، لينا جاسم (2002) . امكانية استغلال كلوتين الذرة كوسط ملائم لتنمية الفطريات وانتاج انزيم البروتييز الحامضي . رسالة ماجستير . جامعة بغداد ، كلية التربية ابن الهيثم .

7. BBL Manual of Products and Laboratory Producers. (1973). Division of Becton. Dickinson Co. Maryland .

8. Ustyuzhanina, S.V.; Yaroveukom, V.L. and Voinarskii, I.N. (1985). Synthesis of protease and alpha-amylase by washed cells of the fungus *Aspergillus oryzae*. Appl. Biochem. Microbiol. 22: 55-58.

9. Bhumiratana, A.; Flegel, T.W.; Glinsukon, T. and Somporan, W. (1980). Isolation and analysis of mold from soy sauce koji in Thailand. Appl. Environ. Microbiol., 39 : 430-435 .

10. Bottaro-Castilla, H.R.; Waechaer, R.S.; Meinardi, C.A.; Zalazar, C.A. and Fraile, E.R. (1982) . Production of acid proteinase concentrate from *Mucor bacilliformis*. Revista Argentina de Microbioo., 14(2): 115-118[DSA (1984) 46(12)958] .

11. Murachi, T. (1970). Bromelain enzymes. In: "Methods in Enzymology". Perlman, G. and Lorand, L. (Eds.). Academic Press. New York. Vol.19: 273-284.

12. Whitaker, J.R. and Granum, P.E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. J. Anal. Biochem, 109 : 156-159 .

13. Aidoo, K.E.; Hendry, R. and Wood, J.B. (1982). Solid state fermentation. In: Advance Appl. Microbiol., 28 : 201-237 .

14. Mudgett, R.E.; Nash, J. and Rufiner, R. (1982). Controlled Gas Environments in solid substrate fermentations. In: "Developments in industrial microbiology". Proceeding. of the 38th General Meeting of Society for Industrial Microbiology. Arlington, Virginia. Pp. 393-405.

15. Bergkvist, R. (1963). The proteolytic enzymes of *Aspergillus oryzae*. Methods for the estimation and isolation of the proteolytic enzymes . Acta . Chem. Scand. 17 : 1521-1540 .

16. Al-Taii, W.F.; Tagi, N.K.; Al-Nakkashe, Sh.M. and Al-Ogaidi, H.A. (1988). Screening of fungal strains for protease production. J. Agric. Water Res., 7 : 11-24 .

17. حسن، شذى سلمان (1996) . انتاج وتنقية وتوصيف البروتييز القاعدي من العفن *Aspergillus oryzae* A1 بطريقة تخمر المواد الصلبة . اطروحة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة بغداد . 200 صفحة .

18. محي الدين، محمد عمر (1998) . تنقية وتوصيف انزيم البروتييز الحامضي –بديل المنفحة المنتج من العفن *Rhizomucor mienei MO-46* بطريقة تخمرات الحالة الصلبة . اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد . 171 صفحة.

19. Aunstrup, K. n (1980) . Proteinases. In : "Microbial Enzymes and Bioconversions . Rose, A.H. (Ed.). Academic Press . New York, pp 49-114 .

20. North, M.J. (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. Microbiol. Rev., 46 : 308-340 .

21. Matsubara, H. and Feder, J. (1971) . Other Bacterial , Mold and Yeast Proteases . In: "The Enzymes. Boyers, P.D. (Ed.). Academic Press Inc . New York. Vol. 3 : 721-730 .

22. Borriss, R. (1987). Biology of Enzymes. In: Biotechnology. Rhem, J.H. and Reed, G. (Eds.). VCH Deer field Beach. Vo. 7a: 35-56.

23. Freizer, W.C. (1967). Food Microbiology Mcgrow Hill Book Co., New York .

24. Sharma, O.P. and Sharma, K.D. (1980). Studies on in vitro production of proteolytic enzymes leather deteriorating fungi Revue Romaine De Biochimie., 17 : 209-215 .

25. Malathi, S. and Chakroborty, R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolates under solid state fermentation conductions for uses of depilation agents. Appl. Environ.Microbiol., 55 : 712-716 .

26. Berovic, M. and Logan-Derencin, M. (1993). Solid state fermentation of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*. J. Chem. Tech. Biotecnolog., 58 : 209-211 .

27. Impoolsup, A.; Bhumiratana, A. and Flegel, T.W. (1981). Isolation of alkaline and neutral proteases from *Aspergillus flavus var. Columnaris* , a soy sauce koji mold . Appl.Environ.Microbiol., 42 : 619-628 .

28. Smith, J. (1985). Principles of Biotechnology. Cambridge University Press. London .

29. Narahara, H.; Koyama, Y. and Yoshida, T. (1984) . Control of water content in solid state culture of *Aspergillus oryzae* .J.Ferm.Technol., 62 : 435-439 .

30. Bottaro-Castilla, H.R.; Waechaer, R.S.; Meinnard, C.A.; Zalazar, C.A. and Fraile, E.R. (1982). Production of acid proteinase concentrates from *Mucor bacilliformis*. Revista Argntina de Microbio., 14 : 115-118 [DSA (1984) 46(12)958] .

31. Battaglino, R.A.; Huergo, M.; Pilosof, M.R. and Bartholomai, G.B. (1991) . . Cultre requirements fpr the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation . Appl. Microbiol.Biotechnol., 35: 292-296 .

32- سعيد ، اكرم ثابت محمد (1996) . انتاج الاميليزات من الفطر *Aspergillus ornatus* group المتحمل للحرارة العالية بوساطة تخمرات الحالة الصلبة . اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد .