

## Production and Characterization of partial purified Protease from the fungal species *Trichoderma harzianum*

### إنتاج وتوصيف إنزيم البروتياز من الفطر *Trichoderma harzianum* وتنقيته جزئياً

م. بايولوجي أمير مزهر  
كلية العلوم – جامعة بابل

م. زينه هادي عبید  
كلية العلوم – جامعة بابل

أ.م. د. محمد عبد الله جبر  
كلية العلوم – جامعة بابل

#### الخلاصة

أجريت دراسة مختبرية لإنتاج وتنقية إنزيم البروتياز بصورة جزئية من الفطر *Trichoderma harzianum* المعزول من تربة محلية في محافظة بابل فبعد الكشف عن إنتاج الفطر لهذا الإنزيم وذلك من خلال قياس قطر منطقة التحلل في وسط ال Skim milk والتي بلغت 7 سم ، تم دراسة الظروف المثلى للإنتاج في وسط تخمر معدني سائل حاوي على نخالة الحنطة كمصدر للبروتين ، بينت النتائج إن الظروف المثلى للإنتاج هي عند الحضان لمدة خمسة أيام في درجة حرارة 25 م° في وسط معدني سائل حاوي على نخالة الحنطة بتركيز 2 % وبرقم هيدروجيني 4 . نقي الإنزيم بعدة خطوات شملت الترسيب بكميات الأمونيوم بنسبة إشباع 80 % كخطوة أولى للتنقية وتم الحصول على عدد مرات تنقية 3.47 وبحصيلة إنزيمية 43 % . أعقبت خطوة الترسيب بكميات الأمونيوم خطوة التبادل الأيوني باستعمال المبادل الأيوني ( DEAE- Cellulose ) بوجود محلول داري ترس ( 0.05 مولر وبرقم هيدروجيني 9 ) . وقد أعطت هذه الطريقة عدد مرات تنقية 25 وبحصيلة إنزيمية 25 % لصورة الإنزيم A وبلغت الفعالية النوعية فيها 225 وحدة / ملغم بروتين أما بالنسبة لصورة الإنزيم B فقد بلغت الفعالية النوعية فيها 375 وحدة / ملغم بروتين بعدد مرات تنقية 41.6 وبحصيلة إنزيمية 20.8 % . إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتياز المنقى جزئياً باستعمال المبادل الأيوني لصورتى الإنزيم A و B هما 9 و 5 على التوالي في حين إن درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم المنقى جزئياً هي 35 م°.

#### Abstract

Laboratory experiment was achieved for production and partial purification of protease from the fungal species *Trichoderma harzianum*. After screening of enzyme productivity by calculating the radial of hemolysis zone in Skimmed milk was 7 cm. The optimal conditions for protease production were studied using liquid state fermentation composed of wheat bran as protein source. The results revealed the optimal conditions of enzyme production after five days of incubation at 25 C in liquid mineral medium with 2% concentration of wheat bran and pH 4.0. The protease was purified by several steps, including precipitation with 80 % saturation of ammonium sulphate as the first step of purification, the obtained purification fold was 3.47 and recovery 43%. Second step of partial purification which was ion exchange chromatography using DEAE- Cellulose in the presence of Tris buffer ( 0.05 Molar and pH 9 ). The obtained purification fold 25 and recovery 25% for A image which have specific activity 225 unit/ mg protein. The B image step obtained specific activity 375 unit/ mg protein , purification fold 41.6 and recovery 20.8 % . The optimum pH of activity for partially purified enzyme with ion exchange chromatography for both A and B image was 9 and 5 respectively and the optimum temperature was 35 C for both steps.

#### المقدمة

تعد البروتيازات من الإنزيمات التي تلعب دوراً مهماً لنمو وتكاثر الأحياء المجهرية ، وينتمي إنزيم البروتياز إلى إنزيمات التحلل المائي Hydrolysis ( EC 3.4. 23 ) والذي يعمل على تحلل الأصرة الببتيدية ( 1 ، 2 ) ، وتحلل البروتيازات مواقع الصدارة بين الإنزيمات ذات الأهمية الصناعية وخصوصاً في الصناعات الغذائية والمجالات الطبية . ينتج هذا الإنزيم بشكل واسع في جميع الكائنات الحية مثل النباتات والحيوانات والأحياء المجهرية وقد توجه الاهتمام إلى إنزيمات البروتيازات المنتجة من الأحياء المجهرية كبديل للإنزيمات الحيوانية والنباتية نظراً لسهولة تنمية هذه الأحياء والتعامل معها ، وإمكانية السيطرة على ظروف الإنتاج وقصر مدته مقارنة بالمصادر الأخرى، إذ تمثل مبيعات البروتيازات الميكروبية حوالي 40% من مبيعات الإنزيمات في العالم ( 3 ) . تنتج الفطريات أنواع مختلفة من البروتيازات الحامضية والقاعدية والمتعادلة وكانت لأنواع جنس *Aspergillus* أهمية في إنتاج إنزيمات البروتيازات المتنوعة المستعملة بصورة واسعة في النطاق الصناعي لما يتميز به من وفرة الإنتاج وإمكانية تنميتها في أوساط مختلفة سائلة كانت أم صلبة، كما وتشير الدراسات إلى أن هذا الإنزيم يعد أحد الإنزيمات المشاركة في السيطرة البايولوجية المنتجة من الفطر *Trichoderma harzianum* ضمن آلية التطفل ( 4 ، 5 ) . هدفت الدراسة

الحالية إلى الحصول على عزلة محلية تعود للفطر *Trichoderma harzianum* ذات كفاءة على إنتاج إنزيم البروتياز وتحديد الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم وتنقيته جزئياً باستعمال تخمرات الحالة السائلة.

### المواد وطرائق العمل:

#### الأوساط المستعملة

#### وسط Potato Dextrose Agar

ويتكون هذا الوسط من:

1. مستخلص البطاطا (200 غم / لتر ماء مقطر) .
2. دكستروز (20 غم/ لتر) .
3. أكار (20 غم/ لتر) .
4. ماء مقطر (1000 مل) (6) .

#### وسط أكار الحليب Skim milk Agar

حضر بإذابة 1 غم من حليب الفرز (Skim Milk) في 10 مل من الماء المقطر، كما ذوب 2 غم من الأكار في 90 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 6، عقم المحلولان كلاً على حده ومزجاً بعده تبريدهما إلى درجة حرارة 45م وصب الوسط في أطباق بتري معقمة (7) .

#### وسط إنتاج إنزيم البروتياز

حضر الوسط وفق طريقة De Marco و Felix (8) ويتكون من 0.3 غم/لتر كبريتات المغنسيوم المائية  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  و 2 غم/لتر فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين  $KH_2PO_4$  و 0.3 غم/لتر كلوريد الكالسيوم  $CaCl_2$  و 1.4 غم/لتر كبريتات الامونيوم  $(NH_4)_2SO_4$  و 0.3 غم/لتر يوريا و 1 غم/لتر protease peptone و 5 ملغم/لتر كبريتات الحديد المائية  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  و 1.6 ملغم/لتر كبريتات المنغنيز  $MnSO_4$  و 1.4 ملغم/لتر كبريتات الزنك  $ZnSO_4$  و 2 ملغم/لتر كلوريد الكوبلت  $CoCl_2$  و 0.2 غم/لتر كلوكوز ويجهز الوسط بمصدر بروتيني وهو نخالة الحنطة بنسبة 1% .  
عقمت جميع الأوساط بدرجة حرارة 121 م وضغط 1.5 بار لمدة 15 دقيقة، باستثناء الوسط الذي يحوي على حليب الفرز فقد تم تعقيم محلول الـ Skim milk لمدة 5 دقائق ثم أضيف إلى بقية مكونات الوسط المعقمة في الظروف السابقة نفسها، كما أضيف المضاد الحيوي الـ Chloramphenicol إلى الأوساط بنسبة 0.25 غم/لتر لغرض منع نمو البكتريا.

#### المحاليل

1. محلول خلاص الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولار وأرقام هيدروجينية (4, 5) ويتكون من محلول خلاص الصوديوم بتركيز 0.2 مولار وحامض الخليك بتركيز 0.2 مولار (9) .
2. محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 0.2 مولار بأرقام هيدروجينية (6, 7, 8) ويتكون من محلول فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين  $KH_2PO_4$  بتركيز 0.2 مولار وفوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين  $K_2HPO_4$  بتركيز 0.2 مولار (9) .
3. محلول دارئ ترس (Tris- base - NaOH) بأرقام هيدروجينية (9 و 10 و 11 و 12) حضر بإذابة غم من الترس (Tris- base) في كمية من الماء المقطر وبعد التعديل الـ pH إلى القيمة المطلوبة أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر. (10)
4. محلول ثلاثي كلور حامض الخليك بتركيز 5% حضر بإذابة 5 غم من ثلاثي كلور حامض الخليك في حجم معين من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.
5. محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.05 مولر وحضر بإذابة 0.2 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية معينة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.
6. محلول الكازانين بتركيز 1% بأرقام هيدروجينية (6 و 7 و 8 و 9 و 10 و 11 و 12) حضر بإذابة 1 غم كازانين في كمية من المحلول الدارئ برقم هيدروجيني معين مع التحريك باستعمال المحرك المغناطيسي ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالمحلول الدارئ نفسه (11) .
7. محلول الألبومين بتركيز 1% بأرقام هيدروجينية (4 و 5) حضر بإذابة 1 غم الألبومين في كمية من المحلول الدارئ برقم هيدروجيني معين ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالمحلول الدارئ نفسه (11) .
8. محلول كلوريد الصوديوم بتركيز 1 مولر حضر بإذابة 35.5 غم من كلوريد الصوديوم في كمية معينة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

طرائق العمل

عزل وتشخيص الفطر *Trichoderma harzianum*:

عزل الفطر من عينات تربة تعود لحديقة جامعة بابل بإذابة 1 غرام من عينة التربة في 10 مل من الماء المقطر المعقم ثم أجريت تخفيف عشرية لمحلول التربة وزرع 0.1 مل من التخفيف 3-10 على وسط الـ PDA بطريقة الصب، حضنت الأطباق لمدة خمسة أيام عند درجة حرارة 25 م° وبواقع ثلاثة مكررات وبعد انتهاء مدة الحضانة نقيت عذلة الفطر باستعمال وسط الـ PDA وجرى تشخيصها بالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرات والصفات المجهرية وتم الاستعانة بالمفاتيح التصنيفية لهذا الغرض (14,13,12).

الكشف عن إنتاج الفطر *T. harzianum* لإنزيم البروتيز

لحق وسط اكار الحليب Skim milk agar بقرص قطره 10 ملم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *T. harzianum* النامي على الوسط الغذائي PDA بعمر ثلاثة أيام وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 م° وبواقع ثلاثة مكررات، ويتم الكشف عن تحلل البروتين عند ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات (7).

تقدير فعالية إنزيم البروتيز:

قدرت الفعالية حسب الطريقة المتبعة من قبل Brock وجماعته (15) فقد أضيف 0.2 مل من محلول الأنزيم إلى 1.8 مل من محلول التفاعل (1% كازاين برقم هيدروجيني 5) وحضن في حمام مائي بدرجة حرارة 35 م° لمدة 20 دقيقة ثم أضيف 3 مل من محلول ثلاثي كلور حامض الخليك بتركيز 5% لإيقاف التفاعل. حضر محلول الكفاء بالطريقة نفسها ماعدا إضافة محلول ثلاثي كلور حامض الخليك الى محلول التفاعل قبل إضافة الإنزيم. ثم نبذت المحاليل بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة بعدها قيست الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر وقدرت وحدة الفعالية الإنزيمية بوحدة/مل. تعريف وحدة الفعالية: كمية الإنزيم التي تحرر 1 مايكرومولار من التايروسين في الدقيقة عند ظروف القياس (11).

$$\text{الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر} = \text{الفعالية الإنزيمية (وحدة/مل)}$$

$$0.2 * 20 * 0.01$$

0.01	: ثابت من تعريف وحدة الإنزيم
20	: وقت التفاعل (دقيقة)
0.2	: حجم الإنزيم (مل)

تقدير تركيز البروتين:

رسب البروتين من المستخلص الخام بإضافة 3 مل من محلول ثلاثي كلور حامض الخليك لكل 2 مل من المستخلص ثم نبذ بسرعة 5000 دورة/دقيقة وسكب المحلول الرائق وذوب الراسب في 2 مل من محلول 0.05 مولر هيدروكسيد الصوديوم قدر تركيز البروتين بالطريقة الواردة من قبل Whitaker و Granum (16) وذلك بقياس امتصاص الضوء للمحلول بطول موجي 280 و 235 نانوميتر واستخدم محلول 0.05 مولر هيدروكسيد الصوديوم محلولاً كفنناً وحسب تركيز البروتين من المعادلة الآتية:

امتصاص الضوء بطول موجي 235 نانوميتر - امتصاص الضوء بطول موجي 280 نانوميتر

$$= \text{تركيز البروتين ملغم / مل}$$

$$2.51$$

حسبت الفعالية النوعية specific activity كما يأتي:

$$\text{الفعالية الإنزيم (وحدة/ مل)}$$

$$= \text{الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين)}$$

$$\text{تركيز البروتين (ملغم/ مل)}$$

(11).

تعيين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز:

درس تأثير بعض العوامل وهي مدة الحضانة والمصدر البروتيني والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتيز للفطر *T. harzianum* النامي على الوسط المعدني السائل (وسط إنتاج الإنزيم) إذ ثبتت بقية العوامل باستثناء العامل المدروس

(11) ولقح وسط الإنتاج بأقراص مأخوذة من حافة مستعمرة الفطر *T. harzianum* النامي في الوسط PDA وبعمر ثلاثة أيام وبواقع ثلاثة أقراص قطر الواحد منها 5 ملم لكل 10 مل من وسط الإنتاج وقدرت الإنتاجية كما وصف سابقا .

### مدة الحضانة

اختبرت مدة الحضانة المثلى لإنتاج الإنزيم من الفطر *T. harzianum* والنامي في الوسط المعدني TLE الحاوي على نخالة الحنطة بنسبة 1% (w/v) كمصدر وحيد للبروتين. عدلت قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 5 باستعمال محلول خلات الصوديوم الدارئ ولقح وسط الإنتاج كما ورد سابقا وأجريت عملية القياس وقدرت الفعالية الإنزيمية كل 24 ساعة حتى نهاية مدة الحضانة كما وصف سابقا.

### الرقم الهيدروجيني

حضر وسط إنتاج الإنزيم الحاوي على نخالة الحنطة بنسبة 1% كمصدر وحيد للبروتين وأرقام هيدروجينية تراوحت ما بين 4-10 باستعمال محلول الفوسفات الدارئ بأرقام هيدروجينية 6 و7 و8 ومحلول خلات الصوديوم الدارئ بأرقام هيدروجينية 4 و5 ومحلول Tris - base بأرقام هيدروجينية 9 و10 ولقحت الأوساط بأقراص الفطر *T. harzianum* قطرها 5 ملم وبواقع ثلاثة أقراص لكل 10 مل من وسط TLE وحضنت المزارع بدرجة حرارة 25 م لمدة خمسة أيام وبواقع ثلاثة مكررات لكل رقم هيدروجيني، استخلص الراشح الخام للإنزيم وقدرت الفعالية.

### درجة الحرارة

لقح الوسط الخاص بإنتاج الإنزيم الحاوي على نخالة الحنطة بنسبة 1% وبرقم هيدروجيني 4 بأقراص الفطر *T. harzianum* قطرها 5 ملم وبواقع ثلاثة أقراص لكل 10 مل من وسط الإنتاج وحضنت المزارع بدرجات حرارية مختلفة 15 و20 و25 و30 و35 و40 م لمدة خمسة أيام ثم استخلص الراشح الإنزيمي الخام وقدرت الفعالية كما ورد سابقا.

### المصدر البروتيني

حضر وسط الإنتاج بنفس الطريقة السابقة باستثناء استعمال التراكيز (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3) % من المصدر البروتيني (نخالة الحنطة) ولقحت الأوساط بأقراص الفطر *T. harzianum* وحضنت المزارع الفطرية بدرجة حرارة 35 م واتبعت نفس الطريقة السابقة في القياس وقدرت الفعالية الإنزيمية.

### تعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم

قدرت فعالية الراشح الإنزيمي في قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني لركيزة الكازئين (1%) وذلك لمعرفة الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الراشح الإنزيمي إذ أضيف 1.8 مل من محلول الكازئين المعلق بمحاليل الدارئ التي تراوحت أرقامها الهيدروجينية ما بين 6-11 ومحلول الألبومين المعلق بمحاليل الدارئ بأرقام هيدروجينية 4 و5 إلى 0.2 مل من الراشح الإنزيمي الخام المأخوذ من مزرعة فطرية لإنتاج إنزيم البروتينيز برقم هيدروجيني 4 ودرجة حرارة 25 م، وضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 35 م لمدة 30 دقيقة بعدها تم إيقاف التفاعل وقدرت الفعالية الإنزيمية (11).

### تعيين درجة الحرارة المثلى في فعالية الإنزيم:

حضر 0.2 مل محلول الإنزيم و1.8 مل من محلول التفاعل (1% كازئين برقم هيدروجيني 9) بدرجات حرارية تراوحت ما بين 25-70 م لمدة 20 دقيقة ثم أوقف التفاعل وقدرت الفعالية (11).

### تنقية إنزيم البروتينيز

شملت خطوات التنقية على تركيز الإنزيم باستعمال كبريتات الأمونيوم والديلز وكروموتوغرافيا التبادل الأيوني وفيما يلي ملخص لخطوات التنقية

### الترسيب بكبريتات الأمونيوم

أضيفت أوزان معينة من بلورات كبريتات الأمونيوم تدريجيا إلى المستخلص الخام مع التحريك المستمر للحصول على نسبة إشباع تراوحت ما بين 80 إلى 20%، نبذ المحلول بعد كل إضافة بسرعة 6000 دورة/دقيقة بدرجة حرارة 4 م لمدة 30 دقيقة وفصل المحلول الرائق وأضيف له وزن آخر من كبريتات الأمونيوم للحصول على نسبة الإشباع التالية وقدرت الفعالية الإنزيمية والبروتين للرواسب لكل خطوة بعد إذابتها في حجم صغير من محلول دارئ ترس برقم هيدروجيني 9 (11).

### الديلز

أجريت عملية الديلز حيال محلول دارئ الترس (Tris- base) برقم هيدروجيني 9 خلال 24 ساعة وبعد انتهاء العملية تم تقدير الفعالية الإنزيمية فضلا عن تقدير البروتين (17).

### كروموتوغرافيا التبادل الأيوني باستعمال المبادل DEAE- Cellulose

حضر المبادل الأيوني (DEAE - Cellulose) حسب الطريقة المتبعة من قبل Whitaker و Bernhard (1972) إذ علق 20 غم من المبادل في لتر من الماء المقطر في اسطوانة مدرجة وترك ليبرد ثم سكب السائل العلوي وغسل المبادل عدة مرات بالماء المقطر إلى أن أصبح السائل العلوي رائقاً. رشح العالق على ورق ترشيح Whatman No. 1 في قمع بخنر تحت التفريغ ثم علق المبادل في 500 مل من 0.25 مولر محلول كلوريد الصوديوم و 0.25 مولر محلول هيدروكسيد الصوديوم، فصل المبادل بالترشيح أيضاً وغسل عدة مرات بالماء المقطر ثم غسل بمحلول 0.25 مولر حامض الهيدروكلوريك ثم بالماء المقطر قبل موازنته باستعمال محلول (0.05) مولر دارئ ترس- هيدروكسيد الصوديوم (pH 9) ، تمت تعبئة عمود المبادل لتصبح أبعاده (1.5 نصف قطره و 19.5 ارتفاعه) سم وتمت موازنته أيضاً باستعمال محلول (0.05) مولر دارئ ترس- هيدروكسيد الصوديوم (pH 9) .

أضيف 5 مل من المحلول البروتيني المركز والناتج من خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم بعد ديلزته إلى عمود المبادل الأيوني ، نظمت سرعة الجريان لتكون 30 مل / ساعة ، جمعت أجزاء الغسل بواقع 5 مل / جزء . استردت البروتينات المرتبطة بالعمود باستعمال تراكيز ملحية متدرجة من محلول 0-1 مولر كلوريد الصوديوم مع دارئ ترس – هيدروكسيد الصوديوم وتمت متابعة تركيز البروتين وفعالية الإنزيم في الأجزاء المنفصلة بقياس امتصاص الضوء عند طول موجي 280 نانوميتر ، جمعت أجزاء القمم التي أعطت أعلى تركيز للبروتين وأجري لها تقدير الفعالية. كما تم تعيين درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتياز المنقى جزئياً للقمم المجموعة لكل من الغسل و الاسترداد وكما وصف سابقاً (17) .

### النتائج والمناقشة

#### تشخيص الفطر *Trichoderma harzianum* :

ظهرت مستعمرات الفطر النامية في الوسط الغذائي Potato dextrose agar بدرجة حرارة 25م ذات لون أبيض في بداية نموها غير إنها تتحول إلى اخضر غامق بتقدم عمر المستعمرة ، الغزل الفطري مقسم والحوامل الكونيدية متفرعة عمودياً إما كونيدات الفطر فهي دائرية وذات لون أخضر محمولة على فياليديات وقد تطابق هذا الوصف مع ما ذكره (12,13,14) .

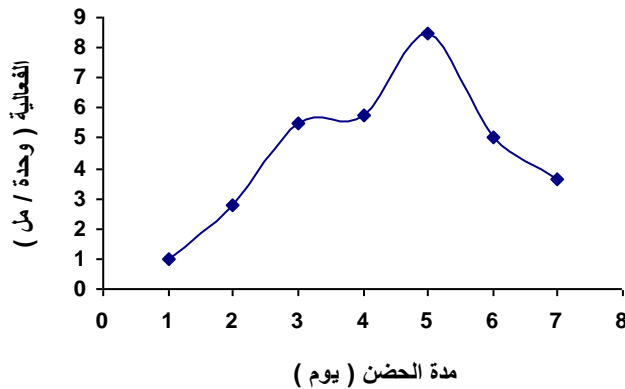
#### الكشف عن إنتاج إنزيم البروتياز

أظهرت نتيجة الكشف عن إنتاج إنزيم البروتياز ظهور هالة شفافة تماماً قطرها 7 سم حول مستعمرة الفطر *Trichoderma harzianum* النامية في وسط أكار الحليب Milk Agar بعد مرور ثلاثة أيام من الحضانة بدرجة حرارة 25 م دلالة على تحلل الكازئين نتيجة لإفراز الفطر لإنزيم البروتياز.

#### تعيين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتياز:

##### مدة الحضانة

أظهرت النتائج (شكل 1) بأن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان بعد اليوم الخامس من الحضانة في وسط الإنتاج برقم هيدروجيني 5 وفي درجة حرارة 25 م ثم أخذ مستواه بالانخفاض بزيادة مدة الحضانة. أن مستوى إنتاج الإنزيم يقل بزيادة مدة الحضانة نتيجة لعدة عوامل منها حصول تغيرات بيئية غير مرغوبة في وسط الإنتاج تؤثر في مستوى إنتاج الإنزيم وفعاليته فضلاً عن إمكانية حدوث تحلل ذاتي في خيوط الفطر نتيجة لتراكم مركبات الأيض الثانوي. ومنها أن إنزيم البروتياز يعد من الإنزيمات المستحثة لذا فإن معدل إنتاجه يقل أو يتوقف عند تجمع النواتج النهائية لعمل الإنزيم (19) .

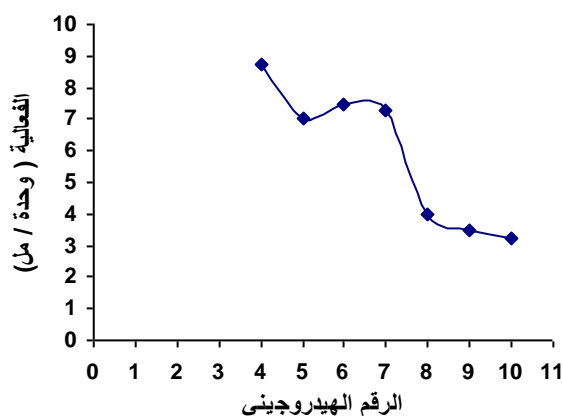


شكل (1) تأثير مدة الحضانة في إنتاج إنزيم البروتياز من الفطر *Trichoderma harzianum* برقم

هيدروجيني 5 وبدرجة حرارة 25م

### الرقم الهيدروجيني

يبين الشكل ( 2 ) أن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان عند الرقم الهيدروجيني 4 للوسط وانخفض مستوى الإنتاج بزيادة قيمة الرقم الهيدروجيني وخصوصاً عند القيمة 10 إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنها 3.25 وحدة / مل. يؤثر الرقم الهيدروجيني للوسط في نوبانية المواد المغذية للوسط وانتقالها وتأيئها وتركيز البيكاربونات التي تأتي من ذوبان ثاني أكسيد الكربون والذي يؤثر في السعة الدائرة للوسط والتي تنعكس على نمو العفن وإنتاجه للإنزيمات ( 20 ). في دراسة أخرى وجد بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل هو ( 6.5-7 ) لإنتاج أنزيم البروتياز من الفطر *A. niger* على وسط التخمر الصلب نخالة الحنطة ولمدة 48 ساعة حضانة ( 21 ) .

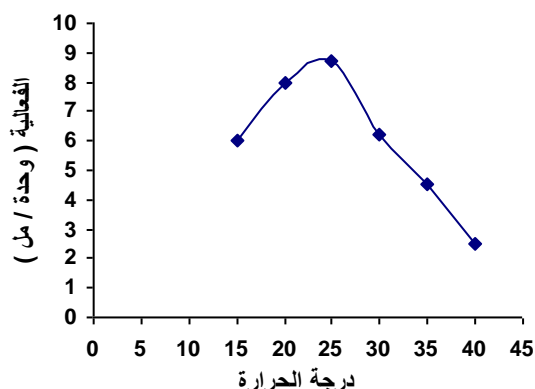


شكل (2) تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم البروتياز من الفطر *Trichoderma harzianum* بعد مدة

حضان خمسة أيام بدرجة حرارة 25 م°

### درجة الحرارة

بينت نتائج التجربة أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم هي 25 م° فقد بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 8.75 وحدة / مل تلتها درجة الحرارة 20 م° بينما ظهر أدنى مستوى لإنتاج الإنزيم عند درجة الحرارة 40 م° فقد بلغت الفعالية الإنزيمية عندها 2.5 وحدة / مل. وجد ( 22 ) أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج أنزيم البروتياز من الفطر *Trichophyton mentagrophyta* هي 32 م°. واستعمل (23) درجة الحرارة 28 م° في إنتاج إنزيم البروتياز من الفطر *T. harzianum* في أثناء تنميته في وسط حاوي على جدار خلية الفطر *Botrytis cinerea* كمصدر وحيد للكربون.



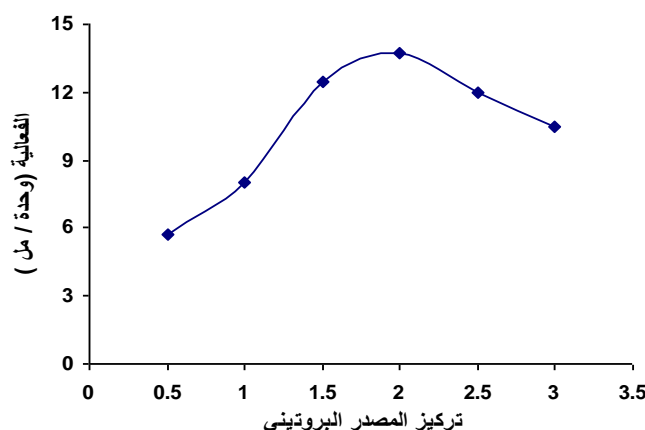
شكل (3) تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتياز من الفطر *Trichoderma harzianum* بعد مدة حضان

خمسة أيام برقم هيدروجيني 4

تؤثر درجة الحرارة في أكثر من عامل له علاقة بالنمو ونشاط الكائن الحي كرتوبة الوسط وكمية الأوكسجين الذائبة فيه والطاقة الحركية للجزيئات هذا فضلاً عن حموضة الوسط التي تتعكس على سرعة التفاعلات داخل الخلية وإنتاجها للمركبات الأيضية الأولية التي من أبرزها الإنزيمات ( 24 ، 25 ).

### تركيز المصدر البروتيني

بينت نتائج التجربة ( شكل 4 ) أن مستوى الإنتاج الإنزيمي قد أخذ بالازدياد مع زيادة تركيز المصدر البروتيني وصولاً إلى التركيز 2 % إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده 13.75 وحدة / مل ليأخذ بعدها مستوى الإنتاج بالانخفاض بزيادة التركيز المستعمل وصولاً إلى التركيز 3 % فقد بلغت الفعالية الإنزيمية عنده 10.5 وحدة / مل. أن انخفاض الفعالية الإنزيمية عند زيادة تراكيز المادة العضوية قد يفسر على أن الجينات المشفرة للإنزيمات اللازمة لاستهلاك النتروجين تنظم حسب آليات تحفيز متخصصة تخضع بدورها إلى آلية أخرى تعرف بالآلية كبح أيض النتروجين Nitrogen catabolite repression وتبعاً لهذه الآلية فإن الجينات تعبر بمستويات عالية عند حدود معينة للنتروجين أما عند النمو بوجود مصادر نتروجين جاهزة ومفضلة فإنه يؤدي إلى إعطاء إشارة لإيقاف التعبير الجيني لإنزيمات التحلل ( 26 ).



شكل ( 4 ) تأثير المصدر البروتيني في إنتاجية إنزيم البروتييز من الفطر *Trichoderma*

*harzianum* بعد مدة حضن خمسة أيام وبرقم هيدروجيني 4 ودرجة حرارة 25 م

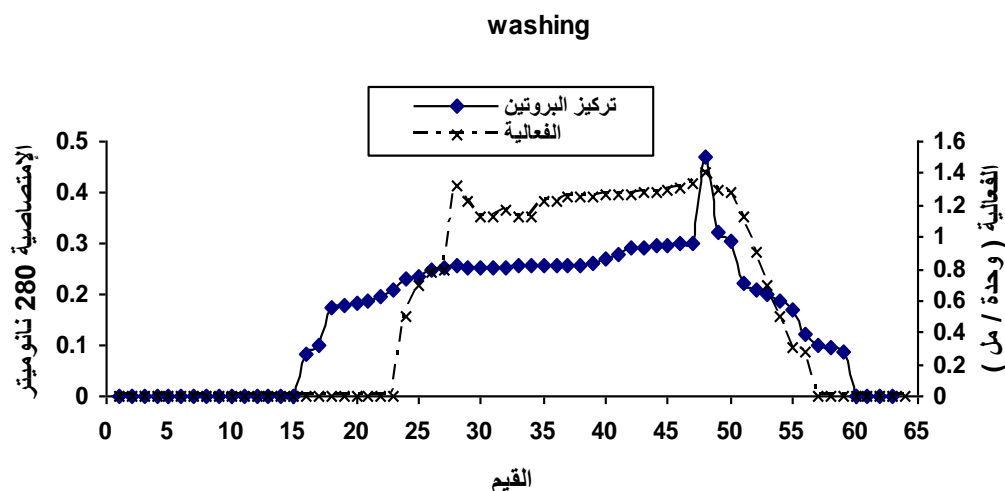
### تنقية الإنزيم

اتبعت عدة طرق لتنقية الإنزيم المستخلص من الخطوة السابقة شملت الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 80 % كخطوة أولى للتنقية وتم الحصول على عدد مرات تنقية 3.47 وبحصيلة إنزيمية 43 % ( جدول 1 ) . إن الترسيب بهذه الخطوة تم نتيجة معادلة الشحنة الموجودة على سطح البروتين بفعل الملح والإخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتين مما أدى إلى خفض ذائبية البروتين ومن ثم ترسيبه ( 27 ). أعقبت خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم خطوة التبادل الأيوني عن طريق إمرار المحلول الإنزيمي الناتج من الخطوة السابقة بعد ديلزته خلال عمود التبادل الأيوني باستعمال المبادل الأيوني ( DEAE- Cellulose ) بوجود محلول داري ترس- هيدروكسيد الصوديوم ( 0.05 مولر وبرقم هيدروجيني 9 ) . استعمل المبادل المذكور لما يتميز به من ميزات عدة جعلته من أكثر أنظمة الكروماتوغرافيا شيوفا في الاستعمال و من ضمن هذه المميزات القدرة العالية على الفصل والسعة العالية لاستيعاب البروتينات المرتبطة ووضوح وبساطة مبدأ الفصل والذي يعتمد بشكل أساسي على الاختلاف في الشحنة ( 28 ). تمخض عن عملية التبادل الأيوني ظهور قمة بروتينية واحدة للأجزاء غير المرتبطة بالعمود في مرحلة الغسل تركزت في الأجزاء المنفصلة ( 16 - 54 ) كما في الشكل ( 5 ) فضلاً عن ظهور قمتان في مرحلة الاسترداد ( الذي تم باستعمال المحلول المنظم ذاته وبوجود تدرج ملحي من كلوريد الصوديوم 0-1 مولاري ) تركزت في الأجزاء ( 3 - 41 ) كما مبين في الشكل ( 6 ) . وتقدير الفعالية الإنزيمية في القمم المذكورة لوحظ وجود قمة للفعالية الإنزيمية للبروتييز في الأجزاء ( 28 - 54 ) في مرحلة الغسل ( صورة A ) حيث بلغت الفعالية النوعية فيها 225 وحدة / ملغم بروتين بعدد مرات تنقية 25 وبحصيلة إنزيمية 25 % فضلاً عن قمتان للفعالية في مرحلة الاسترداد ( صورة B ) ( شكل 6 ) الأولى صغيرة واقعة في الأجزاء البروتينية ( 3 - 5 ) تم إهمالها والثانية كبيرة واقعة في الأجزاء ( 20 - 26 ) فقد بلغت الفعالية النوعية فيها 375 وحدة / ملغم بروتين بعدد مرات تنقية 41.6 وبحصيلة إنزيمية 20.8 % . إن ظهور قمم متعددة للفعالية قد يدل على وجود صور أخرى للإنزيم أو ربما إنزيمات بروتينييز أخرى , وقد لوحظت هذه الظاهرة في دراسات أخرى تناولت تنقية إنزيمات البروتييز من الفطر *Aspergillus oryzae* ( 11 ) إذ لوحظ وجود عدة قمم لفعالية إنزيمات البروتييز في أجزاء الغسل والاسترداد من المبادلات الأيونية الموجبة والسالبة بحصيلة إنزيمية 87.2 % وعدد مرات تنقية 2.6 للأجزاء الغير مرتبطة في مرحلة الغسل. كما ظهر من نتائج أخرى أجريت لإنزيم

البروتينيز المنتج من الفطر *T. viride* والنامي على وسط حاوي على مصادر مختلفة للبروتين وجود عدة قمم للفعالية الإنزيمية في مرحلة الاسترداد (29). لوحظ أن اللون الأخضر المتبقي في محلول الإنزيم بعد خطوة إزالة الملح قد ارتبط بالمبادل مما يكسب المبادل ميزة لها فائدة في التخلص من الألوان التي تتداخل مع قراءة البروتين فضلا عن كونها أمر غير مرغوب فيه وهذا ما أكده (11) بأنه تم التخلص من اللون الأصفر لمحلول الإنزيم بعد خطوة المبادل.

جدول رقم (1) يوضح خطوات تنقية إنزيم البروتينيز من الفطر *Trichoderma harzianum*

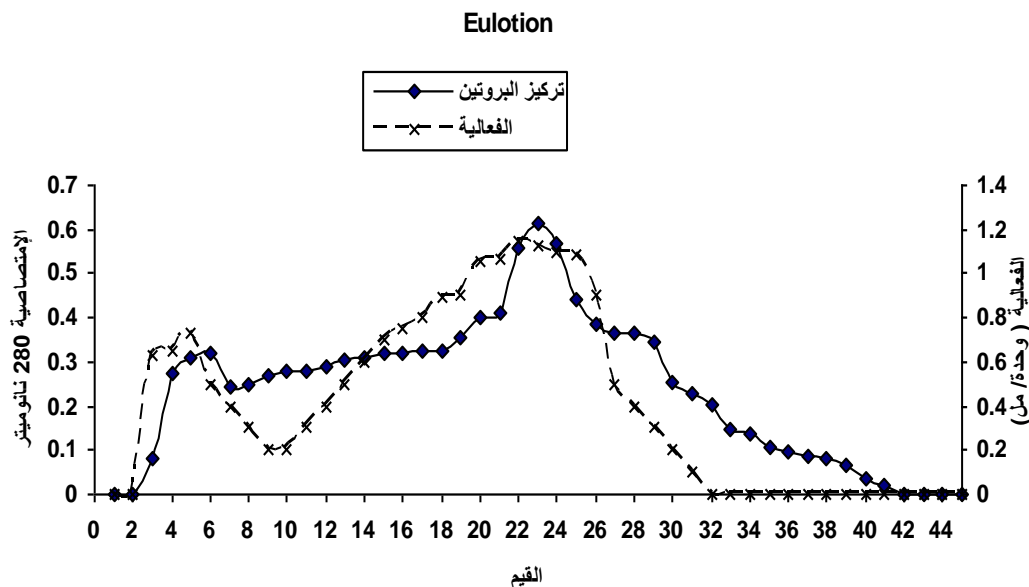
خطوات التنقية	الحجم (مل)	الفعالية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الإنزيمي الخام	80	0.9	0.1	9	72	1	100
بعد الترسيب والديليز	5	6.25	0.2	31.25	31.25	3.47	43
مرحلة الغسل بالمبادل	10	1.8	0.008	225	18	25	25
مرحلة الاسترداد بالمبادل	10	1.5	0.004	375	15	41.6	20.8



شكل (5) كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم البروتينيز من الفطر *Trichoderma harzianum* باستعمال

عمود ال DEAE- Cellulose (صورة A)

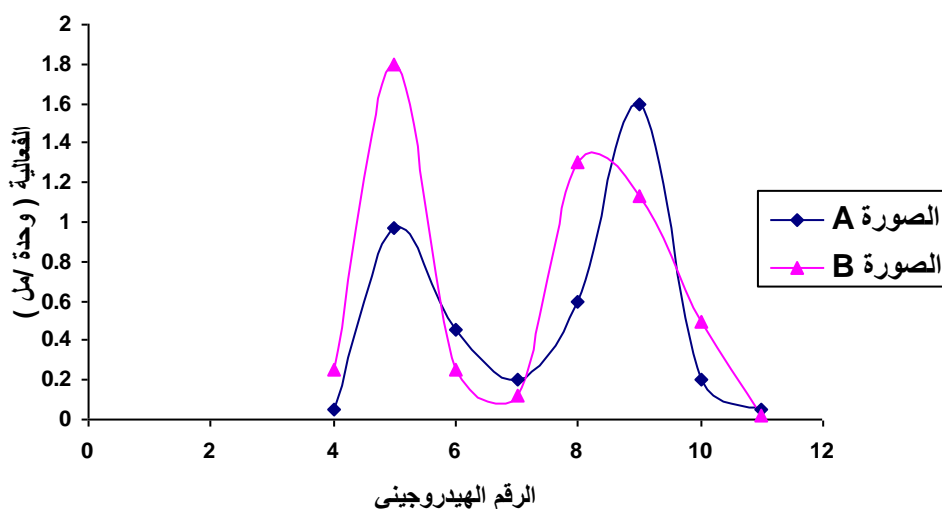




شكل (6) كروموتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم البروتيز من الفطر *Trichoderma harzianum* باستعمال المبادل DEAE- Cellulose (صورة B)

#### تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتيز

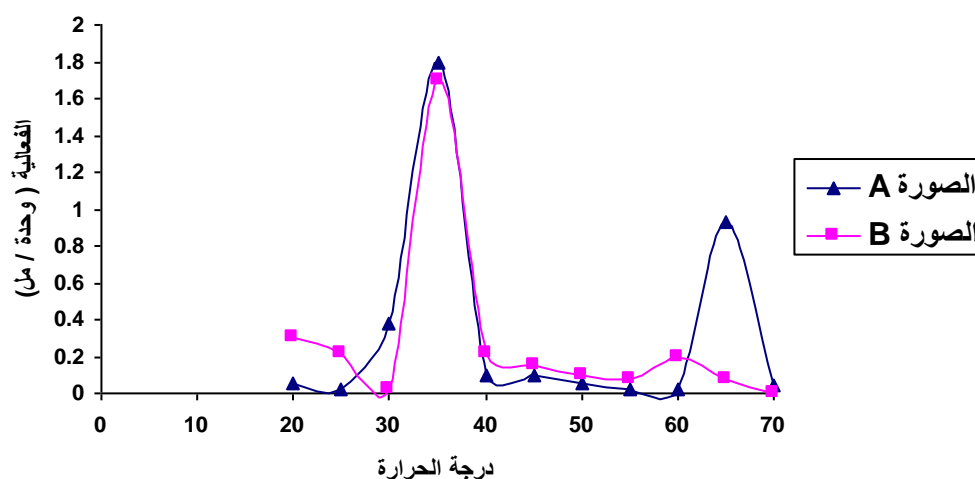
بينت نتائج التجربة (شكل 7) إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتيز المنقى جزئياً باستعمال المبادل الأيوني لصورتَي الإنزيم A و B هما 9 و 5 على التوالي كما لوحظ حصول ارتفاع بمستوى أقل في فعالية الإنزيم عند الأرقام الهيدروجينية 5 و 8 لكل من صورتَي الإنزيم A و B على التوالي. يمتلك كل إنزيم رقماً هيدروجينياً مثالياً واحداً لفعاليته، بيد إن بعض الإنزيمات تمتلك أكثر من ذلك، وعادة ما يكون هذا الرقم بمدى ضيق تماماً إلا أن بعض الإنزيمات تبدي مدى واسع له (30). (بين (31) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنزيم البروتيز المنتج من نفس الفطر يقع ما بين الرقمين الهيدروجيين 7.5 و 10. يعود تباين الأرقام الهيدروجينية المثلى لفعالية الإنزيم مع مواد الأساس المستعملة إلى تباين طبيعة وتركيب هذه البروتينات كمحتواها من الأحماض الأمينية وتسلسلها وطبيعة الأواصر الببتيدية بينها (32).



شكل (7) تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتيز المنقى جزئياً لصورتَي الإنزيم A و B باستعمال المبادل الأيوني DEAE- Cellulose.

تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البروتياز

أظهرت النتائج ( شكل 8 ) إن درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البروتياز المنقى جزئياً باستعمال المبادل الأيوني لصورتى الإنزيم A و B هي 35 م° فقد أعطت كلا المرحلتين فعالية إنزيمية بلغت 1.8 وحدة / مل لصورة الغسل و 1.7 وحدة / مل لصورة الاسترداد.



شكل (8) تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البروتياز المنقى جزئياً لصورتى الإنزيم A و B

باستعمال المبادل الأيوني DEAE- Cellulose

تتفق هذه النتائج مع ما ذكر (29) من أن درجة الحرارة المثلى لفعالية هذا الإنزيم المنتج من الفطر *Trichoderma viride* هي 37 م°. تؤثر درجة الحرارة على فعالية الإنزيم من خلال تأثيرها في أكثر من مركب فهي تؤثر في الإنزيم، والمادة الأساس، ومعدن الإنزيم – المادة الأساس، ومعدن الإنزيم – الناتج وينعكس هذا التغيير سلباً أو إيجاباً على فعالية الإنزيم (27).

المصادر

- 1- Qadar, S.A.U.; Shireen, E.; Iqbal, S. and Anwar, A. ( 2009). Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus* sp. PCSIREA-3 Indian Journal Biotechnology , 8: 286-290.
- 2- Muhammad., Ayaz Shaikh. (2010). Enzymes: A revaluation in textile processing. *PTJ*. 48-51.
- 3- Godfrey, T. and West, S. ( 1996). Industrial enzymology, 2<sup>nd</sup> ed., p. 3. Macmillan Publishers Inc., New York, N. Y.
- 4- Elad, Y. and Kapat, A. (1999) The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 177–189.
- 5- Szekeres, A., Kredics, L., Antal, Z., Kevei, F., and Manczinger, L. 2004. Isolation and characterization of protease overproducing mutants of *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiol. Letters* 233: 215-222.
- 6- Koneman, E.W.; Roberts, G.D. and Wright, S.E. (1979). Practical laboratory mycology. 2<sup>nd</sup> ed. The Williams and Wilkins Co., USA, pp: 165-167.
- 7- Bilinsk, E.A. (1987). Proteinases and beer production. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 495-499.
- 8- De Marco, J.L. and Felix, C.R. (2002). Characterization of protease produced by *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches broom disease, *BMC Biochemistry*; 3: 3-10.
- 9- Gomori, G. (1955). Preparation of buffer for use in enzymes studies, In *Methods in enzymology*. In (ed. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O.) Academic press. New York. Vol. 1
- 10- الخفاجي، محمد عبد الله جبر. ( 2007 ). تنقية وتوصيف وتقييد انزيم اليوريز المستخلص من بذور نبات الحنظل *Citrullus colocynthis*. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة بغداد.
- 11- حسن ، شذى سلمان . ( 1996 ). انتاج وتنقية وتوصيف البروتينيز القاعدي من العفن *Aspergillus oryzae* بطريقة تخمر المواد الصلبة. أطروحة دكتوراه . كلية العلوم ، جامعة بغداد.
- 12- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. (1972). Illustrated genera of imperfect fungi. 3<sup>rd</sup>. ed. Burgess Publishing Company.
- 13- Moubasher, A.H. & Moustafa, A.F. ( 1972). *Aspergillus egyptiacus* sp. Nov. *Egyptian J. Bot.*, 17, 135-149.
- 14- Moubasher, A.H. (1993). Soil fungi in Qatar and other Arab contries. Published by the Center for scientific and Applied Research. University of Qatar, Qatar.
- 15- Brock, F. M.; Forsberg, C.W. and Buchanan, S.G. (1982). Proteolytic activity of rumen microorganisms and effect of proteinase inhibitors. *J. Appl. Environ. Microbiol.* (44) : 561-569.
- 16- Whitaker, J. R. and Granum ,P.E. (1980). An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal. Biochem.* 109: 156-159.
- 17- الطائي ، محمد إبراهيم نادر. ( 2005 ). دراسة كيموحيوية لإنزيم البروتينيز المنتج من العزلة المحلية لبكتريا *Aeromonas hydrophila*. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم . جامعة بغداد.
- 18- Whitaker, J.R. and Bernhard, R.A. (1972). Experiments for : An introduction to enzymology . The Whiber Press. Davis.
- 19- Mach, R.L.; Perter bauer, C.K.; Payer, K.; Jaksits, S.; Woo, S.L.; Zeilinger, S.; Kullnig, L.M.; Lorito, M. and Kubicek, C.P. (1999). Expression of two Major chitinase genes of *Trichoderma atroviride* (*T. harzixnum* p1) is triggered by different regulatory signals. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 65: 1858-1863.
- 20- Bull, A. T. and Bushnell, M.E. (1976). Enviromental control of fungal growth . In: The filamentous fungi . (eds. J.E. Smith and D.R. Berry). Vol. 2: 1-26. Edward Arnold . London.
- 21- Viviana , M.& Ana , M.R. ( 1999 ) . Application of Doehlert Designs for water activity .PH. , & fermentation time optimization for *Aspergillus niger* . *Enzyme & microbial Technology* ; 25 : 411 – 419 .
- 22- Ghahfarokhi , M.S. Razafsha , M. , Allameh , A. & Abyaneh , M.R. (2003) . Inhibitory effects of Aqueous onion & garlic extract on growth & Keratinase activity in *Trichophyton mentagrophtes* . *Iran Bioch . J.*7: 113-118.
- 23- Schirmbock, M.; Lorito, M.; Wang, Y.L.; Hayes, C.K.; Arisan-Atac, I. Scala, F.; Harman, G.E. and Kubicek, C.P. (1994). Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol

- antibiotic: Molecular Mechanisms involved in the antagonists action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic of fungi Appl. and Environ. Microbiol., 60: 4364-4370.
- 24- السعد، مهارؤوف 1990. مبادئ فسلجة الأحياء المجهرية. مطابع التعليم العالي في الموصل. جامعة بغداد. 400 صفحة.
- 25- Chaplin, M. and Bucke, C. (1990). Enzyme Technology. Cambridge University Press. pp: 12-21.
- 26- Marzluf, G. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. microbiol. & molecu. biol; 61: 17 - 32.
- 27- White, A.; Handler, P. and Smith, E. (1973). Principles of Biochemistry. McGraw-Hill Book Company Ablakiston Publication New York.
- 28- Karlsson, E.; Ryden, L. and Brewer, J. (1998). Ion exchange chromatograph. In: Introduction to Protein Purification (ed. Wiley. Liss) A John Wiley and Sons, INC. Publication.
- 29- Simkovic, M.; Kurucova, A.; Hunova, M. and Varecka, L. (2008). Induction of secretion of extracellular proteases from *Trichoderma viride*. Acta Chimica Slovaca, Vol.1, No. 1, 250 – 264.
- 30- De Man, J.M. (2007). Principles of Food Chemistry. Third Edition. Springer International Edition.
- 31- Dunaevsky, Y.E., Gruban, T.N., Beliakova, G.A. and Belozersky, M.A. (2000) Enzymes secreted by filamentous fungi: regulation of secretion and purification of an extracellular protease of *Trichoderma harzianum*. Biochemistry (Moscow) 65, 723–727.
- 32- Whitaker, J.R. (1972). Principles of enzymology for the food science. Marcel Dekker, Inc. New York.