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

إنتاج وتوصيف إنزيم البروتييز من الفطر *Trichoderma harzianum* وتنقيته جزئيا

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

م. زينه هادي عبيد
كلية العلوم – جامعة بابل

م. بايولوجي أمير مزهر
كلية العلوم – جامعة بابل

الخلاصة

أجريت دراسة مختبرية لإنتاج وتنقية إنزيم البروتييز 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 الحضن لمدة خمسة أيام في درجة حرارة 25 مْ في وسط معدني سائل حاوي على نخالة الحنطة بتركيز 2 % وبرقم هيدروجيني 4 . نقي الإنزيم بعدة خطوات شملت الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع 80 % كخطوة أولى للتنقية وتم الحصول على عدد مرات تنقية 3.47 وبحصيلة إنزيمية 43 %. أعقبت خطوة الترسيب بكبريتات الأمونيوم خطوة التبادل الأيوني باستعمال المبادل الأيوني (DEAE- Cellulose) بوجود محلول دارئ 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 البروتييز المنقى جزئيا باستعمال المبادل الأيوني لصورتي الإنزيم A و B هما 9 و 5 على التوالي في حين إن درجة الحرارة المثلى لفعالية الإنزيم المنقى جزئيا هي 35 مْ.

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 Skimed 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 البروتييزات من الإنزيمات التي تلعب دورا مهما لنمو وتكاثر الأحياء المجهرية , وينتمي إنزيم البروتييز إلى إنزيمات التحلل المائي Hydrolysis (EC 3.4. 23) والذي يعمل على تحلل الآصرة الببتيدية (1 ، 2) ، وتحتل البروتييزات مواقع الصدارة بين الإنزيمات ذات الأهمية الصناعية وخصوصا في الصناعات الغذائية والمجالات الطبية . ينتج هذا الإنزيم بشكل واسع في جميع الكائنات الحية مثل النباتات والحيوانات والأحياء المجهرية وقد توجه الاهتمام إلى إنزيمات البروتييزات المنتجة من الأحياء المجهرية كبدائل للإنزيمات الحيوانية والنباتية نظرا لسهولة تنمية هذه الأحياء والتعامل معها ، وإمكانية السيطرة على ظروف الإنتاج وقصر مدته مقارنة بالمصادر الأخرى، إذ تمثل مبيعات البروتييزات الميكروبية حوالي 40% من مبيعات الإنزيمات في العالم (3). تنتج الفطريات أنواع مختلفة من البروتييزات الحامضية والقاعدية والمتعادلة وكانت لأنواع جنس *Aspergillus* أهمية في إنتاج إنزيمات البروتييزات 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 احد 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 انتاج انزيم البروتييز وتحديد الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم وتنقيته جزئيا 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 1غم من حليب الفرز (Skim Milk) في 10مل من الماء المقطر، كما ذوب 2غم من الاكار في 90 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 6، عقم المحلولان كلاً على حده ومُزِجا بعده تبريدهما إلى درجة حرارة 45م وصب الوسط في أطباق بتري معقمة (7).

وسط إنتاج إنزيم البروتييز

حضر الوسط وفق طريقة De Marco و Felix (8) ويتكون من 0.3غم/لتر كبريتات المغنسيوم المائية $MgSO_4.7H_2O$ و2غم/لتر فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 و0.3غم/لتر كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ و1.4غم/لتر كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ و 0.3غم/لتر يوريا و1غم/لتر protease peptone و 5 ملغم/لتر كبريتات الحديد المائية $FeSO_4.7H_2O$ و1.6 ملغم/لتر كبريتات المنغنيز $MnSO_4$ و1.4 ملغم/لتر كبريتات الزنك $ZnSO_4$ و 2 ملغم/لتر كلوريد الكوبلت CoCl و 0.2 غم/ لتر كلوكوز ويجهز الوسط بمصدر بروتيني وهو نخالة الحنطة بنسبة 1%.
عقمت جميع الأوساط بدرجة حرارة 121 مْ 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 0.25غم/لتر لغرض منع نمو البكتريا.

المحاليل

محلول خلات الصوديوم الدارئ بتركيز 0.2 مولار وبأرقام هيدروجينية (5, 4)

ويتكون من محلول خلات الصوديوم بتركيز 0.2 مولار وحامض الخليك بتركيز 0.2 مولار (9).

محلول الفوسفات الدارئ بتركيز 0.2 مولر بأرقام هيدروجينية (8,7,6)

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).

محلول دارئ ترس (Tris- base - NaOH) بأرقام هيدروجينية (9 و10 و11 و12)

حضر بإذابة غم من الترس (Tris- base) في كمية من الماء المقطر وبعد التعديل ال pH إلى القيمة المطلوبة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر. (10)

محلول ثلاثي كلور حامض الخليك بتركيز 5%

حضر بإذابة 5غم من ثلاثي كلور حامض الخليك في حجم معين من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر.

محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.05 مولر

وحضر بإذابة 0.2غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية معينة من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر.

محلول الكازائين بتركيز 1% بأرقام هيدروجينية (6 و7 و8 و9 و10 و11 و12)

حضر بإذابة 1غم كازائين في كمية من المحلول الدارئ برقم هيدروجيني معين مع التحريك باستعمال المحرك المغناطيسي ثم أكمل الحجم إلى 100مل بالمحلول الدارئ نفسه (11).

محلول الألبومين بتركيز 1% بأرقام هيدروجينية (4 و5)

حضر بإذابة 1غم ألبومين في كمية من المحلول الدارئ برقم هيدروجيني معين ثم أكمل الحجم إلى 100مل بالمحلول الدارئ نفسه (11).

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 تخافيف عشرية لمحلول التربة وزرع 0.1 مل من التخفيف 10^{-3} على وسط ال PDA بطريقة الصب ،حضنت الأطباق لمدة خمسة أيام عند درجة حرارة 25 مْ وبواقع ثلاثة مكررات وبعد انتهاء مدة الحضن نقيت عزلة 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 البروتييز

لقح وسط اكار الحليب Skim milk agar بقرص قطره 10 ملم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *T. harzianm* 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 البروتييز:

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% كازائين برقم هيدروجيني 5) وحضن في حمام مائي بدرجة حرارة 35 مْ لمدة 20 دقيقة ثم أضيف 3 مل من محلول ثلاثي كلور حامض الخليك بتركيز 5% لإيقاف التفاعل. حضر محلول الكفء 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).

$$\text{الفعالية الإنزيمية (وحدة/ مل)} = \frac{\text{الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر}}{0.2 * 20 * 0.01}$$

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 محلولا كفئا وحسب تركيز البروتين من المعادلة الآتية:

$$\text{تركيز البروتين ملغم / مل} = \frac{\text{امتصاص الضوء بطول موجي 235 نانوميتر - امتصاص الضوء بطول موجي 280 نانوميتر}}{2.51}$$

حسبت الفعالية النوعية specific activity كما يأتي:

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

(11).

تعين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز:

درس تأثير بعض العوامل وهي مدة الحضن والمصدر البروتيني والرقم الهيدروجيني ودرجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتييز 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 الحضن

اختبرت مدة الحضن 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 الحضن كما وصف سابقا.

الرقم الهيدروجيني

حضر وسط إنتاج الإنزيم الحاوي على نخالة الحنطة بنسبة 1% كمصدر وحيد للبروتين وبأرقام هيدروجينية تراوحت مابين 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 مْ 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 مْ 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 الكازائين (1%) وذلك لمعرفة الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الراشح الإنزيمي إذ أضيف 1.8 مل من محلول الكازائين المعلق بمحاليل الدوارئ التي تراوحت أرقامها الهيدروجينية ما بين 6-11 ومحلول الألبومين المعلق بمحاليل الدوارئ بأرقام هيدروجينية 4 و 5 إلى 0.2 مل من الراشح الإنزيمي الخام المأخوذ من مزرعة فطرية لإنتاج إنزيم البروتييز 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:

حضن 0.2 مل محلول الإنزيم و1.8 مل من محلول التفاعل (1% كازائين برقم هيدروجيني 9) بدرجات حرارية تراوحت مابين 25 -70 مْ لمدة 20 دقيقة ثم أوقف التفاعل وقدرت الفعالية (11).

تنقية إنزيم البروتييز

شملت خطوات التنقية على تركيز الإنزيم باستعمال كبريتات الأمونيوم والديلزه 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 مابين 80 إلى 20 % , نبذ المحلول بعد كل إضافة بسرعة 6000 دورة/ دقيقة بدرجة حرارة 4 مْ 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).

الديلزة

اجريت عملية الديلزة 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 ليركد ثم سكب السائل العلوي وغسل المبادل عدة مرات بالماء المقطر إلى أن أصبح السائل العلوي رائقا. 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 أيضا 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 أيضا 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 البر وتينات 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 البروتييز المنقى جزئيا للقمم المجموعة لكل من الغسل و الاسترداد وكما وصف سابقا (17).

النتائج والمناقشة

تشخيص الفطر *Trichoderma harzianum* :

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

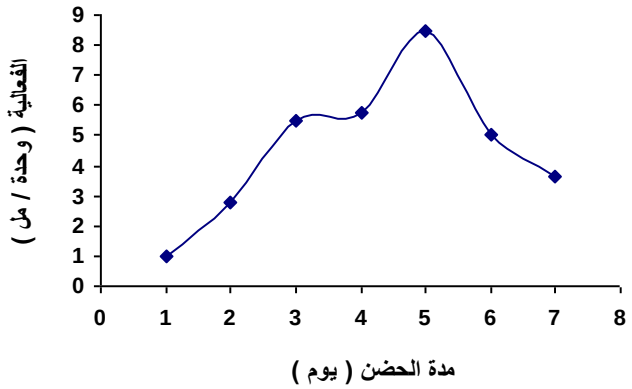
الكشف عن إنتاج إنزيم البروتييز

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

تعين الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز:

مدة الحضن

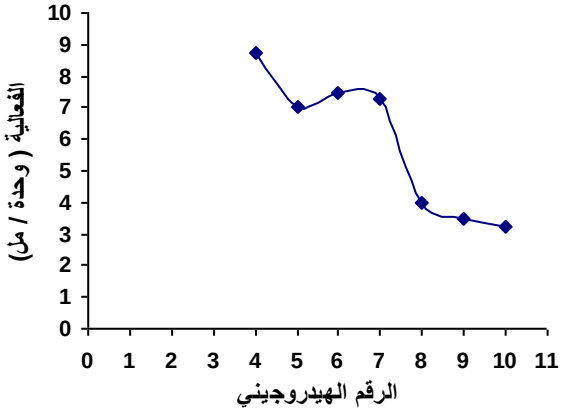
أظهرت النتائج (شكل 1) بأن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان بعد اليوم الخامس من الحضن في وسط الإنتاج برقم هيدروجيني 5 وفي درجة حرارة 25 مْ ثم أخذ مستواه بالانخفاض بزيادة مدة الحضن. أن مستوى إنتاج الإنزيم يقل بزيادة مدة الحضن نتيجة لعدة عوامل منها حصول تغيرات بيئية غير مرغوبة في وسط الإنتاج تؤثر في مستوى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



شكل (1) تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Trichoderma harzianum* برقم هيدروجيني 5 وبدرجة حرارة 25مْ

الرقم الهيدروجيني

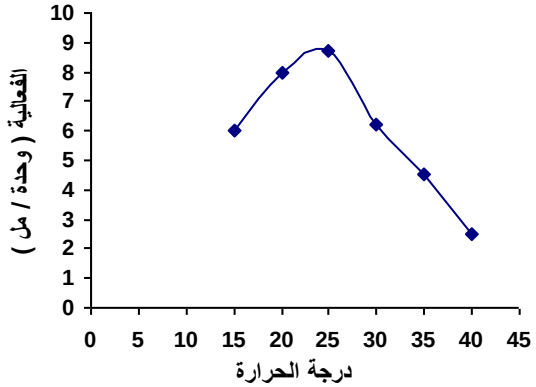
يبين الشكل (2) أن أعلى مستوى لإنتاج الإنزيم كان عند الرقم الهيدروجيني 4 للوسط وانخفض مستوى الإنتاج بزيادة قيمة الرقم الهيدروجيني وخصوصا عند القيمة 10 إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنها 3.25 وحدة / مل. يؤثر الرقم الهيدروجيني للوسط في ذوبانية المواد المغذية للوسط وانتقالها وتأينها وتركيز البيكاربونات التي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



شكل (2) تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Trichoderma harzianum* بعد مدة حضن خمسة أيام بدرجة حرارة 25 مْ

درجة الحرارة

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

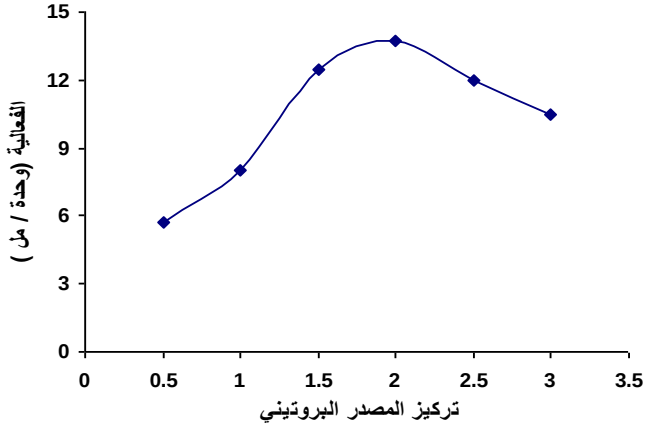


شكل (3) تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Trichoderma harzianum* بعد مدة حضن خمسة أيام برقم هيدروجيني 4

تؤثر درجة الحرارة في أكثر من عامل له علاقة بالنمو ونشاط الكائن الحي كرطوبة الوسط وكمية الأوكسجين الذائبة فيه والطاقة الحركية للجزيئات هذا فضلاً عن حموضة الوسط التي تنعكس 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 وصولا إلى التركيز 2 % إذ بلغت الفعالية الإنزيمية عنده 13.75 وحدة / مل ليأخذ بعدها مستوى الإنتاج بالانخفاض بزيادة التركيز المستعمل وصولا إلى التركيز 3 % فقد بلغت الفعالية الإنزيمية عنده 10.5 وحدة / مل. أن انخفاض الفعالية الأنزيمية 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 بآلية كبح أيض النتروجين Nitrogen catabolite repression وتبعاً لهذه الآلية فأن الجينات تعبر بمستويات عالية عند حدود معينة للنتروجين أما عند النمو بوجود مصادر نتروجين جاهزة ومفضلة فأنه يؤدي إلى أعطاء أشارة 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 مْ

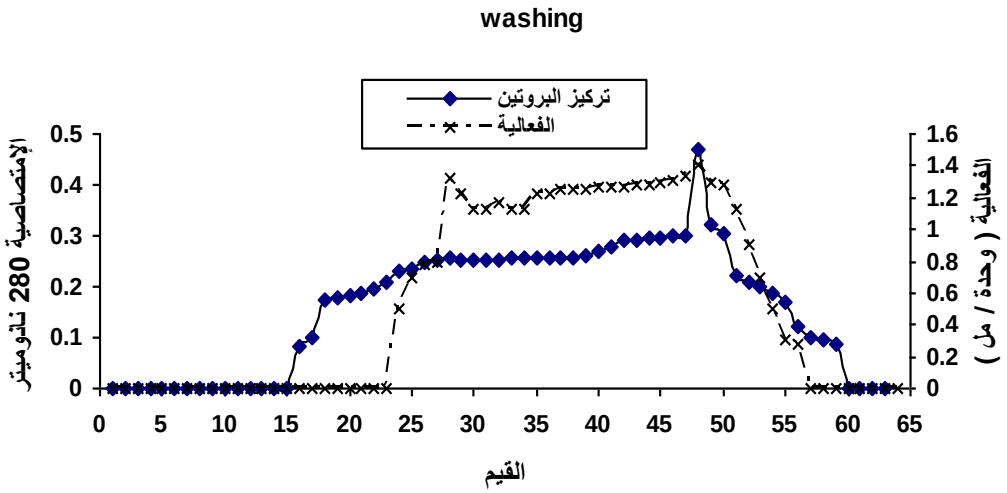
تنقية الإنزيم

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 دارئ ترس- هيدروكسيد الصوديوم(0.05 مولر وبرقم هيدروجيني 9). استعمل المبادل المذكور لما يتميز به من ميزات عدة جعلته من أكثر أنظمة الكروموتوغرافيا شيوعا 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) فضلا 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). وبتقدير 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 % فضلا 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 بروتييز 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

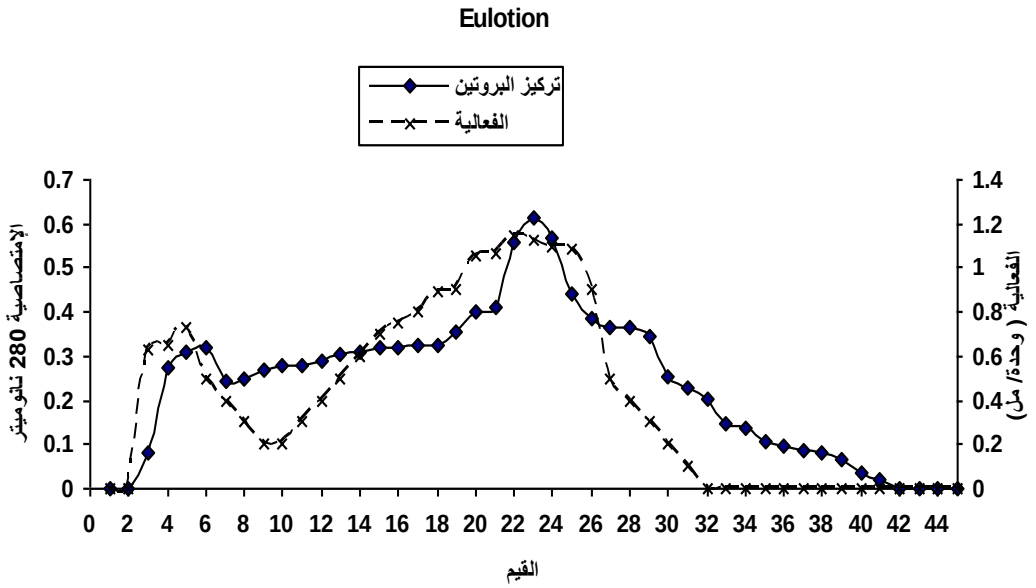
البروتييز المنتج من الفطر *T. viride* والنامي على وسط حاوي على مصادر مختلفة للبروتين وجود عدة قمم للفعالية الإنزيمية في مرحلة الاسترداد (29). لوحظ أن اللون الأخضر المتبقي في محلول الإنزيم بعد خطوة إزالة الملح قد ارتبط بالمبادل مما يكسب المبادل ميزة لها فائدة في التخلص من الألوان التي تتداخل مع قراءة 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 البروتييز 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 والديلزه	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 الإسترداد بالمبادل	10	1.5	0.004	375	15	41.6	20.8



شكل (5) كروموتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Trichoderma harzianum* باستعمال عمود ال DEAE- Cellulose (صورة A)

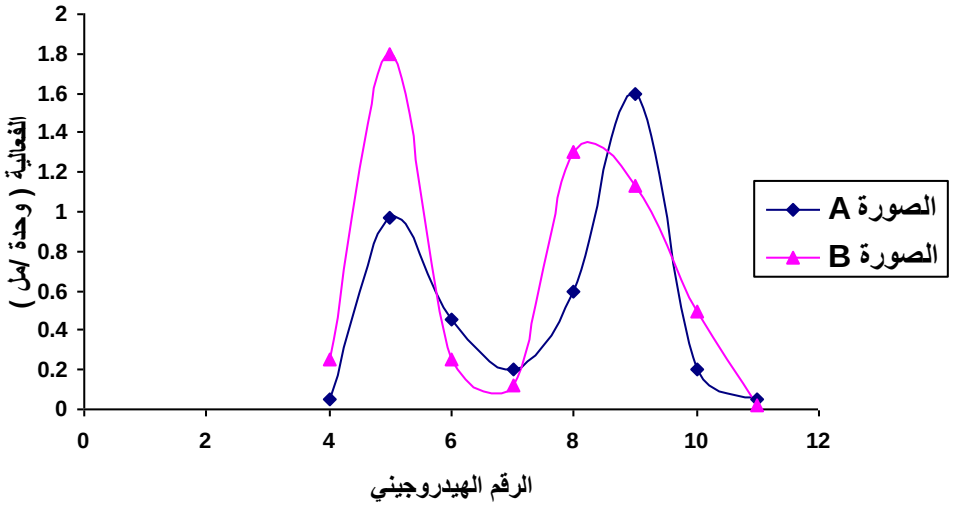


شكل (6) كروموتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Trichoderma harzianum*

باستعمال المبادل DEAE- Cellulose (صورة B)

تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتييز

بينت نتائج التجربة (شكل 7) إن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى جزئيا باستعمال المبادل الأيوني لصورتي 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 صورتي الإنزيم A و B على التوالي. يمتلك كل إنزيم رقما هيدروجينيا مثاليا واحدا لفعاليته، بيد إن بعض الإنزيمات تمتلك أكثر من ذلك، وعادة ما يكون هذا الرقم بمدى ضيق تماما إلا أن بعض الإنزيمات تبدي مدى واسع له (30).بين (31) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنزيم البروتييز المنتج من نفس الفطر يقع مابين الرقمين الهيدروجينيين 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).

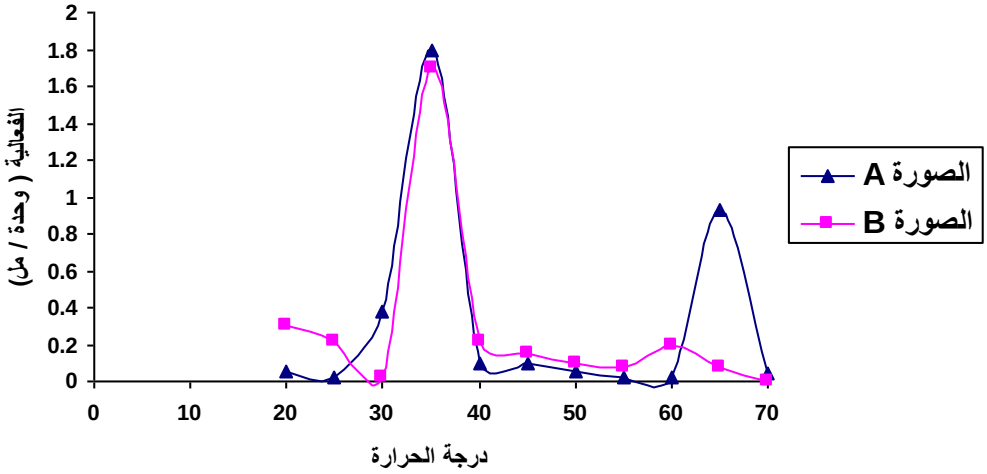


شكل (7) تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتييز المنقى جزئيا لصورتي الإنزيم A و B

باستعمال المبادل الأيوني DEAE- Cellulose .

تأثير درجة الحرارة في فعالية إنزيم البروتييز

أظهرت النتائج (شكل 8) إن درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم البروتييز المنقى جزئيا باستعمال المبادل الأيوني لصورتي الإنزيم A و B هي 35 مْ 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 البروتييز المنقى جزئيا لصورتي 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 مْ . تؤثر درجة الحرارة على فعالية الإنزيم من خلال تأثيرها في أكثر من مركب فهي تؤثر في الإنزيم، والمادة الأساس، ومعقد الإنزيم – المادة الأساس ، ومعقد الإنزيم – الناتج وينعكس هذا التغيير سلبا أو إيجابا 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, 2nd 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. 2nd 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 البروتييز 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. 3rd. 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 البروتييز 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 *Trichophton 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، مها رؤوف 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. McGrow-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.