دراسة الظروف المثلى لانتاج البروتيز المتعادل من العزلة المحلية *Aspergillus niger var. carbonarius*

عصام فاضل الجميلي* خالد عبد الزراق حبيب** شيماء اسماعيل كاظم**

تاريخ قبول النشر 2008/4/2

الخلاصة:

درست الظروف المثلى لانتاج البرويتيز المتعادل من العزلة المحلية *Aspergillus niger var. carbonarius* على وسط التخمر الصلب (نخالة الحنطة) المرطب بمحلول داريء الفوسفات بنسبة ترطيب 1:5 (حجم / وزن) برقم هيدروجيني 6.5 ودرجة حرارة 30 °م وحجم لقاح 1 × 10^6 بوغ / 10 غم مادة صلبة لمدة 96 ساعة اذ بلغت الفعالية الانزيمية 1300 وحدة/ مليلتر وبفعالية نوعية 1550 وحدة/ملغم بروتين.

المقدمة

تعد الاحياء المجهرية مصدراً مثالياً لانتاج الانزيمات كونها تتكاثر بسرعة كبيرة وبوقت قصير **[1]** تختلف البروتييزات المتعادلة والقاعدية المنتجة من البكتريا والفطريات في مديات الرقم الهيدروجيني الامثل لفعاليتها وثباتها**[2]** . اما البروتييزات المتعادلة المنتجة من الاعفان فيتم الحصول عليها بصورة رئيسة من الاجناس***Aspergillus*** و ***Penicillium*** اما البروتييزات المتخصصة مثلKeratinase المنتج من البكتريا ***Streptomyces fradiae*** والذي يعمل على تحليل الكيراتين لهذا يستعمل في عملية ازالة الشعر من الجلد الحيوان **[3]**.

استعملت نسب ترطيب مختلفة في تخمرات المواد الصلبة، فقد بين **Malathi and Chakraborty [4]** تأثير نسب ترطيب مختلفة تراوحت بين 35 – 80 % على انتاج البروتييز القاعدي من احدى سلالات ***A.flavus*** في حين درس Battaglino **[5]** تأثير نسب ترطيب مختلفة تراوحت بين 25 – 50% على انتاج انزيم البروتييز القاعدي من احدى سلالات ***A.oryzae*** ولدراسة انتاج انزيمات اللايبيز والبروتييز من انواع مختلفة من الفطريات كانت نسبة الترطيب المستعملة 50% عند تنميتها في وسط نخالة الحنطة **[6]** .

تتراوح قيم الرقم الهيدروجيني لاوساط تخمرات الحالة الصلبة غالبا تتراوح بين 5 – 7 لانتاج بروتين الخلية الواحدة Single cell protein من الفطر ***Chaetomium cellulolyticum*** يكون في وسط رقمه الهيدروجيني مقداره 5 حاوي على املاح الفوسفات والامونيا **[7]** . في دراسة Rivera – Munoz واخرون **[8]** لانتاج اللايبيز والبروتييز زرعت الفطريات في وسط نخالة الحنطة برقم هيدروجيني مقداره 7 حاوي على املاح الفوسفات .

وبصورة عامة تعد درجة 29 ±1 درجة ملائمة لانتاج العديد من الانزيمات كالبروتييز **[5]**، وانزيم ببتا – كلوكوسيديز **[8]** و اللايبيز **[6]** ،

* معهد الهندسة الوراثية والتقنية الاحيائية للدراسات العليا/ جامعة بغداد.
** كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد.

والانزيمات المحللة للكنين [9 و10] وانزيمات مختلفة اخرى [11] .
هدفت الدراسة الحالية التعرف علـى الظـروف المثلى لانتاج البروتييز المتعـادل مـن العزلـة المحليــة *Aspergillus niger var. carbonrius* باستعمال تقنية تخمـرات الحالـة الصلبة .

المواد وطرائق العمل

تم استخدام العزلة المحلية *Aspergilus niger var. carbonarius* في انتاج البروتييز والمعزولة من جلود الحيوانات . طُبق نظام تخمرات الحالة الصلبة في دوارق حجمية سعة 250 مللتر مزودة بسدادات قطنية وبواقع مكررين لكل معاملة . واستعملت مادتان صلبتان هما نخالة الحنطة والذرة الصفراء بوصفهما مادتين اساسيتين اوليتين لتحديد المناسب منها لانتاج انزيم البروتيز، واستعملت المواد الصلبة بمقدار 10 غم/دورق كلا على حدة .
ورطبت المواد الصلبة المذكورة اعلاه باستعمال محلول دارىء الفوسفات بتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 7 ، وبنسبة ترطيب 5 : 1 (حجم /وزن) وذلك باضافة 50 مل من محلول دارىء الفوسفات إلى 10 غم من المادة الصلبة ، ومزج سائل الترطيب مع المواد الصلبة وعقمت الدوارق بالموصدة بدرجة حرارة 121 ° م وضغط 15 باوند / انج^2 مدة 15 دقيقة .
ولقحت الدوارق ولجميع المعاملات اعلاه بعالق الابواغ بواقع 10^6 بوغ/10 غم مادة صلبة وحضنت بدرجة حرارة 30 ° م خلال 72 ساعة.
اتبعت الطريقة الورادة من قبل Murachi [12] في تقدير فعالية البروتيـز المتعـادل باسـتخدام كازين 0.5% بوصفها مادة اسـاس و تعـرف الوحدة الانزيمية : بانها كمية الانزيم التي تسـبب زيادة في الامتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانوميتر مقدارها 0.01 في الدقيقـة تحـت الظروف القياسية. كما يمكن قياس تركيز البروتين فقد قدر وفـق الطريقـة الموصـوفة مـن قبـل Bradford [13].

اختيار سائل الترطيب :

استعملت خمسة محاليل للترطيب بعد تعديل الرقم الهيدروجيني لها ليصل إلى 7 وشلمت (الماء المقطر) و(ماء الحنفية) و (محلول دارىء الفوسفات بتركيز 0.2) و (محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.05 مولاري) و (محلول الكلايسين بتركيز 1 مولاري). وذلك لاختيار سائل الترطيب المناسب ، انتخب وسط التخمر نخالة الحنطة ورُطب بسوائل الترطيب المذكورة اعلاه بنسبة5 : 1 (وزن/ حجم) سائل ترطيب/مادة صلبة . ثم عُقم الوسط بالموصدة بدرجة حرارة 121 ° م وضغط 15 باوند/انج^2 مدة 15 دقيقة .ثم لقحت الدوارق ولجميع المعاملات اعلاه بعالق الابواغ بواقع 1×10^6 بوغ/10 غم مادة صلبة وحُضنت بدرجة حرارة 30 ° م مدة 72 ساعة .

تعيين الظروف المثلى لانتاج البروتييز في وسط التخمر الصلب

اجريت دراسة تأثير بعض العوامل كنسبة الترطيب والرقم الهيدروجيني للوسط وحجم اللقاح ودرجة الحرارة ومدة التخمر على انتاج البروتييز من قبل العزلة المحلية ***A.niger* var *carbonarius*** باستعمال نخالة الحنطة وسطا صلبا بواقع (10) غم لكل دورق واستعمال محلول دارىء الفوسفات في الترطيب ،اذ ثبتت جميع الظروف المشار اليها اعلاه باستثناء العامل المطلوب دراسة تأثيره .

تعيين نسبة الترطيب المثلى لانتاج الانزيم

رُطب وسط نخالة الحنطة بمحلول دارىء الفوسفات وبنسب الترطيب الاتية : 1:4 و 4.5 : 1 و 5 :1 و 5.5 : 1 و 6 : 1 (حجم / وزن) سائل ترطيب / مادة صلبة ولقحت الدوارق بعالق الابواغ بواقع 1 × 10^6 بوغ/10 غم مادة صلبة وحُضنت المزارع بدرجة حرارة 30 °م لمدة 72 ساعة ثم استخلص الانزيم وتم تقدير الفعالية والفعالية النوعية .

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم

تم تحضير وسط نخالة الحنطة بارقام هيدروجينية تراوحت من (5.5 – 8) باضافة محلول دارىء الفوسفات تركيز 0.2 مولاري ولقحت الدوارق بعالق الابواغ بواقع1 × 10^6 بوغ/10 غم مادة صلبة و حُضنت بدرجة حرارة 30 ° م مدة 72 ساعة ثم استخلص الانزيم وقدرت الفعالية الانزيمية والنوعية.

تعيين درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم

لقح وسط نخالة الحنطة بعالق الابواغ 1 × 10^6 بوغ/10 غم مادة صلبة وحُضنت بدرجات حرارة مختلفة (25 و 28 و30 و32 و35) °م وخلال 72 ساعة ثم استخلص الانزيم وقدرت الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية .

تعيين حجم اللقاح الامثل لانتاج الانزيم

لقح وسط نخالة الحنطة المرطب بمحلول دارىء الفوسفات بنسبة 5 : 1 (حجم / وزن) والمعقم بالموصدة باعداد مختلفة من ابواغ الفطر تراوحت من (1 × 10^3 —— 1 × 10^7) بوغ /غم وزن رطب وحُضنت المزارع تحت درجة حرارة 30 ° م خلال 72 ساعة ثم استخلص الانزيم وتم تقدير الفعالية الانزيمية والفعالية النوعية .

تعيين مدة التخمر المثلى لانتاج الانزيم :

حُضنت الدوارق الحاوية على وسط التخمر الصلب (نخالة الحنطة) بعد تلقيحها بواقع1 × 10^6 بوغ /10غم مادة صلبة بدرجة حرارة 30 °م لفترات زمنية مختلفة هي 24 و 48 و 72 و 96 و120 ساعة بعد ان ثبتت الظروف البيئية الاخرى من درجة حرارة ورقم هيدروجيني وحجم اللقاح .

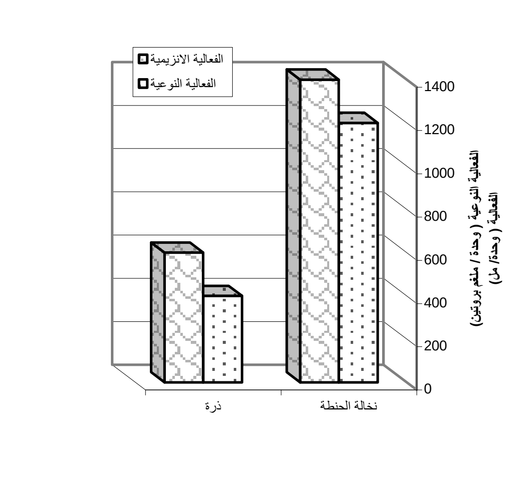
النتائج والمناقشة

لغرض دراسة كفاءة العزلة المحلية المنتخبة ***Aspergillus niger*** var. ***carbonarius*** على انتاج انزيم البروتييز باستعمال تقنية تخمرات المزارع الصلبة فقد استعملت مخلفات وموادا نباتية أوساطا زرعية لاختبار افضل وسط تخمر صلب لانتاج أنزيم البروتييز من هذه العزلة وهي (نخالة الحنطة ومسحوق الذرة الصفراء) أوساطا صلبة كلا على حدة ، وتبين أن وسط نخالة الحنطة هو افضل وسط تخمري صلب لانتاج الأنزيم مقارنة مع الوسط الأخر إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1500 وحدة / مل وبفعالية نوعية 1200 وحدة / ملغم بروتين . بينما بلغت الفعالية الأنزيمية لمسحوق الذرة الصفراء 550 وحدة/ مل والفعالية النوعية 490 وحدة /ملغم بروتين الشكل (1) .وقد يعود سبب تفوق نخالة الحنطة على الوسط الاخر (الذرة الصفراء) إلى المحتوى العالي من البروتينات اذ تبلغ نسبة البروتين فيها (14.62)% بالمقارنة مع الذرة الصفراء التي تبلغ نسبة البروتين فيها (9.93)%. كما ان للخواص الفيزيائية للمواد المستعملة في تخمرات المــزارع الصلبة تأثــيرات مختلفة في انتاج الانزيمات مثل حجم الــدقائق والمساحة السطحية التي تتعرض لفعل الاحياء الــمجهــرية ومــســامــية الــوسط **[14 و 15و16]**

وجد في احدى هذه الدراسات ان وسط نخالة الحنطة افضل من وسط فول الصويا في انتاج انزيمي البروتييز المتعادل و القاعدي اذ يعطي انتاجية تفوق انتاجية فول الصويا بما يقارب مرة ونصف من سلالة العفن *A.flavus* .var. *columunaris* **[17]**.

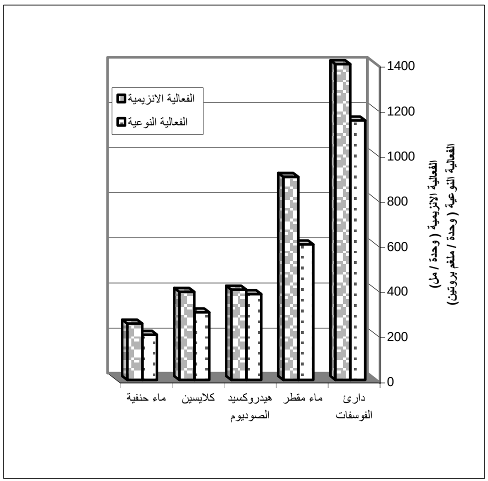
كما وجد ان وسط نخالة الحنطة في تنمية وانتاج انزيم البروتييز من قبل العفن *A.oryzae* يعد الافضل من بين اوساط التخمرات الصلبة الاخرى **[19,18]** .

استعملت خمسة أوساط سائلة لترطيب وسط التخمر (نخالة الحنطة) وبنسبة ترطيب (5 : 1) (حجم / وزن) سائل ترطيب/ مادة صلبة، ويشير الشكل(2) إلى تفوق الوسط المرطب بمحلول دارىء الفوسفات برقم هيدروجيني 7 على بقية سوائل الترطيب الأخرى إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1450 وحدة / مل في حين كانت الفعالية النوعية 1180 وحدة /ملغم بروتين ويأتي بعده الماء المقطر إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 950 وحدة / مل والفعالية النوعية 650 وحدة/ملغم بروتين ثم تلاه سائل ترطيب هيدروكسيد الصوديوم ثم الكلايسين و أخيرا ماء الحنفية . وقد يعود تفوق الوسط المرطب بمحلول دارىء الفوسفات إلى الدور المهم لاملاح الفوسفات في عمليات التمثيل الغذائي والفعاليات الحيوية فهي تدخل في تركيب العديد من المكونات الخلوية المهمة مثل الحوامض النووية ومركبات الطاقة ATP و GTP و الدهون الفوسفاتية ، فضلا عن ذلك فان هذه الاملاح لها دور في المحافظة على الرقم الهيدروجيني للوسط ضمن الحدود المتعادلة والقاعدية وتعطي هذه المميزات دعما لنمو وفعاليات ايضية افضل للكائن وتنعكس ايجابا على انتاج الانزيم .



الشكل (1) : يوضح إنتاج أنزيم البروتييز في العزلة المحلية *Aspergillus niger* var. *carbonarius* باستعمال الذرة الصفراء ونخالة الحنطة المرطب بمحلول داريء الفوسفات وبنسبة (5 : 1) (حجم : وزن)

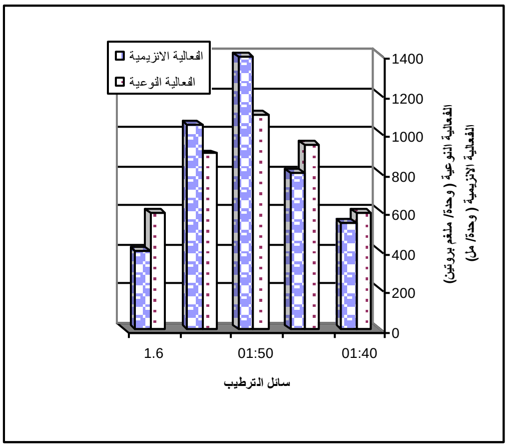
ان انخفاض انتاج الانزيم في الوسط المرطب بمحلول دارىء الكلايسين يعود إلى ان الكلايسين يكبح انتاج الانزيم (Catabolic repression) ، وقد لوحظت هذه الظاهرة في دراسات اخرى ايضا اذ ادى وجود الكلايسين في الوسط الزرعي إلى خفض فعالية البروتييز إلى النصف مقارنة بالسيطرة عند تنمية ثلاث سلالات من ***A.niger*** **[20]**.



الشكل (2): إنتاج أنزيم البروتييز من العزلة المحلية *Aspergillus niger* var. *carbonarius* عند تنميتها في وسط (نخالة الحنطة) المرطب بمحاليل مختلفة بنسبة (5 :1) (حجم : وزن).

استعمل محلول الترطيب (داريء الفوسفات ذي رقم هيدروجيني7) لترطيب وسط التخمر نخالة الحنطة وبنسب الترطيب آلاتية: (4 : 1 و 4.5 : 1 و 5 : 1 و 5.5 : 1 و 6 :1) حجم وزن (سائل ترطيب/مادة صلبة) (الشكل 3) .

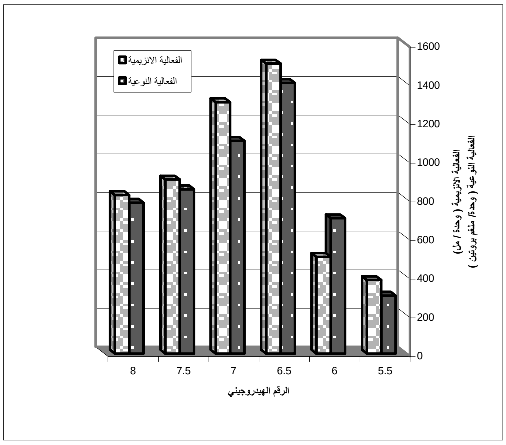
و يُلاحظ من خلال الشكل زيـــــادة إنتاج الأنزيم مع زيادة نــــسبة الــترطيب لغاية النسبة5 : 1 (حجم : وزن) اذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1450 وحدة/ مل وبفعالية نوعية 1200 وحدة / ملغم بروتين، كما لوحظ انخفاض إنتاج الأنزيم بزيادة نسبة الترطيب عن (5 : 1) إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 500 وحدة/ مل وفعالية نوعية 700 وحدة / ملغم بروتين عند نسبة الترطيب (6 : 1) (حجم / وزن) . يعزى انخفاض انتاج انزيم البروتييز عند انخفاض نسبة الترطيب إلى قلة الماء الحر (Water activity) المتوفرة التي تكون ضرورية لفعالية الكائن المنتج ونشاطه ، كما درست تأثير نسبة الترطيب في انتاج انزيم البروتييز من الفطر ***A.oryzae*** بتنميته في وسط سحالة الرز مع قشوره بدرجة 27 ° م وجد ان اعلى انتاج للانزيم عندما كانت الرطوبة الأبتدائية 35 – 40 % وعندما ازداد المحتوى المائي عن هذه النسبة انخفض انتاج الانزيم **[5]** . .وفي دراسة اخرى عن تأثير نسبة الرطوبة في انتاج البروتييز القاعدي من سلالة العفن ***A.flavus*** بتنميتها في وسط نخالة الحنطة لوحظت زيادة طفيفة في فعالية الانزيم عندما كانت نسبة الرطوبة 52 % وتسارعت الزيادة عند نسبة رطوبة (63 - 70) % بدرجة 28 و 32 ° م **[5]** .



الشكل (3): تأثير نسب الترطيب المختلفة لوسط التخمر (نخالة الحنطة) على إنتاج أنزيم البروتييز من العزلة المحلية *Aspergillus niger* var. *carbonarius* باستعمال سائل الترطيب محلول دارىء الفوسفات برقم هيدروجيني 7.

دُرس تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج أنزيم البروتييز باستعمال وسط نخالة الحنطة بأرقام هيدروجينية مختلفة (5.5 ــ 8) ، إذ أظهرت النتائج أن أعلى إنتاجية للأنزيم كانت عند رقم هيدروجيني 6.5 ،إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1600 وحدة/مل بينما بلغت الفعالية النوعية 1500 وحدة/ملغم بروتين. حدث انخفاض واضح في إنتاج الأنزيم عند رفع الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 8 إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 900 وحدة / مل وبفعالية نوعية 800 وحدة / ملغم بروتين الشكل (4) .

ووجد في دراسة لانتاج انزيم البكتينيز من الفطر ***A.niger*** على وسط التخمر الصلب نخالة الحنطة بان الرقم الهيدروجيني الابتدائي الامثل للانتاج هو 6.5 – 7 ولمدة حضانة 48 ساعة **[21]** .

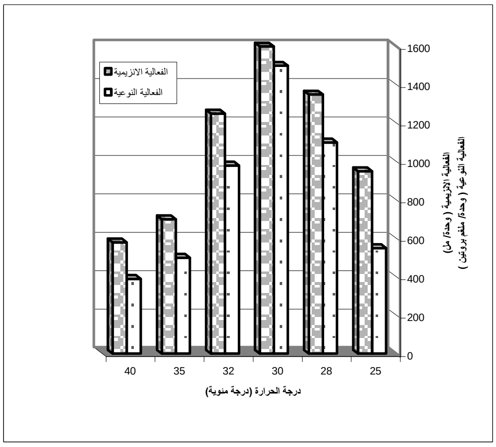


الشكل (4): إنتاج أنزيم البروتييز من العزلة المحلية *Aspergillus niger* var. *carbonarius* عند تنميتها في وسط (نخالة الحنطة) المرطب بمحلول داريء الفوسفات بنسبة (5 : 1) حجم/وزن وبأرقام هيدروجينية مختلفة .

يلاحظ من الشكل (5) بأن إنتاجية أنزيم البروتييز من الفطر ***Aspergillus niger*** var. ***carbonarius*** TFS1 تزداد بارتفاع درجة الحرارة من 25 ـــــ 30 م ، كما حصل انخفاض في كل من الفعالية الأنزيمية والفعالية النوعية عند ارتفاع درجة الحرارة عن 30 م . يلاحظ ان درجة الحرارة المثلى لأنتاج الانزيم كانت 30 م اذ بلغت الفعالية الانزيمية 1610 وحدة / مل وبفعالية نوعية 1500 وحدة / ملغم بروتين ، وحصل انخفاض في كل من الفعالية الانزيمية والنوعية للانزيم عند ارتفاع درجة الحرارة عن 30 م .

ان الانخفاض في درجات الحرارة عن الدرجة المثلى يؤدي إلى تباطؤ النمو وتأخر تخليق الانزيم لعدم ملائمة هذه الدرجة لنمو الفطر من جهة وانخفاض ثبات الانزيم من جهة اخرى .

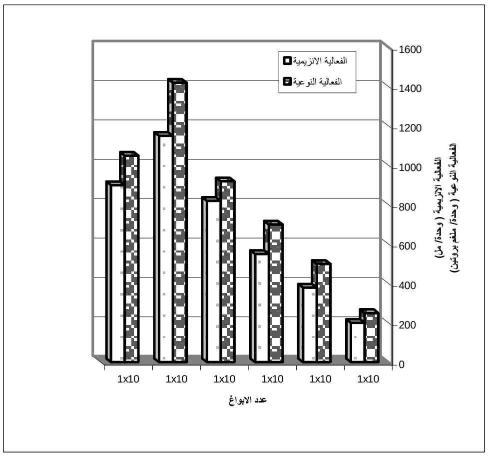
تتفق درجة الحرارة المثلى لأنتاج انزيم البروتييز في هذه الدراسة وهي 30 م مع نتائج دراسات اخرى تناولت انتاج انزيمات البروتييز من انواع الجنس ***Aspergillus*** حيث تراوحت درجات الحرارة المثلى لانتاج هذه الانزيمات بين 28 – 30 م ، واشارت هذه الدراسات إلى انخفاض فعالية الانزيم عند ارتفاع وانخفاض درجة الحرارة عن هذه الحدود **[21,4]**. يؤثر ارتفاع درجة الحرارة في انتاج الانزيم اكثر من انخفاضها وهو ما لوحظ في هذه الدراسة عند رفع درجة حرارة المزرعة إلى 40 ° م لعدم ملائمة هذه الدرجة لنمو العفن من جهة وانخفاض ثبات الانزيم المنتج من جهة اخرى مقارنة بالدرجات الاوطأ.



الشكل (5): إنتاج أنزيم البروتييز من العزلة المحلية *Aspergillus niger* var. *carbonarius* عند تنميتها في وسط (نخالة الحنطة) المرطب بمحلول داريء الفوسفات بنسبة (5 :1) حجم/وزن وبرقم هيدروجيني 6.5 وبدرجات حرارية مختلفة.

أظهرت نتائج تلقيح وسط الإنتاج بأعداد مختلفة من الابواغ تراوحت بين (1×10^2 ـــــ 1×10^7) بوغ/ 10 غرام مادة صلبة الشكل (6) زيادة في إنتاج الأنزيم مع زيادة عدد الابواغ المضافة للوسط لحد 1×10^6 بوغ / 10 غرام مادة صلبة إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1200 وحدة / مل بينما بلغت الفعالية النوعية 1500 وحدة/ ملغم بروتين .بينما انخفضت كل من الفعالية الأنزيمية إلى 950 وحدة / مل وبفعالية نوعية 1100 وحدة / ملغم بروتين عند زيادة عدد الابواغ إلى 1×10^7 بوغ / 10 غرام مادة صلبة . ولوحظ ازدياد

انتاج الانزيم مع زيادة عدد الابواغ المضافة للوسط لحد 1 × 10^6 بوغ /10 غرام مادة صلبة

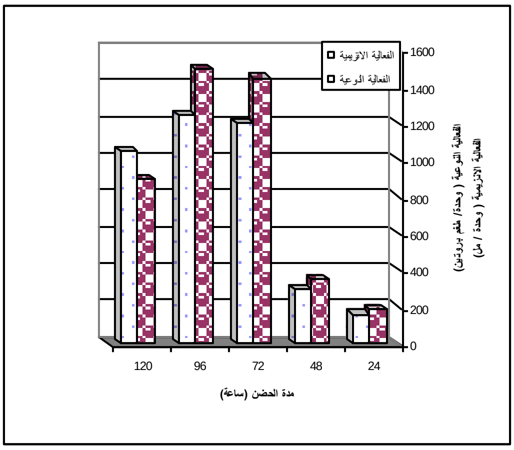


الشكل (6) : إنتاج أنزيم البروتييز من العزلة المحلية *Aspergillus niger* var. *carbonarius* عند تنميتها في وسط (نخالة الحنطة) المرطب بمحلول داریء الفوسفات بنسبة (5 : 1) حجم/وزن وبرقم هيدروجيني 6.5 وتلقيحه بأعداد مختلفة من الابواغ .

بلغت الفعالية الانزيمية 1200 وحدة/ مل وبفعالية نوعية 1500 وحدة/ملغم بروتين انخفضت بعدها إلى 950 وحدة/ مل .كما بينت النتائج أن اضافة عدد قليل من الابواغ (10^4 – 10^2) إلى الوسط لا يعطي انتاجية عالية للانزيم مقارنة بالاعداد الاكثر ويعود ذلك إلى ان عدد الخلايا القليل لايؤدي إلى نمو كثيف للكائن واستغلال مكونات الوسط بكفاءة عالية مما أنعكس على انتاج المواد الايضية وبضمنها الانزيمات**[22]**.

تأتي النتائج متوافقة مع نتائج دراسات اخرى بينت ان هذا العدد من الخلايا هو الامثل لاعطاء اعلى انتاجية لانزيم البروتييز من احدى سلالات العفن ***A.oryzae*** عند تنميتها في اوساط مختلفة من اوساط تخمرات الحالة الصلبة **[18 و 5]**

بينت النتائج بان مدة التخمر المثلى التي أعطت أعلى إنتاجية لأنزيم البروتييز من العزلة ***Aspergillus niger*** var. ***carbonarius*** على وسط نخالة الحنطة كانت 96 ساعة بدرجة حرارة 30 ° م ، إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1300 وحدة / ملغم بروتين ثم حصل انخفاض في إنتاجية الأنزيم مع زيادة مدة التخمر إلى 120 ساعة إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1100 وحدة / مل وبفعالية نوعية 950 وحدة / ملغم بروتين .الشكل (7) .



الشكل (7): إنتاج أنزيم البروتييز من العزلة المحلية *Aspergillus niger* var. *carbonarius* عند تنميتها في وسط (نخالة الحنطة) المرطب بمحلول داریء الفوسفات بنسبة (5 : 1) حجم/وزن وبرقم هيدروجيني 6.5 وحضنها بدرجة حرارة 30 ° م ولمدة تخمر مختلفة .

كما بينت النتائج بأن مدة التخمر المثلى لانتاج انزيم البروتييز هي 96 ساعة ، اذ بلغت الفعالية الانزيمية 1300 وحدة/مل وبفعالية نوعية 1550 وحدة/ملغم بروتين ثم اخذت بالهبوط التدريجي مع تقدم مدة الحضن إلى 120 ساعة شكل (7) .

تفسر الزيادة الواضحة في انتاج الانزيم خلال الطور الخضري بأن سرعة بناء الحوامض الامينية في الخلايا الخضرية يقدر بعشرة امثال ما هو عليه في الابواغ وبذلك يكون تخليق البروتينات في الخلايا الخضرية اسرع من تخليقه في الابواغ وكلما كانت سرعة النمو اللوغاريتمي عالية كانت سرعة تخليق الانزيم

اعلى، ويصل انتاج الانزيم اقصاه في طور الثبات ثم ينخفض**[24]**.

جاءت نتائج هذه الدراسة متفقة مع نتائج دراسات اخرى اذ وصل انتاج انزيم البروتييز لاحدى سلالات ***A.oryzae*** اقصاه بعد مرور 96 ساعة عندما لقح الوسط بـــ 1 × 10^6 بوغ /غم من الوسط المرطب بنسبة 1 : 3 (وزن :حجم) وحضن بدرجة حرارة 30 °م **[18]**.

المصادر

1. Rehm , H.J.; Reed,G ; Puehler,A. and Stadler,P. 1993. Biotechnology. 2nd Ed.Vol. I: Biological fundamentals .VCH.Vevlag,Weinheim,Germany.

2. Bergkvist ,R . 1961 . Enzymes in pre – tanning . Swedish patent No.11134.

3. Pfleiderer , E . and Reiner,R. .1988 . Microorganisms in processing of leather . In : Biotechnology (ed.H.J.Rehm) .Vol – 6a : 730 – 743 .Verlag Chemie , Weinheim Deerfield Beach .

4. Malathi ,S.and Chakraborty,R. .1991 . Production of alkaline protease by a new Aspergillus flavus isolate under solid – state fermentation conditions for uses of depilation agent .Appl .Environ . Microbiol .55(3) : 712 – 716 .

5. Battaglino , R .A. ; Huergo,M.; Pilosof, A,M,R. .and Bartholomai, G.B. 1991 .Culture requirements of production of protease by Aspergillus oryzae in SSF.Appl . Microbiol . Biotechnol . 35 : 292 – 296 .

6. Rivera – Munoz , G ; Tinico – Valencia, J.R. ; Sanchez, S. and Farres,A. .1991 . Production of microbial lipases in solid state fermentation system. Biotechnol Lett . 13 (4) : 277 – 280 .

7. Pamment ,N . ; Robinson, C.W. ; Hilton, J. and Moo young, M. 1978. Solid state cultivation of Chaetomium cellulyticum on alkalin protreated saw dust . Biotechnol – Bioeng . 20 : 1735 – 1744 .

8. Macris ,B . J. ; Kekos, D. ; Evangelidou, X. ; Panayotou, M.G. and Rodis, P. 1987 .Solid state fermentation of straw with Neurospora crassa for CMCase and B- glucosidase production .Biotechnolett. 9 (9) :661 – 664 .

9. Kerem ,Z .; Friesem,D. and Hadar,Y. 1992. Lignocellulose degredation during SSF: Pleurotus ostreatus versus phanerochaete chrysosporium .Appl . Environ . Microbiol. 58 (4) : 1121 – 1127 .

10. Agosin , E. and Odier,E. 1985.Solid – state fermentation, lignin degredation and fermented by selected white – rot fungi . Appl .Microbiol . Biotechnol . 21 : 379 – 403 .

11. Considine ,P.J;Buckley,R.J.; Griffin,T.O.; Touhy, M.G. and Coughlan,M.P. 1989. A Simple And Inexpensive Method Of Solid State Cultevation .Bio technol .Tech.3:85 – 90.

12. Murachi ,T. 1970 . Bromelain enzymes . In : Methods in Enzymology (ed . G.E . Perlman and L . Lorand).19 : 273 – 284 .Academic Press . New york.

13. Bradford , M. 1976 . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle protein . dybinding . Analytical Biochemistry , 72 : 248 – 254 .

14.الصفار ، منتهى عبد الكريم ، 1998. انتاج انزيم الفا – اميليز من *Bacillus* MAG3 *stearothermophilus.* بوساطة تخمرات

الحالة الصلبة وتنقيته . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد .

15. Kumar ,P.K.R. and Lonsane, B.K. 1987 . Gibberellic acid by solid state fermentation : Consistent and improved yields .Biotech . Bioeng .30(2) : 267 – 271.

16. Nigam , P.and Singh,D. 1994 Solid state (substrate) fermentation systems and their application in biotechnology . J. Basic Microbiol . 34 (6) : 405 – 423 .

17. Bhumiratana ,A.; Flegel, T.W.; Glinsukon, T. and Somporan,W. 1980 . Isolation and analysis of molds from soysauce Koji in Thiland .Appl . Environ . Microbiol . 39 : 430 – 435 .

18. حسن ، شذى سلمان (1996) . انتاج وتنقية وتوصيف البروتييز القاعدي من العفن *Aspergillus oryzae* بطريقة تخمر المواد الصلبة . رسالة دكتوراه . كلية العلوم. جامعة بغداد.

19. Hong Bai ; Shi – Jun Ge and Long – Xiang Zhang . 1999 . Total hydrolysis of food proteins by the combined use of soluble and immobilized protease . International Journal of Food Science and Technology . 34: 95 – 99.

20. Chopra ,S. and Mehta, P. 1985 .Influence of Various nitrogen and carbon sources on the production of pectolytic .Cellulolytic and proteolytic enzymes by Aspergillus niger. Folia Microbiol . 30 : 117 – 125 .

21. Viviana,M.and Ana, M.R. 1999. Application Of Doehlert Designs For Water Activity .PH,And Fermentation Time Optimization For Aspergillus niger Pectinolytic Activities Production In Solid – State And Submerged Fermentation . Enzyme And Microbial Technology .Vol.25:411 – 419.

22. Abdullah ,A.L. ; Tangerdy, R.P. and Murphy, V.G. 1985 .Optimization of solid substrate fermentation of Wheat straw .Biotechnol . Bioeng .27(1): 20 – 27 .

23. Sharma,O . P . and Sharma, K.D. 1980 . Changes In Properties Of Finished Indian Leather In Store Due To Fungal Infestation . Interna . Biodeter .Bulletin :ISSN. Vol.16.(3) : 73 – 78 .

24. Emtseva ,T.V.and Konovalov, S.A. . 1979 .Alkaline proteinases of microbiological origin (survey) .Appl. Biochem. Microbiol . 14 (5) : 511 – 523 .

Optium Conditions for the Production of Neutral Protease from local strain *Aspergillus niger var cabonarius*

Essam F. Al-Jumaily* ***Khalid A. Habeb***** ***Shaimaa E. Kadhum*****

*Biotechnology Dept., Genetic Engineering and Biotechnology Institute, Baghdad University
** Biology Dept., College of Science for Women, Baghdad University

Abstract

The optimum conditions for the production of neutral protease from local strain *Aspergillus niger var carbonarius* by solid – state fermentation system (Wheat bran) moisted with 0.2 M phosphate buffer (PH7.0) . the hydration ratio was 1:5 (V:W) . the concentration of inoculum was 1×10^6 spores per 10 gram of solid materials , initial P H 6.5 and 96 hours of incubation period at 30° C .the enzyme activity was 1300 unit / ml and specific activity was 1550 unit / mg protein .