The role of some mineral elements , carbon and nitrogen sources in the activity of protease enzyme produced from a local isolate of *Aspergillusniger**

دور بعض العناصر المعدنية ومصادر الكربون والنيتروجين في فعالية انزيم البروتيز المنتج من عزلة محلية للفطر*Aspergillus niger**

سراب فاضل حسين بان طه محمد
جامعة كربلاء – كلية التربية للعلوم الصرفة – قسم علوم الحياة
مستل من رسالة الماجستير للباحث الاول

المستخلص:
أجريت سلسة من التجارب المختبرية في مختبر الدراسات العليا في قسم علوم الحياة لكلية التربية للعلوم الصرفه للفترة من شهرتشرين الثاني 2012 لغاية كانون الأول 2013 .تم من خلالها الحصول على عزلة محلية للفطر *Aspergillus niger*،عزلت وشخصت وأجري عليها الاختبار النوعي للكشف عن قدرتها في تحلل البروتين و كان قطر الهالة الشفافة حول المستعمرات الفطرية اكبر من 15 ملم، و فعالية البروتييز 18.97 وحدة / مل وبتركيز بروتين 0.460 ملغم / مل .استخدمت العناصر المعدنية ومصادر مختلفة من الكاربون والنيتروجين وتراكيزهما المختلفة لبيان قدرتهما في نمو الفطر وافراز انزيم البروتييز، إن استخدام الملحين$MgSO_4$ وKH_2PO_4 معاً له تأثيراً منشطا في إنتاج إنزيم البروتييز بفعالية الانزيمية 28.82 وحدة /ملغم بروتين مقارنة بالمعاملة الخالية من الأملاح والتي بلغت 22.39 وحدة / ملغم بروتين.اظهرت النتائج ، أن الكلوكوز أفضل مصدر لإنتاج انزيم البروتييز مقارنة بباقي المصادر الكربوهيدراتية المستخدمة ، إذ بلغت الفعالية الانزيمية لإنزيم البروتييز حدها الأقصى 35.72 وحدة / ملغم بروتين . في حين اظهرت أوطأ فعالية انزيمية للبروتين بوجود اللاكتوز.أن أفضل تركيز للكلوكوز لإنتاج إنزيم البروتييز هو 1.5% إذ بلغت الفعالية الأنزيمية40.42 وحدة /ملغم بروتين.أن الكازين هو المصدر النيتروجيني الأكفأ في إنتاج الإنزيم مقارنة بباقي المصادر النيتروجينية المستخدمة ، إذ بلغت الفعالية الانزيمية للبروتييز 43.89 وحدة / ملغم بروتين ، في حين اظهرت أوطأ فعالية للإنزيم بوجود كبريتات الامونيوم حيث بلغت قيمتها 7.55 وحدة / ملغم بروتين ، وقد سجلت أعلى فعالية أنزيمية عند استخدام الكازين بتركيز 1% ،إذ بلغت الفعالية النوعية 47.51 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم البروتييز، في حين انخفضت الفعالية النوعية تدريجياً بزيادة تركيز المصدر النيتروجيني المستخدم في هذه الدراسة ، فظهرت أوطأ فعالية انزيمية للبروتييز 10.53 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 2% من الكازين.

Abstract:

Series of lab.experiments were conducted in the postgraduate lab.Biol.Dept.,College of Education for Pure Science from November,2012till December,2013.Local isolated of *Aspergillus niger*, was obtained,isolated,diagnosed and then a qualitative test was carried out to determineits efficiency in the proteolysis of protein.The diameter of the clear zone arround the fungal colonies was more than15mm,The protease activity was 18.97 U/ml with0.460 mg/ml protein.

Mineral nutrients and different sources of carbon and nitrogen were used to test their ability in the fungal growth and secretion of protease enzyme.Using $MgSO_4$ and KH_2PO_4 together activated the production of protease enzyme gving 28.82 U/mg protein compared to the control which gave 22.39 U/mg protein. Resulls revealed that, glucose was better source for protease enzyme production compared with ther carbohydrates sources used. Maxemum enzyme activity of protease reauled 35.72 U/mg protein,whereas, the minimu enzyme activity was found in the presence of Lactose. The best conc.of glucose for protease enzyme production was 1.5% where the enzymatic activity was 40.42 U/mg protein. Gazaen was the most efficient N source in enzyme production compared to other nitrogen sources used, wher the enzymatic activity of protease reached 43.89 U/mg protein. Mean while, the lowest enzyme activity of protease was found with the presence of ammonium salphalt giving 7.55 U/mg protein. Maxemum enzymatic activity was recorded when Gazaen was used at 1% reaching 47,51 U.mg protein of protease enzyme. Whereas, qualitative activity gradually decreased with increasing N source used in this study giving 10.53U/mg protein at 2% Gazaen.

Introduction المقدمة:

تلعب الفطريات دوراً هاماً في الطبيعة من خلال تحطيمها للكربوهيدرات والبروتينات المعقدة في الأجسام الميتة لصالح تغذيتها ونموها وتكاثرها (1)،كما تمت الاستفادة من خاصية افراز الانزيمات من قبل بعض الانواع الفطرية في إنتاج الإنزيمات والأحماض العضوية التي تدخل في الصناعات الغذائية مثل أنزيم الأميليز وحامض الستريك ، كذلك استخدمت الفطريات في إنتاج بعض أنواع الاجبان (2) . وتعد الفطريات المجموعة الثانية من الأحياء المجهرية التي تنتشر في الأغذية بعد البكتريا . ولقد اكتشفت منها حتى الآن اكثر من100,000 نوعاً منتشراً في بيئات مختلفة كالماء والتربة والهواء وعلى سطوح الأجسام ومنها الإنسان والحيوان والنبات (3) . وبمرور الزمن ازدادت الحاجة الى منظفات للبيئة نتيجة الطلب المتزايد على الغذاء والطاقة لجميع الكائنات الحية، والأحياء المجهرية تعد مصدرا حيويا لا ينضب يمكن الاستفادة منه لكلا المجالين(4).تلعب الأحياء المجهرية دوراً كبيراً في تحليل المخلفات العضوية ،ومن خلال تنمية أنواع معينة من تلك الإحياء

(الفطريات و البكتريا و الخمائر) على المخلفات وتحت ظروف معينة.يمكن تحويل المخلفات إلى مواد بسيطة قابلة للهضم ، وإنتاج مواد غذائية ذات قيمة عالية كبروتينات الخلية الواحدة تستخدم في أغذية الإنسان والحيوان ، وعن طريق التحطيم الإنزيمي للمواد المعقدة بفعل انزيمات خاصة تفرزها الأحياء المجهرية لغرض ديمومة حياتها ونموها (5) . تمثل البروتييزات خليط من الإنزيمات المحللة للمواد البروتينية توجد في جميع الكائنات الحية تقريباً وتشمل الحيوانات والنباتات والأحياء المجهرية ، و هذه الإنزيمات تشغل موقعاً حيوياً بالغ الأهمية و تلعب أدواراً فسيولوجية ،بالإضافة إلى

التطبيقات التجارية والطبية فهي تؤدي وظيفتي التحلل والبناء(6)، وتعد البروتييزات من الإنزيمات التي لها دورا مهما لنمو وتكاثر الأحياء المجهرية ، وينتمي أنزيم البروتييز الى أنزيمات التحلل المائي والذي يعمل على تحلل الأصرة الببتيدية (7 و 8). يمكن استخدام الأحياء المجهرية على أوساط ذات كلفة واطئة لسد الحاجة من البروتين للاستهلاك البشري والحيواني مثل المخلفات الصناعية و مخلفات وأغلفة الحبوب و مخلفات المجازر ، لرخص ثمنها وسهولة استخلاصها إضافة إلى الكفاءة العالية لبعض السلالات في إنتاج الإنزيم ، عوضا عن كلفة الاستخلاص العالية للبروتييزات الحيوانية ، فقد قدر الانتاج السنوي من بروتييزات الاعفان بعشرة أطنان وحوالي خمسين طناً من بروتييزات البكتريا (9) وتمثل مبيعات البروتييزات الميكروبية حوالي % 40من مبيعات الأنزيمات في العالم (10). و بالرغم من إمكانية الحصول على البروتييزات من مصادر متنوعة مثل النبات والحيوان لكن الأحياء المجهرية تعد مصدراً لايضاهى لإنتاج البروتييزات فضلا عن امكانية معالجتها وراثياً (11).

المواد وطرائق العمل : Materials and Methods

الأوساط المستعملة:

وسط بطاطا دكستروز أكار Potato Dextrose Agar (PDA)

حضر الوسط الجاهز من انتاج شركة HIMEDIA – India بإذابة 39 غم من مسحوق الوسط في لتر واحد من الماء المقطر .

وسط أكار الحليب المقشودSkimmed – milk Agar

حضر باذبة 1غم من مسحوق الحليب الخالي من الدسم في 10مل ماء مقطر كما ذوب 2غم من الاكار في 90مل ماء مقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 6 عقم المحلولان كلاً على حده ومزجا بعده تبريدهما الى درجة حرارة 45مْ وصب الوسط في أطباق بتري معقمه (12).

وسط إنتاج انزيم البروتييزProtease Product

تم إضافة $CaCl_2$%0.1 ، KH_2PO_4 % 0.7 ،K_2HPO_4 %0.4 ، $MgSO_4.7H_2O$% 0.01 ، Glucose %1، casein %1 وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 6 باستخدام فوسفات البوتاسيوم المنظم حضر الوسط بحسب طريقة 13.
عقمت جميع الأوساط بدرجة 121°م وضغط 1 بار لمدة 15 دقيقة ماعدا وسط الحليب المقشود الذي عقم لمدة 5 دقائق كما أضيف المضاد الحيوي كلورومفنيكولChloromphenicol إلى الأوساط الزرعية بتركيز 250 ملغم / لتر لتثبيط نمو البكتريا قبل التعقيم.

محلول صبغة الكاشف(صبغة كوماسي الزرقاء)

حضر محلول صبغة الكاشف بإذابة 100 ملغم من صبغة الكوماسي الزرقاء جي -250 (Coomossie Brilliant Blue G 250-) في 50 مل من الكحول الأثيلي بتركيز 95% مع التحريك المستمر ثم أضيف 100 مل من حامض الفسفوريك تدريجيا بتركيز 85% وأكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر البارد، رشح محلول صبغة الكاشف باستخدام ورق الترشيح Whatman No.1 وحفظ بقنينة معتمة بدرجة 4مْ لحين الاستعمال.

المحاليل:

محلول ا لفوسفات الدارىء Phosphate buffer بتركيز 0.2 M

محلول $NaH_2PO_4.2H_2O$ بتركيز0.2 M و محلول Na_2HPO_4 بتركيز 0.2 M(14)

محلول ثلاثي كلورو حامض الخليكTrichloroacetic acid(TCA)(5%)

اذيب 5غم من ثلاثي كلورو حامض الخليك (TCA) في كمية من ماء مقطر مع التحريك واكمل الحجم الى 100 مل .

محلول ا لكازائين(0.5 %)

حضر من اذابة 0.5 غم من الكازائين في 90 مل من محلول الفوسفات الدارىء بتركيز 0.2M و سخن بدرجة 80°م لحين ذوبان الكازائين عدل الرقم الهيدروجيني الى 6 وأستخدم المحلول لتقدير فعالية انزيم البروتييز(3)Protease.

محلول ألبومين المصل البقري Bovine Serum Albumin

تركيز2 ملغم/مل:-حضربإذابة0.2غم من ألبومين المصل البقري بكميةمن الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر.

منظم الخلات (0.1) مولاري(pH 5.0)

حضر بتخفيف 0.58 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر و بعد تعديل الـ pH إلى 5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

عزل وتشخيص الفطر:

تم عزل الفطر *A. niger*، من بعض المواد الغذائية ومخلفاتها وشخص بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية الواردة في (15) و(16) و.(17)

الكشف تحلل البروتين :

صب وسط أكار – الحليب المقشود Skimmed – milk Agar في أطباق بتري معقمة ، لُقحت الأطباق بقرص قطره 5 ملم من مزرعة نقية للفطر على وسط PDA بعمر 5 ايام،حضنت الأطباق بدرجة 28°م لمدة 72 ساعة ، ثم كشف عن تحلل البروتين (الكازائين في الحليب) بظهور هالة شفافة حول المستعمرة الفطرية (12).

قياس فعالية أنزيم البروتييزProtease :

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (17) في تقدير فعالية أنزيم البروتييز حيث أضيف 0.1 مل من الراشح الأنزيمي الى 2 مل من محلول التفاعل0.5 % كازائين برقم هيدروجيني 6 ، وضعت العينات في حمام مائي بدرجة 35°م لمدة 20 دقيقة ثم أضيف 3 مل من محلول TCA 5% لإيقاف التفاعل .

حُضر المحلول Blank بالطريقة السابقة نفسها عدا إضافة محلول TCA قبل إضافة الأنزيم نبذت المحاليل بسرعة 2500 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة 4°م ثم قيست الامتصاصية للمحلول الرائق بطول موجي 280 نانوميتر ، ثم قدرت وحدات الفعالية الأنزيمية حيث تعرف وحدة الفعالية بأنها كمية الأنزيم التي تسبب زيادة في الامتصاص الضوئي على الطول الموجي 280 نانوميتر مقدارها0.01 في الدقيقة تحت ظروف القياس

$$\text{الفعالية الأنزيمية (وحدة /مل)} = \frac{\text{الامتصاصية /الميل} \times \text{عامل التخفيف}}{\text{الوزن الجزيئي للكلوكوز} \times \text{حجمالأنزيم} \times \text{زمن الحضانة(بالدقيقة)}}$$ (18).

تقدير تركيز البروتين:

قدرت البروتينات الذائبة في الراشح الأنزيمي بطريقة Bradford method،أضيف إلى أنبوبة اختبار نظيفة 0.05 مليلتر من الراشح الانزيمي، و0.45 مليلتر من دارئ الفوسفات و2.5 مليلتر من صبغة الكوماسي الزرقاء G-250 ، مزج الخليط جيدا باستخدام جهاز الرج، وترك لمدة دقيقتين بدرجة حرارة الغرفة ثم قيست الامتصاصية على الطول الموجي 595 نانومتر ومن قيمة الامتصاصية تم معرفة تركيز البروتين الذائب في الراشح الإنزيمي من المنحنى القياسي للبروتين .

تحديد الظروف المثلى للفطر *Aspergillus niger*لانتاج أنزيم البروتييز:

تأثير العناصر المعدنية على انتاج الانزيم:

درس تأثير كبريتات المغنيسيوم وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (الموجودتين أصلاً في وسط الإنتاج)، حيث حضر الوسط بوجود كبريتات المغنيسيوم و بعدم وجودها و بوجود فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و بعدم وجودها إضافةً إلى المعاملة الحاوية على كلا الملحين و تركت إحدى المعاملات بدون إضافة أملاح معدنية لغرض المقارنة ، وحضن الوسط الإنتاجي لمدة 72 ساعة و بدرجة حرارة 30 مْ .

تأثير مصادر مختلفة من الكاربون:

حضر وسط إنتاج انزيم البروتييزProtease Product كما في اعلاه، وباستخدام مصادر كاربون مختلفة مثل الكلوكوز والنشأ واللاكتوز والسكروز، ولقح بفطر بقرص 10ملم وحضن لمدة 72ساعة وبدرجة حرارة30 مْ.

تأثير تراكيز مختلفة من الكاربون:

حضر الوسط الانتاجي وأضيفت له تراكيز مختلفة من الكلوكوز(0.5، 1، 1.5، 2)% ولقح الوسط بالفطر بقرص 10 ملم وحضن لمدة 72 ساعة وبدرجة حرارة 30 مْ.

تأثير مصادر مختلفة من النتروجين:

من أجل تحديد مصدر النيتروجين الأمثل لإنتاج إنزيم البروتيز، تم اختبار مصادر النيتروجين المختلفة في تركيز 1٪. هذه المصادر هي: ببتون والكازين وكبريتات الأمونيوم وخلاصة الخميرة .

تأثيرتراكيز مختلفة من النتروجين:

حضر الوسط الانتاجي وأضيفت له تراكيز مختلفة من النتروجين (0.5، 1، 1.5,2)% للوسط ولقح بالفطر وحضن لمدة 72 ساعة وبدرجة حرارة 30مْ.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج اختبار فعالية الفطر *Aspergillus niger* في تحلل البروتين على وسط أكار – الحليب المقشود وانه كان فعال وكان قطر الهالة الشفافة اكبر من 15 ملم مما يدل على انه شديدة الفعالية (الشكل 3)**.** وكانت فعالية البروتييز 18.97 وحدة / مل وبتركيز بروتين 0.460 ملغم / مل

تحديد الظروف المثلى للفطر في إنتاج أنزيم تحلل البروتين:

العناصر المعدنية في الوسط الزرعي :

أظهر الشكل 5 ، إن استخدام الملحين$MgSO_4$ وKH_2PO_4 معاً تأثيراً منشطا في إنتاج إنزيم البروتييز مقارنة بالمعاملة الخالية من الأملاح ، إذ بلغت الفعالية الانزيمية 28.82 وحدة /ملغم بروتين . بينما أظهرت المعاملة الخالية من

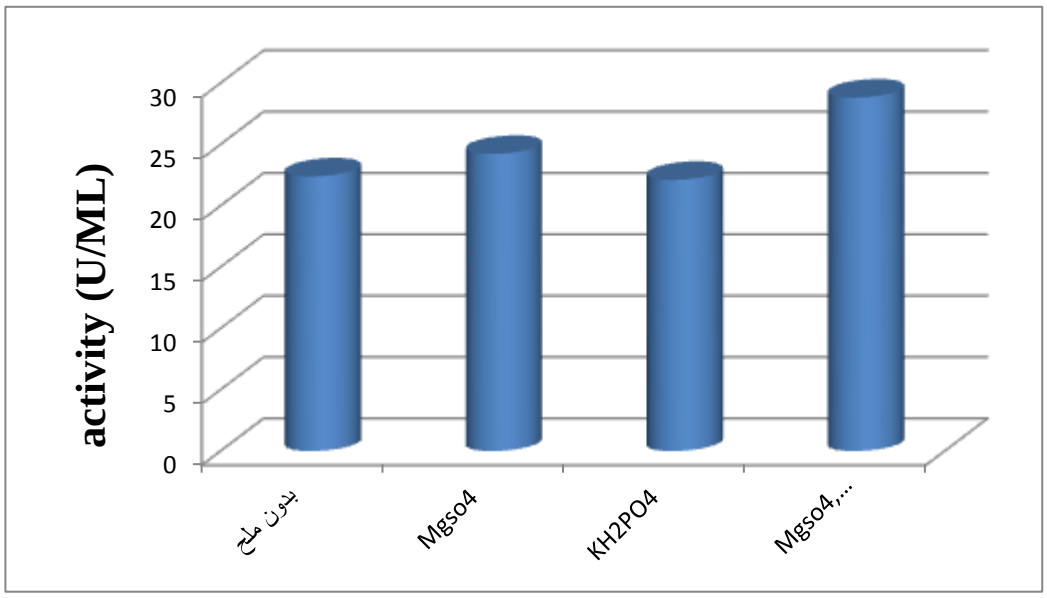
الشكل 3 :فعالية الفطر*A. niger* في تحليل البروتين على وسط أكار الحليب المقشود بدرجة حرارة 28مْ بعد ثلاثة ايام من الحضن.

الملحين المذكورين فعالية انزيمية بلغت 22.39 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم البروتييز. ان توفر الأيونات المعدنية في وسط التخمر يعد من أحد المتطلبات الضرورية لإنتاج الإنزيمات وثبوت واستقرار بعضها ولكنها تختلف بالاعتماد على مصدر الإنزيم (19) ، بالرغم من وجود بعض الأحياء المجهرية المنتجة للإنزيمات الثابتة حرارياً إلا إن وجود بعض هذه الأيونات يزيد من الثبات الحراري للإنزيمات ويجعلها فعالة حتى عند درجات الحرارة العالية (20) . هناك عدة دراسات أوضحت الدور الفعال للأملاح المعدنية في إنتاج الإنزيم من الفطريات ، فقد قام (21) ، بإنتاج الإنزيمات المحللة للكيوتكل من الفطر *Beauveria bassiana* في استخدام وسط زرعي يحتوي على كبريتات المغنيسيوم المائية 0.06 % وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 1.5 % وكلوريد الصوديوم 0.05 % . كذلك استخدمت كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وبتركيز 4 و5 غم / لتر في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر*B. brongniartii* (22) . أشار (23) إلى استخدام كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين وبالتراكيز 0.3 و2 و6.9 غم / لتر على التوالي ،لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر*Trichoderma harzianum* .

تأثير مصدر الكاربون وتركيزه في الوسط الزرعي:

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل 6 ، أن الكلوكوز أفضل مصدر لإنتاج انزيم البروتييز مقارنة بباقي المصادر الكربوهيدراتية المستخدمة ، إذ بلغت الفعالية الانزيمية حدها الأقصى لإنزيم البروتييز35.72 وحدة / ملغم بروتين . في حين ظهرت أوطأ فعالية انزيمية للبروتين بوجود اللاكتوز.

استخدام الكلوكوز بتراكيز متدرجة 0.5 ,1 , 1.5 , 2 %. إن قيم الفعالية الأنزيمية تبين أن أفضل تركيز للكلوكوز لإنتاج إنزيم البروتييز هو 1.5% إذ بلغت الفعالية الأنزيمية40.42 وحدة /ملغم بروتين كما في الشكل 7. وفي ضوء هذه النتائج تم استخدام الكلوكوز بتركيز 1.5 % لإنتاج الإنزيم في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها.ان لتوفير مصدر كاربون في الوسط ضروري لتحرير الطاقة التي تحتاجها الأحياء المجهرية للنمو و قلة تجهيزها بالوسط يقلل من نموها ، لذا فهي تؤثر بشكل كبير في إنتاج الإنزيم من تلك الأحياء المجهرية (24), تتباين المصادر الكربونية وتراكيزها المطلوبة لتنمية الأنواع المختلفة من الأحياء المجهرية وإنتاج الإنزيم (25) .



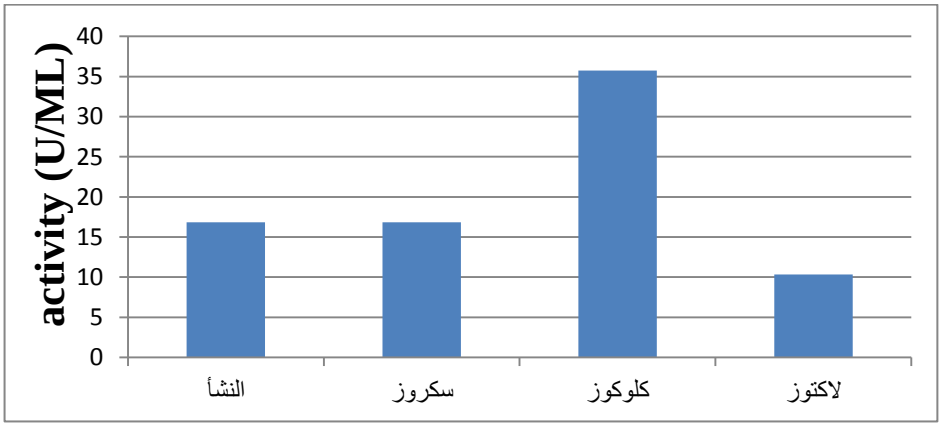
الشكل 5 : تأثير العناصر المعدنية على فعالية انزيم البروتيز وحدة / ملغم بروتين

حصل (26) و (27) على نتيجة مماثلة لنفس الفطر وان تعزيز نشاط انزيم البروتييز بوساطة استخدام تركيز الكلوكوز بنسبة تصل الى 1-1.5%. هناك عدة دراسات قارنت كفاءة مصادر كربونية مختلفة وبتراكيز مختلفةعلى إنتاج إنزيم الكايتينيز والبروتييز من أحياء مجهرية مختلفة ، وقد حصل (28)، على أعلى فعالية لإنزيمي البروتييز (Pr1) و(Pr2) عند تنمية الفطر *B. bassiana*في وسط يحوي كيوتكل الجراد كمصدر كاربون . فقدأستخدم(29) ،الكلوكوز والكايتين بتركيز 0.02 و0.5 % ، على التوالي كمصدرين كاربونيين لإنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *Trichoderma asperellum* . وحصل على أعلى إنتاج لإنزيم البروتييز من الفطر *Penicillium chrysogenum* بإضافة الكلوكوز 0.5 % كمصدر كاربوني في الوسط (24) .

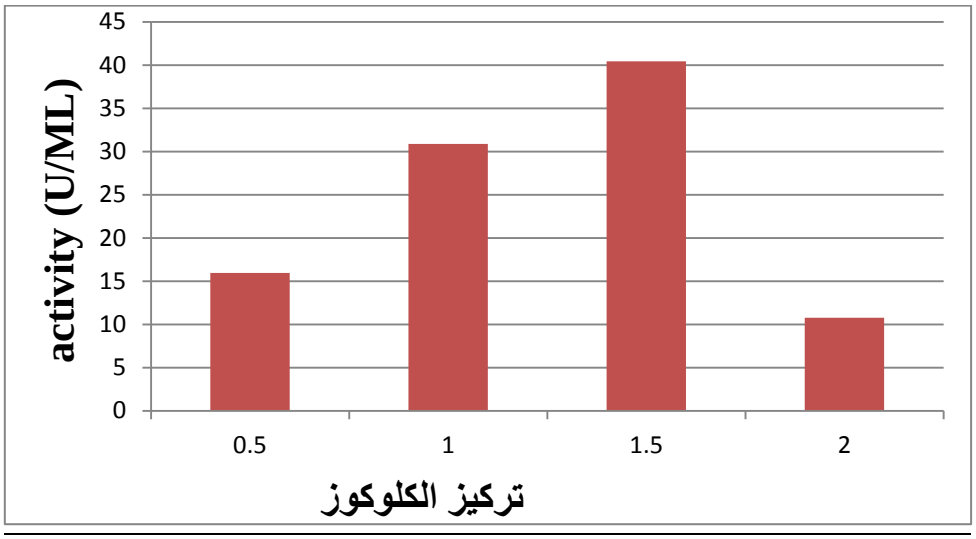
تأثير المصدر النيتروجيني و تركيزه في الوسط الزرعي:

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل 8، أن الكازين هو المصدر النيتروجيني الأكفأ في إنتاج الإنزيم مقارنة بباقي المصادر النيتروجينية المستخدمة ، إذ بلغت الفعالية الانزيمية للبروتييز 43.89 وحدة / ملغم بروتين . في حين ظهرت أوطأ فعالية للإنزيم بوجود كبريتات الامونيوم حيث بلغت قيمتها 7.55 وحدة / ملغم بروتين .

بعد أن تم تحديد المصدر النيتروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم درست تراكيز مختلفة من الكازين لتحديد التركيز الأمثل منها لإنتاج الإنزيم كما في الشكل9، وقد سجلت أعلى فعالية أنزيمية عند استخدام الكازين بتركيز 1% ،إذ بلغت الفعالية النوعية

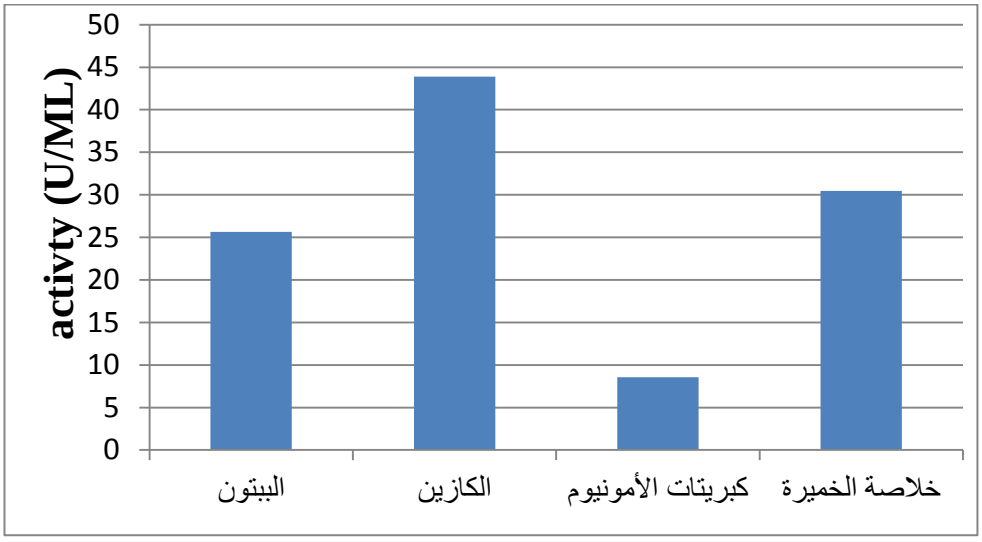


الشكل(6) تأثير مصادر مختلفة من الكاربون على فعالية انزيم البروتيز وحدة /ملغم بروتين

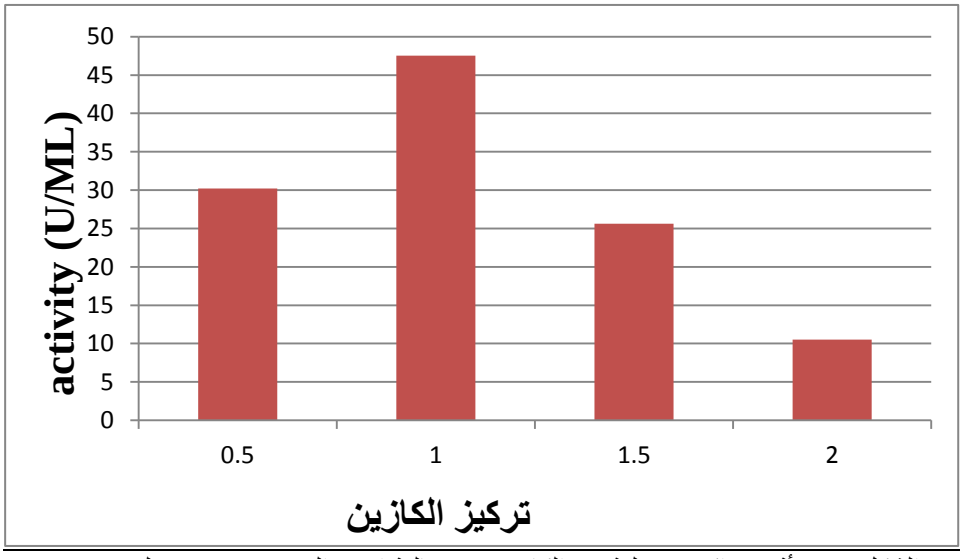


الشكل 7: تأثير تراكيز مختلفة من الكلوكوز على فعالية انزيم البروتيز وحدة /ملغم بروتين

47.51 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم البروتييز، في حين انخفضت الفعالية النوعية تدريجياً بزيادة تركيز المصدر النيتروجيني المستخدم في هذه الدراسة ، فظهرت أوطأ فعالية انزيمية للبروتييز 10.53 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 2% من الكازين.وان مصدر النيتروجين المستخدم في وسط الإنتاج هو أحد العوامل الرئيسة المؤثرة في إنتاج الإنزيمات (30) والذي له دور تنظيمي في تصنيع الإنزيم ، إذ يتأيض هذا المصدر ليعطي أحماض أمينية تعد ضرورية لإنتاج الإنزيمات (31) . مما تجدر الإشارة إليه أن الأعفان تستطيع إنتاج هذه الأحماض الأمينية من مصادر نيتروجينية غير عضوية (32) .تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه (33)، و الذي أشار إلى استخدام الكازين كمصدر نيتروجيني لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Penicillium sp.* . بينما أوضح (20) ،ان البيتون (Pepton) أفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *P. mchrysogenu* لإعطائه اعلى فعالية إنزيمية والتي بلغت 12.71 وحدة / مل.



الشكل 8: تأثير مصادر مختلفة من النتروجين على فعالية انزيم البروتيز وحدة /ملغم بروتين



الشكل 9: تأثير تراكيز مختلفة من الكازين في فعالية انزيم البروتيز وحدة /ملغم بروتين

المصادر :

1- Nester, E. W.; Roberts, C. E.; Pearsall, N. N.; Anderson, D. G. and Nester, M. T. (1998). Microbiology. 2nd ed. Wcb. McGraw-Hill, USA.

2- Stanley , G. (1998) . Cheeses .In : Microbiology of fermented foods . Wood , B. J. B.(Ed.) . Blackie Academic and professional.London ,Weinheim . Vol. 1 .

3- Doyle , M. P. ; Beuchat , L. R. and Montville , T. J. (1997) . Food microbiology fundamentals and frontiers . ASM press . Washington D. C.

4- Olsson,L.(2004).Investigation of cellulase&hemicellulase production in filamentous fungi during growth on cellulase,centar of process Biotechnology,Biocentrum–DTU,Tech.Uni of Denmark .

5-Chang , W.T.H. & Thayer , D.W. (1995) . The growth of Cytophaga on mesquite .Dev. Ind. Microbiol ; 16 : 456 – 464 .

6- Mala,B.R.; Aparna, M.T. ; Mohini , S.G. &rasanti , V.D. (1998) . Molecular & Biotechnological Aspects of microbial proteases . American soc . microbiol ; 62 : 597 – 635 .

7- Muhammad ,A. (2010). Enzymes: A revaluation in textile processing. PTJ.48-51.

8- 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.

9- Dunil,P.(1980).The current Status of enzymes technology.In:"Enzymiz& non- enzymic catalysis" .P. Dunil.; A. Wiseman . & N. Blakebrorgh . Ellis Horwood 1td . ; C. chichester . England .

10-Godfrey, T. and West, S.(1996). Industrial enzymology, 2nd ed., p. 3. Macmillan Publishers Inc., New York, N. Y.

11- Chakrabarti , A. &stotey , K. (2005) . Enzyme structure &mechanism , APPL . Biochem .Biotechnol ; 22 : 263 .

12-Bilinsk,E.A.(1987).Proteinases and beer production.Appl.Environ. Microbiol.,53: 495-499.

13-Hassan , Sh. S. (1996) . Production & Purification & Charactrization of protease from *Aspergillusoryzae*by solid Fermination . Ph .D. Thesis coll. Sci .Univ . Baghdad .(Arabic)

14-Craickshank,R.;Duguid , J.P.;Marmion, B.P. & Swain, R. H.(1982).The practice of medical microbiology, In : "Medical microbiology" , 12thed . Edinburgh , London &Newyork , Vol 12 .

15- Moubasher , A.H. (1993) . Soil fungi in Qatar & other arab countries . Dep . of . Bota .2nd ed .

16- Pitt , J.I. and Hoching , A.D. (1997) . Fungi & food Spoilage . Blackie academic and professional . 2nd ed . London . Newyork . Tokyo . Melbourne .

17-Murachi , T. (1970) . Bromelain enzymes . In ; Methods in Enzymology . Academic press . Newyork ; 19 : 273 – 284.

18- Miller, G.L.(1959).Use of Dinitro Salicylic Acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. *31*(3): 426 – 428.

19-Ire,F. ; Okolo,B. ; Moneke,A. &Odibo,F. (2011). Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergilluscarbonarius* using submerged fermentation.African Journal of Food Science. Vol. 5(6):pp. 353-365.

20- Haq,I.-U.; Mukhtar, H. & Umber, H. (2006). Production of protease by *penicilliumchrysogenum* Through Optimization of Environmental conditions.Journal of Agriculture & Social Sciences.Vol.2. No.1: 23-25.

21-Gupta, S. ; Leathers, T. ; El-Sayed, G. &Ignoffo, C. (1992). Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveriabassiana*. Experimental Mycology. 16: 132-137.

22- Erlacher, A. ; Sousa, F. ; Schroeder, M. ; Jus, S. ; Kokol, V. ; Cavaco-Paulo, A. &Guebitz, G.(2006). A new cuticle scale hydrolysing protease from *Beauveriabrongniartii*. BiotechnolLett. 28:703–710.

23-Elad, Y. &Kapat, A.(1999) .The role of *Trichodermaharzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Pathology . 105: 177-189 .

24- 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.

25- Jaswal,R.; Kocher,G. &Virk,M. (2008).Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues:A statistical approach. Indian Journal of Biotechnology.Vol.7. pp. 356-360.

26-Sinha, S. Sinha, *International Journal of Food Engineering*, (2009), 5, 1Indian Journal Biotechnology , 8: 286-290.

27- KalpanaM.;Devi, A. RasheedhaBanu, G.R. Gnanaprabhal, B.V.Pradeep, M.Palaniswamy, *Indian Journal of Science and Technology*, (2008), 1, 7, 1-6.

28- Donatti, A.; Furlaneto-Maia, L.; Fungaro, M. &Furlaneto, M**.** (2008). Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveriabassiana*in the presence of *Rhammatocerusschistocercoides*cuticle.Curr. Microbiol.56:256-260.

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

30- Abd-Aziz, S. ; Sin, T.; Alitheen, N.; Shahab, N. &Kamaruddin, K.(2008).Microbial Degradation of Chitin Materials by *Trichodermavirens* UKM1 . Journal of Biological Sciences . 8(1): 52-59 .

31- Saurabh,S.; Jasmine, I.; Pritesh, G. & Kumar, R. (2007). Enhanced productivity of serine alkaline protease by *Bacillus* sp. Using soybean as substrate. Malaysian Journal of Microbiology . Vol.3(1). pp.1 – 6.

32- 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.

33- Krishna,V. ; Gupta,M. ; Gupta,N. ; Gaudani,H. ; Trivedi,S. ; Patil, P. ;Gupta, G. ; Khairnar,Y. ; Borasate,A. &Mishra,D. (2009). Optimization of growth and production of protease by *Penicillium*species using submerged fermentation. International Journal of Microbiology Research. Vol.1. Issue.1. pp.14-18.