



# إنتاج وتنقية وتوصيف بروتين الأسبارتك من عفن *Aspergillus terreus* المعزول محلياً واستعماله في تطرية اللحوم

أطروحة مقدمة الى  
مجلس كلية الزراعة – جامعة البصرة  
وهي جزء من متطلبات شهادة دكتوراه فلسفة في علوم الاغذية  
( تقانات احيائية )

من قبل  
صادق فنجان حسناوي حسوني  
ماجستير علوم أغذية  
2017

بإشراف

أ.م. د. زينة كاظم اليونس

أ.د. علاء جبار عبد المنهل

2024 م

1445 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ

أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ

خَيْرٌ ﴿

بسم الله الرحمن الرحيم

## إقرار المشرف

نشهد أنّ إعداد هذه الاطروحة الموسومة (إنتاج وتنقية وتوصيف بروتين الأسبارتك من عفن *Aspergillus terreus* المعزول محلياً واستعماله في تطرية اللحوم ) المقدمة من قبل الطالب ( صادق فنجان حسناوي حسوني ) قد جرى تحت إشرافنا في جامعة البصرة – كلية الزراعة /قسم علوم الأغذية وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الأغذية .

التوقيع :

التوقيع :

الاسم:أ.د.علاء جبار عبد المنهل

الاسم:أ.م.د.زينة كاظم اليونس

المرتبة العلمية:استاذ

المرتبة العلمية:استاذ مساعد

العنوان: كلية الزراعة – جامعة البصرة

العنوان: كلية الزراعة – جامعة البصرة

التاريخ: / / 2024

التاريخ: / / 2024

توصية رئيس القسم

إشارة الى التوصية المقدمة من قبل الأساتذة المشرفين أحيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها و بيان الرأي فيها .

التوقيع :

الاسم: أ.م.د. وائل علي سوادي الوائلي

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

العنوان: كلية الزراعة – جامعة البصرة

التاريخ: / / 2024

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار لجنة مناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين ادناه نشهد بأننا اطلعنا على أطروحة الطالب(صادق فنجان حسناوي حسوني) الموسومة (إنتاج وتنقية وتوصيف بروتين الأسبارتك من عفن *Aspergillus terreus* المعزول محلياً واستعماله في نظرية اللحوم) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها، ووجدنا بأنها جديرة بالقبول لنيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الاغذية / تقانات احيائية .

#### رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.د. ام البشر حميد جابر

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة البصرة / كلية الزراعة

التاريخ : / / 2024

#### عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.د. ضياء فالح عبد الله

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة البصرة / كلية الزراعة

التاريخ : / / 2024

#### عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.د. سرمد غازي محمد

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة البصرة / كلية الزراعة

التاريخ : / / 2024

#### عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.د. وسن كاظم عبد الرزاق

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة البصرة / كلية الزراعة

التاريخ : / / 2024

#### عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. محمود محمد احمد

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة بغداد / كلية علوم الهندسة الزراعية

التاريخ : / / 2024

#### عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.د. علاء جبار عبد

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة البصرة / كلية الزراعة

التاريخ : / / 2024

#### عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. زينة كاظم عيسى

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة البصرة / كلية الزراعة

التاريخ : / / 2024

#### مصادقة عميد الكلية

أصادق على ماجاء في اقرار اللجنة اعلاه

التوقيع :

الاسم : أ.م.د. رعدان هاشم محسن

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2024

## الأهداء

إلى معلم البشرية الأول .. المبعوث رحمة للعالمين ... السراج المنير

(( محمد صلى الله عليه واله وسلم ))

إلى المدرسة التي تعلمتُ منها الكثير والشمعة التي أنارت لي الطريق نحو

النجاح.... والدي العزيز ( رحمه الله ) ... ووالدتي الغالية

إلى سكني في الدنيا ومنبع المودة والوفاء ..... زوجتي الحبيبة

إلى فلذات كبدي وروحي التي بين جنبي ..... أولادي الأعزاء

إلى الذين أشدُّ بهم عضدي ويفرحون لفرحي ..... إخوتي وأخواتي

إلى الذين وقفوا معي يتأملون نجاحي ..... زملائي وأصدقائي

إلى الذين منحوني ثمرة جهدهم وذلّلوا لي الصعاب وأهدوني جل وقتهم

( أساتذتي المحترمين )

(( أهدى ثمرة جهدي المتواضع ))

## الشكر والتقدير

الحمد لله الأول قبل الإنشاء والاحياء والأخر بعد فناء الإشياء العليم الذي لاينسى من ذكره ولاينقص من شكره ولايخيب من دعاه ولايقطع رجاء من رجاه والصلاة والسلام على خير خلق الله وخاتم الأنبياء والمرسلين المبعوث رحمة للعالمين محمد بن عبد الله وعلى آل بيته الطيبين الطاهرين وصحبه المنتجبين .

لايسعني وأنا أضع اللمسات الأخيرة لهذه الدراسة إلا أن أتقدم بجزيل الشكر والاحترام والتقدير والامتنان إلى أستاذي الفاضلين ومشرفي الأستاذ الدكتور علاء جبار عبد المنهل والأستاذ المساعد الدكتورة زينة كاظم اليونس لما قدموه لي من توجيهات وأراء سديدة ذلت لي كل العقبات طيلة مرحلة البحث جزاهم الله خير جزاء المحسنين ووفقهم لخير الدنيا والأخرة ، كما وأتقدم بخالص الشكر والتقدير إلى رئاسة جامعة البصرة وعمادة كلية الزراعة في جامعة البصرة ورئاسة جامعة ميسان وعمادة كلية الزراعة في جامعة ميسان لأتاحة الفرصة لي لإكمال دراسة الدكتوراه .

وأتقدم بالشكر الجزيل إلى رئاسة قسم علوم الأغذية في جامعة البصرة وجميع الأساتذة من أعضاء الهيئة التدريسية الذين غمروني بعطائهم وعلمهم الوفير طيلة فترة الدراسة جزاهم الله عني خير الجزاء وزادهم رفعةً وعلماً .

أشكر والتقدير إلى كل زملائي من طلبة الدراسات العليا وأصدقائي الذين مدوا لي يد العون ولو بكلمة طيبة شجعتني وأثارت في نفسي الهمة والعزيمة لمواصلة الطريق .

صادق

## الخلاصة

تم الحصول على 40 عزلة نقية عزلت من التربة والحبوب (الرز والحنطة والشعير والذرة) ، أجريت العزلة الأولية لهذه العزلات وأنتخب منها 32 عزلة منتجة للإنزيم ثم أجريت العزلة الثانوية باستعمال تخمرات الحالة الصلبة لأنتخاب العزلة الاكفأ في إنتاج إنزيم بروتيز الأسبارتك وكانت العزلة ( G94 ) هي الأفضل من بين هذه العزلات ، وشخصت هذه العزلة وتبين بأنها تعود إلى عفن *Aspergillus terreus* ، كما أظهر فحص السموم أن العزلة المحلية لعفن ( G94 ) *Aspergillus terreus* غير منتجة لسموم الافلاتوكسين وشخصت العزلة وراثياً باستعمال اختبار ITS rRNA والتي أظهرت تطابقاً بنسبة 99.55% مع عفن *Aspergillus terreus* والتي سجلت في بنك الجينات بأسم *Aspergillus terreus* SFH4 ( LC719967 ) .

درست الظروف المثلى لإنتاج إنزيم بروتيز الأسبارتك من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 ولوحظ أن أفضل وسط لإنتاج الإنزيم هو نخالة الحنطة ، وأفضل نسبة لمحلول الترطيب هي نسبة ( 3:1 ) ، وكان الرقم الهيدروجيني 5 هو الرقم الامثل لإنتاج الإنزيم ، كما تبين ان أفضل محلول من بين المحاليل المستخدمة للأستخلاص هو داريء الخلات برقم هيدروجيني 5 ، وأفضل حجم لقاح مقداره 2 مل (  $1 \times 10^6$  ) بوغ /غرام مادة صلبة ) ، كما أعطى المصدر النتروجيني العضوي الكازين أعلى انتاجية انزيمية ، ولوحظ أن أفضل مدة حضانة لإنتاج إنزيم بروتيز الأسبارتك هي 6 أيام ، وكانت درجة الحرارة 30 م هي الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج الإنزيم ، وركز المستخلص الخام لإنزيم بروتيز الأسبارتك باستعمال أملاح كبريتات الأمونيوم ، وكانت أفضل نسبة تشبع هي 50-70% ، ومن ثم اجريت عملية التنافذ الغشائي ( الديليزة ) للتخلص من املاح كبريتات الأمونيوم ، بعدها أجريت خطوة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-100 ، إذ أظهرت النتائج من خلال قياس الامتصاصية على طول موجي 280 نانومتر ان اجزاء الاسترداد تضمنت ثلاث قمم بروتينية للمستخلص الانزيمي ، وبعد قياس الفعالية الانزيمية للقمم الثلاث ظهرت فعالية إنزيم بروتيز الأسبارتك في القمة الثانية في حين لم تظهر أي

فعالية أنزيمية في القمم الأخرى ( الأولى والثالثة) ، ثم حددت نقاوة الانزيم باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي ولوحظت نقاوة الإنزيم من خلال ظهور حزمة بروتينية واحدة في الهلام .

تم توصيف إنزيم بروتيز الأسبارتك المنقى كلياً والإنزيم المنقى جزئياً ، إذ وجد أن الوزن الجزيئي للإنزيم المنقى بلغ ( 35 ) كيلو دالتون ، وأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنزيم بروتيز الأسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً هو ( 5 ) ، وأن الإنزيم المنقى كلياً والمنقى جزئياً أظهر ثباتاً في مدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت ( 4-5 ) عند حضانها بدرجة حرارة 35 م° ولمدة 30 دقيقة . أما درجة الحرارة المثلى للإنزيم المنقى كلياً والمنقى جزئياً كانت 55 م° ، وأن الإنزيم المنقى كلياً والمنقى جزئياً أظهر ثباتاً في مدى من درجات الحرارة تراوحت بين ( 15 - 55 ) م° ، كما وصلت طاقة التنشيط اللازمة لتحويل المادة الأساس الى نواتج ( 13.89 ) كيلو سعرة / مول ، بينما بلغت قيمة مسخ إنزيم بروتيز الأسبارتك كانت ( 95.97 ) كيلو سعرة / مول ، ودرست الثوابت الحركية لإنزيم بروتيز الأسبارتك المنقى من خلال استعمال تراكيز مختلفة من الكازين كمادة خاضعة Substrate ، ودرس تأثير المنشطات والمثبطات على فعالية إنزيم بروتيز الأسبارتك عند تركيز (1، 5) ملي مولاري وكان لبعض المنشطات دور في تنشيط فعالية إنزيم بروتيز الأسبارتك بينما انخفضت الفعالية الأنزيمية انخفاضاً ملحوظاً في الحديدك عند تركيز 5 ملي مولاري في حين انخفضت الفعالية الأنزيمية انخفاضاً طفيفاً باستعمال الصوديوم ، في حين فقد الإنزيم معظم فعاليته عند استعمال مركب Pepstatin .

استعمل الإنزيم المنقى جزئياً في تطرية اللحم وأجريت الفحوصات النوعية والحسية للحم المعامل بإنزيم بروتيز الأسبارتك بتركيز (0.5 % ) والماء المقطر ولفترات غمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة ، إذ لوحظ ارتفاع نسبة الرطوبة وقابلية حمل الماء في اللحم المعامل بإنزيم واللحم المعامل بالماء المقطر ، وانخفض الرقم الهيدروجيني وحجم المستخلص المتحرر والنسبة المئوية للفقء بالوزن إثناء الطبخ في اللحم المعامل بإنزيم واللحم المعامل بالماء المقطر ، كما لوحظ ارتفاع قيمة معامل التايروسين / التريتوفان الكلي البروتيني وغير البروتيني لكلا العينتين المعاملة بإنزيم والماء المقطر مقارنةً بعينة اللحم غير المعاملة ،

ولوحظ ارتفاع النسبة المئوية للنتروجين الكلي الذائب (TSN) والنسبة المئوية للنتروجين غير البروتيني الذائب لعينة اللحم المعامل بإنزيم واللحم المعامل بالماء المقطر مقارنة بالعينة غير المعاملة، وانخفاض النسبة المئوية للنتروجين البروتيني الذائب ( SPN ) لكلا العينتين عن عينة اللحم غير المعاملة .

بينت نتائج التقييم الحسي لشرائح اللحم المعاملة بإنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % وبفترات عمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة وشرائح اللحم غير المعاملة (العينة الضابطة) إذ أعطت العينة المغمورة لفترة 120 دقيقة أعلى تأثيراً في صفة العصرية والطراوة والقبول العام .

## المحتويات

الصفحة	العنوان	التسلسل
1	الفصل الأول المقدمة	1
3	الفصل الثاني مراجعة مصادر	2
3	البروتيازات	1.2
4	تصنيف البروتيازات	2.2
4	الببتايديزات الخارجية	1.2.2
5	الببتايديزات الداخلية	2.2.2
5	بروتيازات الاسبارتيك	1.2.2.2
6	البروتيازات المعدنية	2.2.2.2
6	بروتيازات السيرين	3.2.2.2
7	بروتيازات السستين	4.2.2.2
9	التصنيف حسب الرقم الهيدروجيني	3.2.2
9	البروتيازات الحامضية	1.3.2.2
9	البروتيازات المتعادلة	2.3.2.2
10	البروتيازات القاعدية	3.3.2.2
10	تركيب وآلية عمل انزيم بروتيز الأسبارتيك	3.2
12	مصادر إنتاج البروتيز	4.2

12	المصادر الحيوانية	1.4.2
13	المصادر النباتية	2.4.2
13	المصادر الميكروبية	3.4.2
15	الفطريات	5.2
16	جنس <i>Aspergillus ssp.</i>	1.5.2
18	عفن <i>Aspergillus terreus</i>	2.5.2
19	تخميرات الحالة الصلبة	6.2
21	العوامل المؤثرة في انتاج البروتيازات من الفطريات	7.2
25	تنقية الإنزيم	8.2
26	توصيف إنزيم البروتيز	9.2
26	الوزن الجزيئي	1.9.2
28	تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الإنزيم وثباته	2.9.2
29	تأثير درجة الحرارة على فعالية الإنزيم وثباته	3.9.2
30	الثوابت الحركية	4.9.2
32	تأثير العناصر المعدنية والمنشطات والمثبطات على فعالية انزيم بروتيز الأسبارتك	5.9.2
33	تطبيقات انزيم بروتيز الاسبارتيك	10.2
36	تطبيقات انزيم بروتيز الاسبارتك في تطرية اللحوم	1.10.2

39	الفصل الثالث المواد وطرائق العمل	3
39	الأجهزة والأدوات المستخدمة في الدراسة	1.3
40	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	2.3
42	المواد الأولية	3.3
42	مصادر العزلات	4.3
42	التربة	1.4.3
43	الحبوب	2.4.3
43	المحاليل	5.3
43	محلول الببتون المخفف	1.5.3
43	محلول اللاكتوفينول	2.5.3
43	محلول الامونيا	3.5.3
45	محلول دارىء فوسفات البوتاسيوم	4.5.3
45	المحلول الملحي	5.5.3
45	محلول دارىء السترات 0.2 مولاري ( pH 3 )	6.5.3
45	محلول دارىء السترات 0.2 مولاري ( pH 4 )	7.5.3
45	محلول دارىء الخللات 0.2 مولاري ( pH 5 )	8.5.3
45	محلول دارىء فوسفات الصوديوم 0.2 مولاري ( pH 6 )	9.5.3
45	محلول دارىء فوسفات الصوديوم 0.2 مولاري ( pH 7 )	10.5.3

45	محلول دارىء الكلايسين - حامض الهيدروكلوريك	11.5.3
45	محلول دارىء السترات 0.1 مولاري ( pH 4 )	12.5.3
45	محلول دارىء السترات 0.1 مولاري ( pH 5 )	13.5.3
46	محلول دارىء فوسفات البوتاسيوم 0.1 مولاري ( pH 6 )	14.5.3
46	محلول دارىء فوسفات البوتاسيوم 0.1 مولاري ( pH 7 )	15.5.3
46	محلول دارىء فوسفات البوتاسيوم 0.1 مولاري ( pH 8 )	16.5.3
46	تحضير محلول البيستاتين تركيز ( 5 ) ملي مولاري	17.5.3
46	تحضير محلول البيستاتين تركيز ( 1 ) ملي مولاري	18.5.3
46	محلول منظم ( TBE ) Tris – Borate EDTA 1x	19.5.3
47	الأوساط الزراعية	6.3
47	وسط دكستروز – البطاطا الصلب	1.6.3
47	وسط الإنتاج الإنزيمي	2.6.3
47	وسط حليب الفرز الصلب	3.6.3
47	وسط خلاصة جوز الهند الصلب	4.6.3
48	وسط زابك – مستخلص الخميرة الصلب	5.6.3
48	وسط خلاصة المالت الصلب	6.6.3
51	العزل	7.3
51	عزل الفطريات من التربة	1.7.3

51	عزل الفطريات من الحبوب	2.7.3
53	تنقية العزلات	8.3
53	حفظ العزلات	9.3
53	تشخيص العزلات على مستوى الجنس	10.3
53	الغربة الأولية	11.3
53	تحضير اللقاح	12.3
53	الغربة الثانوية	13.3
53	استخلاص الانزيم	14.3
54	تقدير فعالية الانزيم ( التحليلية والتخثرية )	15.3
54	تقدير الفعالية التحليلية	1.15.3
55	تقدير الفعالية التخثرية	2.15.3
56	تقدير تركيز البروتين	16.3
56	المحاليل المستعملة	1.16.3
57	المنحنى القياسي لبروتين المصل البقري	2.16.3
58	تقدير تركيز البروتين في المستخلص الانزيمي	3.16.3
58	معاملة الأنزيم بمثبط الـ ( Pepstatin A )	17.3
59	تشخيص نوع العزلة الأكفأ	18.3
59	الكشف عن الافلاتوكسين	19.3

59	التشخيص الجزيئي	20.3
59	استخلاص الحامض النووي DNA	1.20.3
61	الكشف عن DNA	2.20.3
61	تضخيم الحامض النووي DNA	3.20.3
63	الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية PCR	4.20.3
65	دراسة الظروف المثلى لإنتاج إنزيم بروتيز الاسبارتك من العزلة	21.3
65	تحديد أفضل وسط لإنتاج الإنزيم	1.21.3
65	تحديد أفضل نسبة لمحول الترطيب المستخدم لإنتاج الإنزيم	2.21.3
65	تحديد أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج الإنزيم	3.21.3
65	تحديد أفضل محلول لاستخلاص الإنزيم	4.21.3
66	تحديد أفضل حجم لقاح لإنتاج الإنزيم	5.21.3
66	تحديد أفضل مصدر نايتروجيني لإنتاج الإنزيم	6.21.3
66	تحديد أفضل مدة حضن لإنتاج الإنزيم	7.21.3
66	تحديد أفضل درجة حرارة لإنتاج الإنزيم	8.21.3
66	تنقية انزيم بروتيز الاسبارتك	22.3
66	التركيز بكبريتات الامونيوم	1.22.3
67	التركيز بالمذيبات العضوية	2.22.3
67	الديلزة	3.22.3

67	كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي	4.22.3
68	اختبار نقاوة الإنزيم	5.22.3
72	توصيف أنزيم بروتيز الاسبارتك	23.3
72	تقدير الوزن الجزيئي	1.23.3
74	الرقم الهيدروجيني الامثل للأنزيم	2.23.3
74	الرقم الهيدروجيني لثبات الانزيم	3.23.3
74	درجة الحرارة المثلى للأنزيم	4.23.3
74	درجة الحرارة لثبات الإنزيم	5.23.3
75	تقدير طاقة تنشيط الأنزيم	6.23.3
75	تعيين الثوابت الحركية للأنزيم	7.23.3
76	تأثير بعض الاملاح والمثبطات على فعالية الانزيم	8.23.3
76	أستعمال الانزيم المنقى جزئياً في تطرية اللحوم	24.3
76	تحضير لحم البقر	1.24.3
76	تحضير المحلول الانزيمي تركيز 0.5 %	2.24.3
77	طريقة العمل	3.24.3
77	الاختبارات النوعية	4.24.3
77	نسبة الرطوبة	1.4.24.3
77	الرقم الهيدروجيني	2.4.24.3

78	حجم المستخلص المتحرر	3.4.24.3
78	قابلية حمل الماء	4.4.24.3
79	نسبة فقد الوزن أثناء الطبخ	5.4.24.3
79	معامل التايروسين / التربتوفان الكلي	6.4.24.3
80	معامل التايروسين / التربتوفان البروتيني ومعامل التايروسين / التربتوفان غير البروتيني	7.4.24.3
80	تقدير النتروجين الكلي	8.4.24.3
81	تقدير النتروجين الكلي الذائب	9.4.24.3
81	تقدير النتروجين البروتيني الذائب و النتروجين غير البروتيني الذائب	10.4.24.3
82	التقييم الحسي	5.24.3
83	التحليل الإحصائي	25.3
84	<b>الفصل الرابع النتائج والمناقشة</b>	<b>4</b>
84	العزل	1.4
86	تشخيص جنس العزلات	2.4
87	الغربة الاولى	3.4
89	الغربة الثانوية	4.4
93	تشخيص نوع العزلة الأكفا <i>Aspergillus G94</i> في إنتاج الانزيم	5.4
95	الكشف عن الافلاتوكسين في عزلة المنتقاة ( G94 )	6.4

	<i>Aspergillus terreus</i>	
95	التشخيص الجيني للعزلة المحلية الأكفأ في إنتاج الإنزيم	7.4
95	استخلاص الحامض النووي DNA	1.7.4
96	تضخيم الحامض النووي DNA	2.7.4
97	تحليل تتابع نواتج التضخيم	3.7.4
99	دراسة الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز من العزلة	8.4
99	تحديد أفضل وسط لإنتاج الإنزيم	1.8.4
101	تحديد أفضل نسبة لمحلول الترطيب المستخدم لإنتاج الإنزيم	2.8.4
102	تحديد أفضل رقم هيدروجيني (pH) لإنتاج الإنزيم	3.8.4
103	تحديد أفضل محلول لاستخلاص الإنزيم	4.8.4
104	تحديد أفضل حجم لقاح لإنتاج الإنزيم	5.8.4
105	تحديد أفضل مصدر نايتروجيني لإنتاج الإنزيم	6.8.4
107	تحديد أفضل مدة حضن لإنتاج الإنزيم	7.8.4
107	تحديد أفضل درجة حرارة لإنتاج الإنزيم	8.8.4
109	تنقية أنزيم بروتيز الاسبارتك	9.4
109	التركيز بكبريتات الامونيوم	1.9.4
110	التركيز بالمذيبات العضوية	2.9.4
111	تنقية أنزيم بأستعمال كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي	3.9.4

113	تعيين نقاوة الإنزيم	10.4
114	توصيف أنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH5	11.4
114	تقدير الوزن الجزيئي	1.11.4
117	الرقم الهيدروجيني الامثل لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً	2.11.4
119	الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات أنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً	3.11.4
120	تعيين درجة الحرارة المثلى لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً	4.11.4
123	تعيين الثبات الحراري لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً	5.11.4
125	طاقة التنشيط	6.11.4
126	الثوابت الحركية لأنزيم بروتيز الاسبارتك	7.11.4
127	تأثير المنشطات والمثبطات على فعالية أنزيم بروتيز الاسبارتك	8.11.4
131	أستعمال الانزيم المنقى جزئياً في تطرية اللحوم	12.4
131	الفحوصات النوعية	1.12.4
131	المحتوى الرطوبي	1.1.12.4
132	الرقم الهيدروجيني	2.1.12.4

133	حجم المستخلص المتحرر	3.1.12.4
134	قابلية حمل الماء ( W. H. C.)	4.1.12.4
135	النسبة المئوية للفقد بالوزن أثناء الطبخ	5.1.12.4
136	معامل التايروسين / التربتوفان الكلي البروتيني وغير البروتيني	6.1.12.4
139	النتروجين الكلي الذائب والنتروجين البروتيني وغير البروتيني الذائب	7.1.12.4
142	التقييم الحسي لشرائح اللحم	2.12.4
144	الفصل الخامس الاستنتاجات والتوصيات	5
144	الاستنتاجات	1 . 5
145	التوصيات	2 . 5
146	المصادر	6
146	المصادر العربية	1. 6
147	المصادر الاجنبية	2 . 6

## جدول الاشكال

الصفحة	عنوان الشكل	التسلسل
3	المبيعات السنوية للأنزيمات	1-2
11	تركيب انزيم البروتيز المنتج من فطر <i>Candida tropicalis</i>	2-2
12	الآلية المقترحة لعمل أنزيم بروتيز الأسبارتيك	3-2
19	مستعمرة <i>Aspergillus terreus</i> النموذجية	4-2
50	مخطط طرائق العمل للدراسة الحالية	1-3
58	المنحني القياسي لبروتين BSA	2-3
73	البروتينات القياسية المعلومة الاوزان الجزيئية	3-3
76	الببستاتين Pepstatin مثبط أنزيم بروتيز الاسبارتك	4 -3
87	عزلات بأشكال وألوان مختلفة	1-4
89	العزلات المكونة للهالات حول المستعمرات اثناء اجراء عملية الغريلة الاولى	2-4
94	تشخيص نوع العزلة <i>Aspergillus G94</i> الاكفا في انتاج الانزيم	3-4
95	أختبار بخار الامونيا للكشف عن الافلاتوكسين في الطبق الحاوي على مستعمرات العزلة <i>Aspergillus terreus</i> المنماة على وسط جوز الهند	4-4
96	الترحيل الكهربائي للحمض النووي DNA المستخلص من العزلة المحلية <i>Aspergillus G94</i>	5-4
97	الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR ظهور حزم بحجم 600 زوج قاعدي	6-4
98	الشجرة الوراثية للعزلة الفطرية المحلية لعفن <i>Aspergillus SFH4 terreus</i> وعلاقتها مع الفطريات نفسها في بنك الجينات NCBI	7-4
100	تأثير نوع الوسط في إنتاج إنزيم البروتيز من العزلة <i>Aspergillus terreus</i>	8-4

102	تأثير نسبة محلول الترطيب في إنتاج إنزيم البروتيز من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	9-4
103	إنتاج إنزيم البروتيز من العزلة المحلية <i>Aspergillus</i> SFH4 <i>terreus</i> بأستعمال قيم pH مختلفة	10-4
104	يوضح إنتاج إنزيم البروتيز من العزلة المحلية <i>Aspergillus</i> SFH4 <i>terreus</i> بأستعمال محاليل مختلفة	11-4
105	إنتاج إنزيم البروتيز من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4 بأستعمال احجام لقاح مختلفة	12-4
106	إنتاج إنزيم البروتيز من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4 بأستعمال مصادر نايتروجينية مختلفة	13-4
107	إنتاج إنزيم البروتيز من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4 بأستعمال مدة حضان مختلفة	14-4
108	إنتاج إنزيم البروتيز من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4 باستعمال درجات حرارة مختلفة	15-4
110	تأثير نسب التشبع بكبريتات الامونيوم في تركيز انزيم البروتيز الحامضي المنتج من العزلة المحلية <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	16-4
111	تأثير انواع ونسب المذيبات العضوية في تركيز انزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	17-4
112	كروموتوكرافيا الترشيح الهلامي لمستخلص أنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	18-4
114	الترحيل الكهربائي للأنزيم المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus</i> <i>terreus</i>	19-4
116	المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من	20-4

	العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	
116	تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	21-4
118	الرقم الهيدروجيني الامثل لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى كلياً المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	22-4
118	الرقم الهيدروجيني الامثل لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	23 -4
120	الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات أنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى كلياً المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	24 -4
120	الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات أنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	25 -4
122	درجة الحرارة المثلى لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى كلياً المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	26 -4
122	درجة الحرارة المثلى لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	27 -4
124	الثبات الحراري لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى كلياً المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	28 -4
124	الثبات الحراري لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	29 -4
125	منحنى أرينوس لتقدير طاقة التنشيط لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	30 -4
127	الثوابت الحركية لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنتج من العزلة المحلية لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH4	31 -4
132	النسبة المئوية للمحتوى الرطوبي للحم البقر المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتيك بتركيز 0.5 % والماء المقطر ولفترات غمر مختلفة .	32 -4
133	الرقم الهيدروجيني للحم البقر المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتيك بتركيز 0.5	33 -4

	% والماء المقطر ولفترات غمر مختلفة	
134	حجم المستخلص المتحرر للحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك وبتركيز 0.5 % والماء المقطر وبتركيز 0.5 % ولفترات غمر مختلفة	34 -4
135	النسبة المئوية لقابلية حمل الماء للحم البقري المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر ولفترات غمر مختلفة	35 -4
136	النسبة المئوية للفقد بالوزن أثناء الطبخ للحم المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر بلفترات غمر مختلفة	36 -4
137	معامل التايروسين / التربتوفان الكلي للحم البقر المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر لفتترات غمر مختلفة	37 -4
138	معامل التايروسين / التربتوفان البروتيني للحم البقر المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر لفتترات غمر مختلفة	38 -4
139	معامل التايروسين / التربتوفان غير البروتيني للحم البقر المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر لفتترات غمر مختلفة	39 -4
140	النسبة المئوية للنتروجين الكلي الذائب للحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر بفتترات غمر مختلفة	40 -4
141	النسبة المئوية للنتروجين البروتيني الذائب للحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر بفتترات غمر مختلفة	41 -4
142	النسبة المئوية للنتروجين غير البروتيني الذائب للحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر بفتترات غمر مختلفة	42 -4

## قائمة الجداول

الصفحة	عنوان الجدول	التسلسل
8	خواص انواع البروتيازات الاربعة	1- 2
17	استعمال جنس <i>Aspergillus</i> في التطبيقات المختلفة	2 - 2
39	الاجهزة والأدوات المستخدمة في الدراسة	1 - 3
40	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	2 - 3
57	حجم وتركيز محلول Bovine Serum Albumin	3 - 3
62	البوادىء المستخدمة في تشخيص العزلة الفطرية	4 - 3
62	مكونات مجموعة ( Maxime PCR PreMix (i-Taq	5 - 3
62	المواد المضافة الى انبوبة التفاعل لتضخيم جين ITS	6 - 3
63	الظروف المثلى المعتمدة في تضخيم جين ITS	7 - 3
71	مكونات متعدد الاكريل أمايد	8 - 3
83	أستمارة التقييم الحسي لشرائح اللحم المعاملة بأنزيم بروتيز الاسبارتك	9 - 3
85	النسبة المئوية لتردد العزلات	1 - 4
85	مصادر العزل للبكتريا المعزولة محلياً	2 - 4
88	العزلات واجناسها ومصادرها وقدرتها على انتاج بروتيز الاسبارتك في وسط Skim Milk Agar	3 - 4
90	الغربة الثانوية لعزلات الاعفان المحلية المنتجة لأنزيم بروتيز الاسبارتك بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة على وسط نخالة الحنطة	4 - 4
92	الغربة الثانوية لأفضل 10 عزلات محلية منتجة لأنزيم بروتيز الاسبارتك بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة على وسط نخالة الحنطة	5 - 4
93	غربة العزلات المنتجة لأنزيم بروتيز الاسبارتك على اساس معاملتها بمثبط الـ (Pepstatin A)	6 - 4
113	خطوات تنقية الأنزيم المنتج من عفن <i>Aspergillus</i> SFH5	7 - 4

	<i>terreus</i>	
130	تأثير الايونات المعدنية والمثبطات على فعالية أنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من العزلة المحلية G94 لعفن <i>Aspergillus terreus</i> SFH5	8 - 4
143	التقييم الحسي لشرائح اللحم البقري المعاملة وغير المعاملة بأنزيم بروتيز الاسبارتك	9 - 4

### المختصرات

المختصر	المصطلح
Aps	Ammonium persulfate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albomin
CEA	Coconut Extract Agar
CYA	Czapek Yeast extract Agar
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DMSO	Dimethylsulfoxide
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
E RV	Extract Release Volume
GRAS	Generally recognized as safe
MEA	Malt Extract Agar
TEMED	N,N,N,N-tetra methyl ethylene diamine
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
PCR	Polymerase Chain Reaction

PDA	Potato Dextrose Agar
pH	Power of hydrogen
Rm	Relative Mobilit
SM	secondary metabolites
SMA	Skim Milk Agar
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel Electrophoresis
SSF	Solid-State Fermentation
SPN	Soluble Protein Nitrogen
TSN	Total Soluble Nitrogen
TCA	Trichloroacetic acid
TBE	Tris – Borate EDTA
WHC	Water Holding Capacity

## 1- المقدمة

للإنزيمات دور مهم في إنتاج أكثر من 500 منتج صناعي على مستوى العالم (Mokrani and Nabti, 2024) وأن إنتاجها في تزايد مستمر ليصل إلى أكثر من 50000 طن سنوياً تصدره الدنمارك بواقع 75 % من الإنزيمات المنتجة على مستوى العالم ، كما أن مبيعات الإنزيمات الصناعية في العالم لسنة 2018 قد وصلت إلى 5.5 مليار دولار بعد أن كانت أقل من 150 مليون دولار في منتصف السبعينات والذي يتوقع أن يصل إلى 7 مليار دولار في عام 2023 (Li et al, 2012; Kuddus, 2019).

إن البروتيازات هي إنزيمات لها القدرة على كسر الروابط الببتيدية في البروتينات ، إذ تلعب دوراً مهماً في العديد من العمليات البيولوجية ، بما في ذلك الهضم ، تخثر الدم ، الاستجابة المناعية ، وتعد البروتيازات وبالأخص المايكروبية منها الأكثر اتساعاً واستعمالاً من بين هذه الإنزيمات التي شكلت 60 % من مبيعاتها في الأسواق العالمية (Koistinen et al., 2023 , Couture, 2023 , Kalaiselvan et al., 2023, Dasari et al., 2023 ،Dudani et al., 2018 ) .

تعد البروتيازات من أهم الإنزيمات التي تلعب دوراً مهماً في مجال التطبيقات الغذائية والصناعية والعلاجية ، إذ استخدمت البروتيازات صناعة الجلود والصناعات الغذائية والمستحضرات الصيدلانية ومستحضرات التجميل، وصناعة الألبان وتحسين النكهة في الأطعمة وتصفية عكارة العصائر والنبذ ، وتلعب دوراً بارزاً في تطرية اللحوم، وخاصة لحم البقر فهي تمتلك القدرة على تحلل بروتينات الألياف العضلية (Panda et al., 2016, Gimenes et al., 2021) .

لم يتأثر الإنزيم سلبيًا بتراكيز الملح والفوسفات والحامض عند إضافته للحوم المتبلّة وقد أدى استعمال بروتياز الأسبارتك في تطرية لحوم الأبقار إلى زيادة الطراوة بنسبة 25 إلى 30% ( Ashie et al., 2002) .

تعتبر بروتيازات الأسبارتك من البروتيازات التي تعتمد على النشاط التحفيزي لوحدتين من حامض الأسبارتك (Gurumalles et al. , 2019) ، ويطلق على هذا النوع من الأنزيمات بالبروتيازات الحامضية Acid Proteases أو البروتيازات الكربوكسيلية

Carboxylic Proteases (Alsefar,2017) والتي تعمل على تحليل الاصرة الببتيدية التي تربط بين الاحماض الامينية في الوسط الحامضي ، واستعملت البروتيازات الحامضية في ازالة العكارة من البيرة وعصير الفاكهة وايضاً في تطرية اللحوم وكذلك في معالجة حالات عسر الهضم ، وتتواجد في الحيوانات والنباتات والفطريات والفايروسات ونادراً ما توجد في البكتريا والابتدائيات (Wei et al.,2023) .

تنتج البروتيازات الحامضية بطرق مختلفة اعتماداً على نوعية الكائن الحي المجهري المستعمل ولعل افضل الطرق هي استعمال تخمرات المواد الصلبة وذلك لأنها عادة ما تكون أنزيماتها خارجية اي تفرز خارج خلايا الاحياء المجهرية فضلاً عن بساطة ووفرة المخلفات الزراعية والصناعية المستعملة في هذا النوع من التخمرات (Hailemichael,2021) ( Mamo et al. ,2020; .

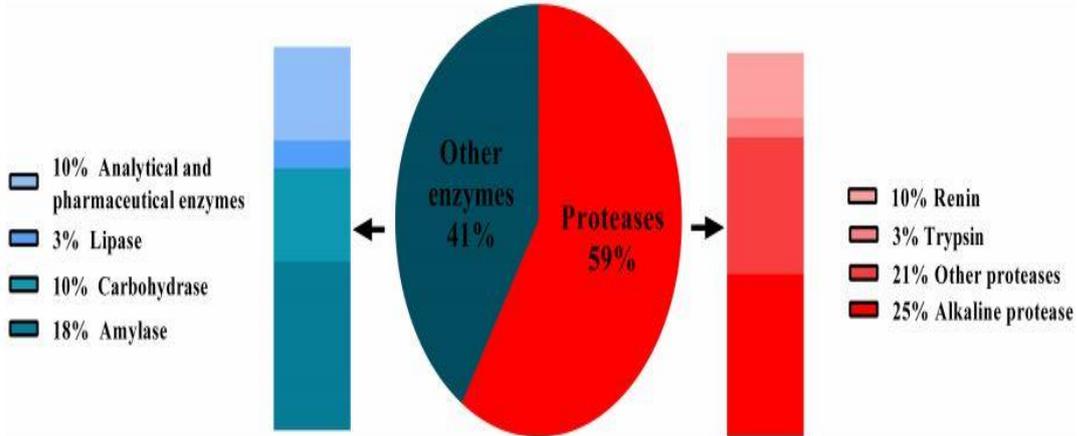
توجه الأهتمام بإنزيمات البروتياز المنتجة من الاحياء المجهرية كبداية عن الإنزيمات الحيوانية والنباتية ، نظراً لسهولة تنمية هذه الاحياء والتعامل معها وإمكانية السيطرة على ظروف الانتاج وقصر مدته كذلك امكانية تسخير الامكانات المحلية لأنتاجه بأقل التكاليف فضلاً عن التطبيقات الواسعة لهذا النوع من الانزيمات وأهميتها في الصناعات الغذائية لذا ارتأينا القيام بهذه الدراسة بهدف انتاج انزيم بروتياز الاسبارتك من عزلة فطرية محلية لغرض استعماله في تطرية اللحوم او في صناعة الجبن الابيض .

## 2 - مراجعة المصادر

## 1.2 البروتيازات

تُعد الإنزيمات محفزات حيوية تشارك تقريباً في جميع التفاعلات البيولوجية داخل الأنظمة الحية ، وأنتجت الانزيمات من سلالات مختارة من الكائنات الحية الدقيقة على نطاق واسع واستعملت طرق متطورة في تنقيتها (Sharma, 2019) ، وأسهم هذا بشكل كبير في تصحيح العمليات الصناعية وأحدث ثورة في تطوير التكنولوجيا الحيوية نظراً لكفاءتها وفعاليتها كمحفزات عند اقل تركيز (Gimenes *et al.* , 2021) .

استخدمت العديد من الإنزيمات في الصناعات المختلفة مثل اللايبيز ، والبروتيز ، والأميليز ، والسليوليز ، والزيلانيز وغيرها ، ومع ذلك تبقى إنزيمات البروتيز النوع السائد كونها ذات قيمة كبيرة من خلال تطبيقاتها الواسعة في مختلف المجالات منها منتجات الألبان ، الأغذية ، الورق و المنظفات ، إذ تشكل البروتيازات حوالي 60 ٪ من إجمالي المبيعات للإنزيمات التجارية في كل عام وكما مبين في الشكل (1-2) (Pawar *et al.* , 2023) ، في عام 2019 ، بلغ السوق العالمي للبروتيازات مايقارب 2.76 مليار دولار أمريكي ، ومن المتوقع أن يزداد خلال الفترة من 2019-2024 بمعدل نمو سنوي قدره 6.1 ٪ . (Choudhary *et al.*, 2022)



الشكل (1-2) المبيعات السنوية للإنزيمات (Pawar *et al.* , 2023)

البروتيازات أو ما يسمى بببتيدات التحلل المائي ، هي انزيمات لها القدرة على كسر الروابط الببتيدية في البروتينات (Koistinen et al. , 2023) . إذ تلعب دوراً مهماً في العديد من العمليات البيولوجية (Couture, 2023) ، بما في ذلك الهضم (Kalaiselvan et al. , 2023) ، تخثر الدم (Dasari et al. , 2023) ، الاستجابة المناعية (Dudani et al. , 2018) ، وتشارك أيضاً في تنظيم نمو الخلايا فضلاً عن العديد من الوظائف المهمة للكائنات الحية ( Zhang et al. , 2022 ; Erekat , 2023) . توجد هذه الإنزيمات في جميع الكائنات الحية ، مثل الحيوانات ، النباتات ، البكتريا و الفطريات (Naveed et al. , 2021) .

تعمل البروتيازات على الأصرة الببتيدية الموجودة في البروتينات وتحللها مائياً إلى بببتيدات وأحماض أمينية . بصورة عامة فإنها إما أن تكون بروتيازات حامضية أو قاعدية أو متعادلة ، كما تعتبر البروتيازات الحامضية من أهم البروتيازات المستعملة في التصنيع الغذائي ( Abd Almanhel,2017 ; Patil et al.,2012) .

## 2.2 تصنيف البروتيازات Classification of protease

وفقاً للجنة التسمية التابعة للاتحاد الدولي للكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) ، تم تصنيف البروتيازات ضمن المجموعة الثالثة المتمثلة بإنزيمات التحلل المائي hydrolases ، كما قسمت البروتيازات تبعاً لفعالها التخصصي بحيث تكون إما داخلية Endopeptidases أو خارجية Exopeptidases (Pawar et al. , 2023) .

### 1.2.2 الببتايديزات الخارجية Exopeptidases

تعمل الببتايديزات الخارجية بالقرب من النهايات الطرفية في السلسلة الببتيدية بناءً على موقع عملها والتي تقوم بتحليل جزيئة البروتين من خلال تكسير الأواصر الببتيدية الطرفية محررة بالتعاقب الأحماض الأمينية الحرة إلى وسط التفاعل ، تقسم الببتايديزات الخارجية الى نوعين اعتماداً على موقع عملها في السلسلة الببتيدية الأولى تسمى الببتايديزات الأمينية Amino Peptidase والتي تعمل على النهاية الطرفية N في السلسلة الببتيدية ، أما

الثانية تدعى الببتايديزات الكاربوكسيلية Carboxy Peptidase والتي تعمل على النهاية الطرفية C في السلسلة الببتيدية (Mienda et al.,2014) .

### 2.2.2 الببتايديزات الداخلية Endopeptidases

تعمل الببتايديزات الداخلية على الأواصر الببتيدية في المواقع الداخلية من السلسلة الببتيدية بعيداً عن النهايات الطرفية N و C (Mienda et al.,2014) والتي عندها يسمى الإنزيم (proteinase) ، هذا النوع من البروتيازات (EC 3.4.11-24) يقسم الى أربع مجاميع وهي بروتيازات الأسبارتك aspartic والسيرين serine والسستين cystein والثريونين threonine اعتماداً على الأحماض الأمينية الموجودة في الموقع الفعال او على اساس متطلباتها المعدنية (Mamo and Assefa , 2018 , Rawlings and Salvesen,2013) .

### 1.2.2.2 بروتيازات الاسبارتيك Aspartic protease (EC 3.4.23)

تحتوي هذه الأنزيمات على حامض الأسبارتيك في موقعها الفعال ، ويكون الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها (3-5) والوزن الجزيئي يتراوح بين (30 – 45) كيلودالتون ودرجة الحرارة المثلى (40-55) م° (Mamo and Gimenes et al.,2021 ; Assefa , 2018 ، واستعملت البروتيازات الحامضية في إزالة العكارة من البيرة وعصير الفاكهة وايضاً في تطرية اللحوم وكذلك في معالجة حالات عسر الهضم ، توجد في الحيوانات والنباتات والفطريات والفايروسات ، غالباً ما تنتج خارج الخلية عن طريق الأنواع الفطرية مثل *Aspergillus awamori* ، *Aspergillus oryzae* ، *Aspergillus niger* ، *Aspergillus fumigates* ، *Aspergillus saitoi* ، ونادراً ما توجد في البكتريا والابتدائيات (Wei et al.,2023) ، وهي غير حساسة لمثبطات الإنزيمات الأخرى ، إلا أنها تثبط تماماً عند وجود مادة الببستاتين pepstatin (Mamo et al., 2020) .

### 2.2.2.2 البروتيازات المعدنية ( EC 3.4.24) Metallo protease

تتطلب هذه المجموعة من الإنزيمات أيون فلز ثنائي التكافؤ لعملها ، مثل الزنك أو الكوبالت أو المنغنيز، لذلك تسمى بالبروتيازات الفلزية، وهي بهذا تكون حساسة للعوامل أو المواد المخيلية مثل Ethylene diamine tetra acetic acid ( EDTA) والتي تعمل على إزالة الأيون المعدني من الإنزيم مما يؤدي إلى تثبيطه ( Singh et al.,2016) ، تحتوي هذه الإنزيمات على الحامض الأميني فينيل النين أو ليوسين في موقعها الفعال ، ويكون الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها ( 5-7) والوزن الجزيئي يتراوح بين ( 19-37 ) كيلودالتون ودرجة الحرارة المثلى (65-85) م° ( Mamo and Assefa , 2018) ، ومن إنزيمات هذه المجموعة هو إنزيم Thermolysin المنتج من بكتريا *Bacillus thermoproteolyticus* ، الذي يحتوي على أيون الزنك  $Zn^{+2}$  في موقعه الفعال ( Razzaq et al.,2019) .

### 3.2.2.2 بروتيازات السيرين ( EC 3.4.21) (Serein protease)

تحتوي هذه الإنزيمات على الأحماض الأمينية ( السيرين أو الهستيدين أو الأسبارتك ) في الموقع الفعال (Alsefar,2017) وتثبط عند وجود مركب phenylmethylsulfonyl fluoride ، وهي بروتيازات قاعدية يكون رقمها الهيدروجيني الأمثل لفعاليتها بين (7-11) اما الوزن الجزيئي لها فيتراوح من ( 18 – 35 ) كيلودالتون ودرجة الحرارة المثلى لعملها بين ( 50-70 ) م° ( Mamo and Assefa , 2018) ، تعد بروتيازات السيرين من أهم البروتيازات التي تم فصلها وتنقيتها من الأجزاء النباتية المختلفة (Alsefar,2017) ، في حين أن البكتريا هي الأكثر شيوعاً في إنتاج هذا النوع من البروتيازات مقارنة مع الأحياء المجهرية الأخرى ومن أهم الاجناس البكتيرية السائدة هي

*Pseudoalteromonas Psychrobacter, Photobacterium , Vibrio , Halobacillus , Bacillus , Microbulbifer , Shewanella* الأنواع *Bacillus* sp. CEMB10370 ، *Vibrio Metschnikovii* ، *Bacillus alcalophilus* LW8 ، *Pseudomonas* sp. ، من أنواع محددة من الأعفان مثل عفن ( Banerjee and Ray), *Aspergillus tamarisii* ( 2017) .

**4:2:2:2 بروتيازات السستين (Cysteine protease) ( EC 3.4.22 )**

تحتوي هذه الإنزيمات على الحامض الأميني السستين والهستيدين في الموقع الفعال ( Mamo and Assefa, 2018 ) وتسمى أيضا بروتيازات الثايول Thiol أو بروتيازات السلفهايدريل Sulfhydryl وهي حساسة لمركبات السلفهيدريل (sulfhydryl reagent) مثل iodoacetamide و iodoacetic acid و Tosyl-L-lysyl- (TLCK) chloromethane hydrochloride ، والفلزات الثقيلة، وتنشط بالعوامل المختزلة كالمواد المخليبية (chelating agent) مثل EDTA والسستائين وسيانيد البوتاسيوم (Alsefar,2017) ، إذ تكون هذه الإنزيمات نشطة عند درجة الحموضة المتعادلة وتقع الفعالية المثلى لمعظم هذه الإنزيمات ضمن مدى من الأرقام الهيدروجينية التي تتراوح بين (5- 8) ووزنها الجزيئي (34-35) كيلودالتون ودرجة الحرارة المثلى (40-55) م° (Mamo and Assefa, 2018) ، انتجت من بعض أجناس البكتيرية مثل *Bacillus* spp. (Razzaq et al.,2019) ، كما وجدت هذه الانزيمات في مجموعة من النباتات وبالأخص الفواكه تحت اسم الباباين Papain والبروملين bromelin والكيموبايباين Chymopapain والفيسين ficin والكاريكين Caricain أيضاً في الفيروسات والطفيليات والحشرات (Alsefar,2017). وبصورة عامة يبين جدول (1-2) خواص وصفات بروتيازات الأسبارتك والسستين والمعدنية والسيرين .

جدول (1-2) خواص أنواع البروتيازات الأربعة

المصدر	مصدر البروتيز	المثبط	الحامض الاميني الفعال	درجة الحرارة المثلى	pH الامتثل	الوزن الجزيئي KDa	EC	البروتيز
(Gurumallesh <i>et al.</i> , 2019) (Mamo and Assefa , 2018) ( <b>Alsefar</b> ,2017)	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , Animal tissue (gut), <i>Tritirachium album</i> (thermostable)	phenylmethylsulfonyl fluoride	السيرين او الهستيدين او الاسبارتك	70-50	11-6	35-18	3.4.21	بروتيز السيرين
(Mamo and Assefa , 2018) ( <b>Alsefar</b> ,2017)	<i>Aspergillus</i> , stem of pineapple ( <i>Ananas comosus</i> ), latex of fig tree ( <i>Ficus sp</i> ),	Iodoacetamide, <i>p</i> -CMB	السستين والهستيدين	55-40	8-5	35-34	3.4.22	بروتيز السستين او الثايول
(Gimenes <i>et al.</i> ,2021) (Gurumallesh <i>et al.</i> , 2019) (Mamo and Assefa , 2018) ( <b>Alsefar</b> ,2017)	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Pencillium</i> , <i>Neurospora</i> , animal tissue (stomach)	Pepstatin	الاسبارتك , الاسبارتك	55-40	5-2	45-30	3.4.23	بروتيز الاسبارتك او الكاربوكسيل
(Mamo and Assefa , 2018) (Singh <i>et al.</i> ,2016)	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pencillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i>	EDTA and EGTA	فينيل ألانين او ليوسين	85-65	7-5	37-19	3.4.24	البروتيز المعدني

### 3.2.2 التصنيف حسب الرقم الهيدروجيني

قسمت البروتيازات حسب الرقم الهيدروجيني الى ثلاثة اقسام هي ( حسناوي وآخرون ، 2024 ; Solanki et al. , 2021 ; Gimenes et al. , 2021 ) :

#### 1.3.2.2 البروتيازات الحامضية Acid proteases :

وتشمل معظم أنواع البروتيازات المهمة التي لها تطبيقات مختلفة في مجال الصناعات الغذائية مثل إنزيم الرنين *renein* و الببسين *pepsin* والباپين *papain* والبروملين *bromelain* والفيسين *ficin* ، التي تعمل عند أرقام هيدروجينية منخفضة ( 3 – 5.6 ) ( Machado et al., 2016; Razzaq et al., 2019 ) .

تعد الفطريات المصدر الرئيسي لأنتاج البروتيز الحامضي ، وأن الأجناس الأكثر شيوعاً في إنتاجه هي *Aspergillus* و *Penicillium* و *Endothia* و *Mucor* ( Mamo and Assefa , 2018 ) . هناك العديد من الأبحاث التي أكدت على أهمية انتاج البروتيازات الحامضية بواسطة الأعفان ( Mandujano-González et al. , 2016 ) ، إذ أنتج *da Silva et al* (2016) بروتيز الأسبارتك من عفن *Rhizomucor miehei* ، والذي يمكن أن يكون بمثابة إنزيم بديل لإنزيم تخثر الحليب أثناء إنتاج الجبن، كما لاحظ ( Souza et al. (2017 عند توصيف البروتيز الحامضي المنتج من عفن *Aspergillus foetidus* أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لنشاط البروتيز ( 5 ) عند درجة حرارة مثلى ( 55 ) م .

#### 2.3.2.2 البروتيازات المتعادلة Neutral proteases :

وهي البروتيازات المنتجة من البكتريا والفطريات والتي تعمل عند رقم هيدروجيني ( 7 ) ، وتشمل البروتيازات المعدنية التي تتطلب أثناء نشاطها وجود ايون موجب الشحنة ثنائي التكافؤ ( Contesini et al., 2017; Razzaq et al., 2019 ) . استعملت البروتيازات المتعادلة لأغراض مختلفة منها صناعة الخبز والاجبان والادوية والمنظفات وغيرها ( Razzaq et al., 2019 ) . وقد عمل ( Ao et al. (2018 على إنتاج وتوصيف البروتيز المتعادل من عفن *Aspergillus oryzae* Y1 المعزول من الفاصوليا العريضة المخمرة ، إذ لاحظ امتلاكه وزن جزيئي ( 45 ) كيلودالتون ورقم هيدروجيني ( 7 ) ودرجة

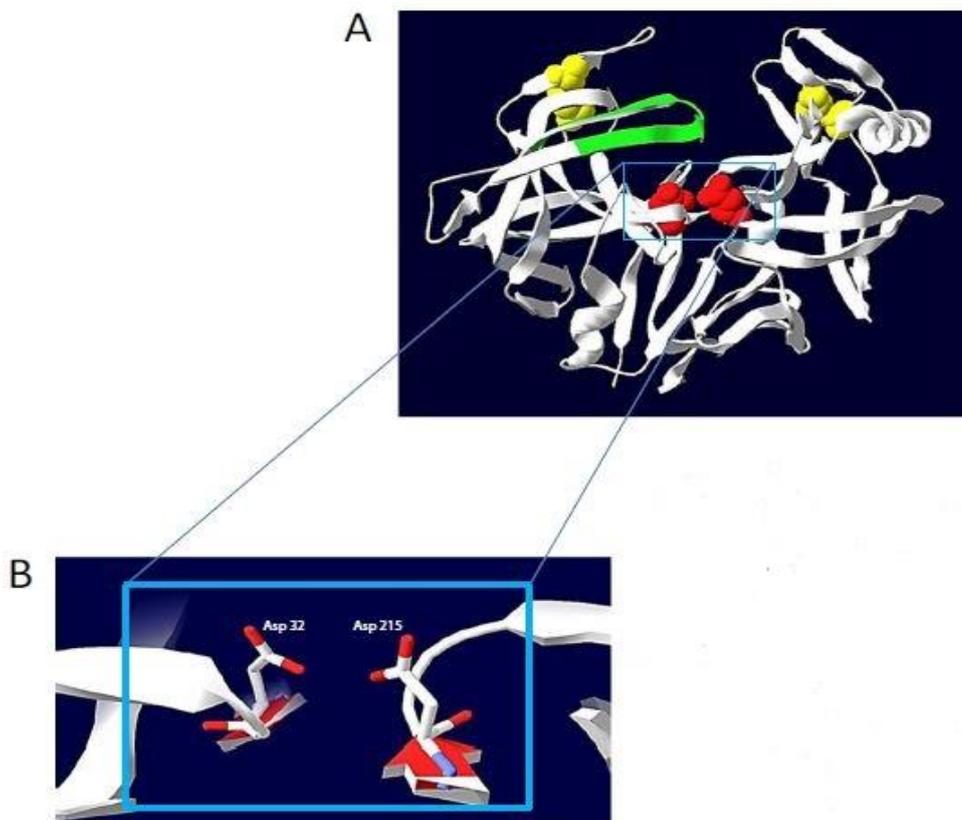
حرارة مثلى ( 55 ) م . كما أشار ( De Oliveira et al. (2020) عند إنتاج البروتيز المتعادل من عفن *Moorella speciosa* ، أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لعمل الإنزيم هو ( 7 ) .

### 3.3.2.2 البروتيازات القاعدية Alkaline proteases :

تنتج هذه البروتيازات من الحيوانات والنباتات والبكتريا والفطريات التي تعمل عند رقم هيدروجيني ( 8 – 12 ) ومن أهم انواع البروتيازات القاعدية هي subtilisin ، Carlsberg و subtilisin novo التي أنتجت من بكتريا *Bacillus* ( Pawar et al. , 2023 ) . إذ أن البروتيازات القاعدية المنتجة من جنس *B. subtilis* والمستخدمه للأغراض التجارية تعد آمنة ( Zhang et al. , 2017 ) . هناك العديد من الأبحاث التي تناولت إنتاج البروتيازات القاعدية من جنس *Bacillus* ، إذ قام Mothe and Sultanpuram (2016) بتتقية وتوصيف البروتيز القاعدي المنتج من بكتريا *B. caseinilyticus* . بالرغم من أن البروتيز القاعدي المنتج من جنس *Bacillus* هو الأكثر انتشارًا واستخدامًا، إلا أن هناك الكثير من الابحاث التي أشارت الى امكانية إنتاج البروتيز القاعدي من من انواع اخرى من الاحياء المجهرية مثل بكتريا *Streptomyces* sp. ( Solanki et al., 2021 ) . والفطريات ( Wajeeha , 2021 ) ، إذ أنتج ( da Silva et al. (2016 البروتيازات القاعدية من عفن *Aspergillus tamaris URM4634* وكان أفضل نشاط للبروتيز عند رقم هيدروجيني ( 8 ) .

### 3.2 تركيب وألية عمل انزيم بروتيز الاسبارتيك

التركيب الأولي لإنزيم البروتيز المنتج من فطر *Candida tropicalis* يتكون من 320- 340 حامض أميني ، والموقع الفعال في إنزيم البروتيز يحتوي على وحدتين من حامض الأسبارتك احدهما تقع في الموقع 215 والأخرى تقع في الموقع 32 ، اما التركيب الثانوي له فيتكون من شق عميق يحتوي على خمسة خيوط ( $\beta$ - sheet) محاطة بستة من التراكيب الحلزونية (  $\alpha$  - helices ) كما مبين في الشكل ( 2-2 ) (Theron and Divol ,2014) .

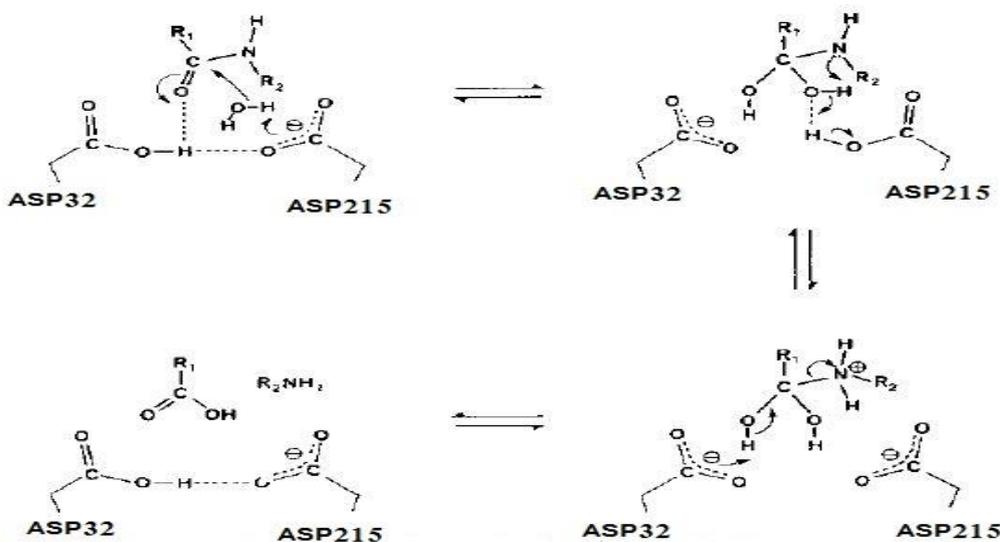


الشكل ( 2-2 ) تركيب إنزيم البروتيز المنتج من فطر *Candida tropicalis*  
(Theron and Divol ,2014 )

يُعد بروتيز الأسبارتيك من البروتيازات التي لها القدرة على كسر الروابط الببتيدية في البروتينات وتحللها مائياً إلى ببتيدات وأحماض أمينية (Couture , 2023).

أُقترح عدد من الآليات المختلفة لعمل الإنزيمات وهي التحفيز الحامضي \_ القاعدي Acid – base catalysis ، التحفيز التساهمي Covalent catalysis ، التحفيز الايوني المعدني Metal ion catalysis ، التحفيز الالكتروستاتيكي Electrostatic catalysis ، الأ إن الطريقة الأكثر قبولا على نطاق واسع لألية عمل بروتيز الاسبارتك هي آلية تحفيز القاعدة والحامض Acid-base catalysis إذ يتضمن التحفيز الحامضي قيام حامض الأسبارتك الموجود في الموقع الفعال بمنح البروتون للمادة الخاضعة ، أما في التحفيز القاعدي يعمل حامض الأسبارتيك الموجود في الموقع الفعال باستقبال البروتون من المادة الخاضعة وكما موضح في الشكل ( 2 - 3 ) ، إذ أنّ الموقع الفعال في الإنزيم يحتوي

على وحدتين من حامض الاسبارتيك احدهما يقع في الموقع ( 32 ) من السلسلة الببتيدية الذي يعمل على منح البروتون للمادة الخاضعة ، بينما الاخرى تقع في الموقع ( 215 ) من السلسلة الببتيدية ، والذي يعمل على سحب البروتون من الماء وتكوين النيوكلوفيل السالب الشحنة (  $OH^-$  ) مما يؤدي الى مهاجمة المادة الخاضعة وبالتالي كسر الرابطة بين النتروجين والكاربون وتكون الببتيد الأول ، أما حامض الاسبارتيك الثاني الذي يقع في الموقع ( 32 ) من السلسلة الببتيدية يعمل على سحب البروتون من مجموعة الكاربونيل للجزء الاخر من المادة الخاضعة ، وبذلك ينتج الببتيد الثاني للمادة الخاضعة ; (Brik and Wong , 2003 ; Coates *et al* ,2008 ; Wångsell ,2006) .



الشكل (3-2) الآلية المقترحة لعمل أنزيم بروتيز الأسبارتيك ( Coates *et al.*,2008 )

## 4.2 مصادر انتاج البروتيز Sources of protease production

تلعب البروتيزات دوراً مهماً في كل الكائنات الحية لذلك فهي توجد في مدى واسع من المصادر مثل الحيوانية والنباتية والميكروبية (حسناوي وآخرون، 2024، Naveed *et al.*, ; 2021) .

### 1.4.2 المصادر الحيوانية

تعد انزيمات التربسين Trypsin ، الكيموتربسين chemotrypsin ، الرنين renein والبيسين pepsin من أكثر البروتيزات الحيوانية شيوعاً واستعمالاً في مجالات مختلفة ، إذ يعد

التربسين الانزيم الهضمي المعوي المسؤول عن التحلل المائي لبروتينات الغذاء. Singh *et al.* (2016), أما انزيم الرنين المستخلص من المعدة الرابعة للعجول الرضيعة فقد استعمل في صناعة الأجبان المختلفة (Gimenes *et al.*, 2021) ، في حين استعمل إنزيم الكيموتربسين المستخلص من منطقة البنكرياس في التطبيقات التشخيصية والتحليلية ، أما إنزيم الببسين الذي يوجد في معدة جميع أنواع الفقريات تقريباً فإنه أدخل في صناعة المنظفات. Jisha *et al.* (2013) ، لاحظ Dadshahi *et al.* (2016) عند استخلاص وتنقية البروتينات من الروبيان بأنها ثابتة تجاه الحرارة العالية وتعمل عند الرقم الهيدروجيني (7-9) .

### 2.4.2 المصادر النباتية

استعملت البروتينات النباتية على نطاق واسع في التطبيقات المختلفة مثل تطرية اللحوم وتخثر الحليب والهضم ولعلاج بعض الأمراض الفيروسية والسرطانية. (Singh *et al.* 2016). تُعد انزيمات البروميلين والباباين من أبرز الإنزيمات النباتية المحللة للبروتينات ، وهما من عائلة الأناناس *Bromeliaceae* و *Carica papaya* على التوالي ، ومن اهم مصادر انتاج انزيم البروميلين هي سيقان الأناناس ولحاءه وأوراقه ، اما مصادر انتاج انزيم الباباين فهي نبات البابايا (Gimenes *et al.*, 2021) .

ومن البروتينات المهمة ايضاً هي انزيمات الكيراتينيز Keratinase، التي استعملت في تحلل بروتينات الشعر والصوف وأنتاج الأحماض الأمينية الأساسية ، اكتسبت البروتينات النباتية اهتماماً متزايداً ، على الرغم من أن عملية إنتاج البروتين من النباتات تستغرق وقتاً طويلاً أو قد تكون مكلفة من الناحية الاقتصادية (Singh *et al.*, 2016) ، لاحظ (2016) Sun *et al.* عند تقييم ما يقارب تسعين مصدراً نباتياً أتضح أن أعلى الإنزيمات المحللة للبروتين موجودة في الأناناس والتين والبابايا .

### 3.4.2 المصادر الميكروبية

تُعد الكائنات الحية الدقيقة من المصادر المهمة لإنتاج البروتينات لما تتميز به من مزايا تتمثل في سرعة الإنتاج ومساحة نموها المحدودة ، وأن أغلب أنزيماتها تكون خارجية مما يسهل عملية فصلها وتنقيتها وبالتالي قلة التكاليف فضلاً عن سهولة التلاعب الجيني في تركيبها الوراثي وعدم تأثرها بالظروف المناخية أي تكون بعيدة عن التأثيرات الموسمية والفصلية (Bhatia *et al.*, 2021 ; Putatunda *et al.*, 2019) .

أما من الناحية التجارية ، فإن البروتيازات البكتيرية والفطرية قد حُظيت بالكثير من الاهتمام (Gurumalles et al., 2019) ، إذ تشكل البروتيازات الميكروبية ثلثي إجمالي البروتيازات المستعملة في الصناعات المختلفة ، من أهم هذه البروتيازات هي البروتياز القاعدي البكتيري والبروتياز الحامضي الفطري ، قد تم عزل الكائنات الحية الدقيقة المنتجة للبروتياز من مجموعة متنوعة من البيئات مثل الجذور والتربة مثل تربة المسالخ والصرف الصحي والمخلفات الصناعية والزراعية وغيرها (Jadhav et al. , 2020; Hakim et al. , 2018; Ash et al. , 2018; Prajapati et al. , 2017).

تستخدم البروتيازات الميكروبية في مدى واسع من التطبيقات المختلفة ، وتنتج بطرق مختلفة اعتماداً على نوع الكائن الحي المجهرى المستعمل ، لعل أفضل الطرق هي استعمال تقنية تخمرات الحالة الصلبة (Usman et al., 2021) وذلك لأن أنزيماتها عادة ما تكون خارجية أي تفرز خارج خلايا الأحياء المجهرية (Mamo et al., 2020) ، ولسهولة تنمية هذه الأحياء والتعامل معها وإمكانية السيطرة على ظروف الإنتاج وقصر مدته كذلك إمكانية تسخير الأماكن المحلية لإنتاجه بأقل التكاليف من خلال الاستفادة من المخلفات الزراعية والصناعية كالنخالة والكسبة وقشور الرز وغيرها (Novelli et al., 2016).

تعد الفطريات من الكائنات المجهرية التي تميزت في إنتاجها للبروتيازات الحامضية (حسناوي وآخرون ، 2024 ؛ Patil et al., 2012) مقارنة مع الأحياء المجهرية الأخرى ولها خواص مشابهة للانزيمات الحيوانية ، والتي بدورها تقسم إلى نوعين ، الأول هي البروتيازات الشبيهة بالببسين Pepsin like acid protease والتي تميز عفن *Aspergillus* (aspergillopepsin, EC 3.4.23.18) و *Penicillium* و *Rhizopus* (rhizopuspepsin, EC 3.4.23.21) في إنتاجها (Souza et al., 2017) أما النوع الثاني هي البروتيازات الشبيهة بانزيم الرنين Rennin like acid protease والتي انتجت من قبل عفن *Mucor* و *Rhizomucor* و *Rhizopus mucorpepsin*, (EC 3.4.23.23) و *Endothia parasitica* (endothia pepsin, EC 3.4.23.22) (Aljammas et al., 2015; Daudi et al., 2018) ، تعد البروتيازات الحامضية أو ما يسمى ببروتيازات الاسبارتك aspartic proteases (EC3.4.23) والتي تميزت الأعفان في إنتاجها (Mamo et al., 2020) الأكثر استعمالاً في الصناعات الغذائية كصناعة الأجبان وتطوير اللحم وتحضير المتحللات البروتينية وترويق العصائر وتكون فعاليتها القصوى وثباتيتها عندما يكون

الرقم الهيدروجيني (2-5) الا انها تعمل عند رقم هيدروجيني (6) , (Mamo and Assefa , 2018; Sun *etal.*,2018; Purushothaman *etal* ,2019;Yujie *et al.* ,2019 ) .

## 5.2 الفطريات Molds

هي كائنات حية مجهرية حقيقية النواة Eucaryotic غير ذاتية التغذية Heterotrophic تقع ضمن مملكة الفطريات Myceteae ،لاحتوي على الكلوروفيل لذلك تُعد رمية التغذية Saprophytes أو متطفلة Parasites وتنتشر في بيئات مختلفة كالتربة والهواء والماء (McKelvey and Murphy, 2017) .

الفطريات لها القدرة على تكوين وحدات متخصصة للتكاثر تدعى الابواغ spores التي تنتج لاجنسياً او جنسياً ، والجدار الخلوي لها يتكون من الكايتين ، وتنمو الفطريات بشكل خيوط متفرعة تسمى الهايفات hyphae والتي تشكل جسم الفطر، وتكون بعض الخيوط الفطرية مقسمة إلى عدة خلايا بواسطة الحواجز الداخلية Septa وبعضها الاخر لا يحتوي على تلك الحواجز ، كما انها تحتوي على الساييتوبلازم والعديد من الانوية ، وتتجمع الهايفات بعضها مع البعض الاخر مكونة الغزل الفطري Mycelium ( Pitt and Hocking ,2009 ) ، من ناحية التنوع البيولوجي فأن هناك مايقارب (2.2 – 3.8 ) مليون نوع مختلف من الفطريات ، الا ان ماتم تشخيصه 148000 نوع فقط اي مايعادل 6.7% من اجمالي اعدادها حتى الان (Zhou *et al.* ,2023)، تشمل الفطريات أنواعاً هائلة من الأصناف ذات النظم البيئية المتنوعة ، وهي اما ان تكون وحيدة الخلية كالخمائر او خيوط دقيقة مجهرية مثل الاعفان او على شكل اجسام ثمرية قابلة للأكل مثل الكمأ وفطر المشروم ، والفطريات مجموعة فريدة من الكائنات الحية ، التي تختلف عن غيرها في سلوكها وتنظيمها الخلوي أذ تمتلك أيضاً مجموعة هائلة من المنتجات الحيوية التي لها تطبيقات في مجالات مختلفة ( Pitt and Hocking , 2017) ; McKelvey and Murphy, 2009 ، إذ تدخل الفطريات في العديد من الصناعات الغذائية ، مثل صناعة الخبز ، وأنواع من الاجبان والبيرة ، والنيبيذ والمشروبات الكحولية الأخرى ، كما استعملت الفطريات في انتاج الاحماض العضوية مثل حامض الستريك واللاكتيك فضلاً عن بعض الهرمونات مثل الجبرلييك ، كما تلعب دوراً مهماً في إعادة التدوير للمواد العضوية ، بما في ذلك تحلل السليلوز والخشب من خلال انضمامها الانزيمية المتخصصة ، ايضاً لها تطبيقات واسعة في مجال إنتاج المضادات الحيوية (مثل البنسلين) ، فضلاً عن استعمال منتجاتها الحيوية كعوامل للمكافحة البيولوجية التجارية ، مما يوفر بدائل للمبيدات

الكيميائية ( Yoshimi et al.,2016 ; Bennett , 2010 ) . وقد أكدت العديد من الابحاث استعمال الفطريات في الصناعات الغذائية والدوائية وغيرها ، إذ تمكن Ahmed et al. (2020) من إنتاج إنزيم الاميليز من عفن *Aspergillus terreus* SS\_RS-NE ، كما انتج (2018) Khootama et al. انزيم اللابيز من عفن *Aspergillus niger* ، وقد لاحظ (2017) Koul and Singh . امكانية انتاج العديد من المركبات المعزولة من أنواع مختلفة من جنس *Penicillium* والتي لها أهمية واسعة داخل أو خارج الجسم الحي منها تثبيط بعض أنواع السرطانات ، درس (2019) Saha et al. انتاج حامض الايتاكونك Itaconic acid من عفن *Aspergillus terreus* ، و انتج (2021) Rocha et al. انزيم البروتيز من عفن *Aspergillus sydowii* URM5774 .

### 1.5.2 جنس *Aspergillus* ssp.

يمتاز هذا الجنس بقدرته العالية على استهلاك مختلف المواد العضوية كغذاء لقابليته على انتاج انواعاً من الإنزيمات فضلاً عن قدرته على تكوين أعداد هائلة من السبورات (الكونيدات) ، وهو من الفطريات الرمية الخيطية التي تحتوي على اكثر من 200 نوع تابع لهذا الجنس ، ومن اهمها *A. niger* ، *A. oryzae* ، *A. terreus* والتي لها تطبيقات صناعية واسعة ، وهي تنمو في اوساط بيئية مختلفة مثل التربة والحبوب والبذور وعلى الفواكه والخضروات (Ulloa-Avellán et al. ,2023 ; Pitt and Hocking , 2009 ) . تمتاز الانواع التابعة لجنس *Aspergillus* بخصائصها العالية وتطبيقاتها في مختلف المجالات الزراعية والصناعية والطبية ، كما تلعب دوراً مهماً في تحلل المواد العضوية ، وخاصة المواد النباتية (Mohamed et al.,2021). صنف جنس *Aspergillus* ssp. ضمن عائلة Aspergillaceae (Houbraken et al. ,2020) ، والتي تتكاثر أما جنسياً أو لاجنسياً مع أن معظم أنواع جنس *Aspergillus* متواجد في الطبيعة بالطور اللاجنسي وهذا قد يعود الى فقدان قدرتها على التكاثر الجنسي خلال تطورها أو أن الطور الجنسي يكون نادر الحدوث ولم يُكتشف لحد الآن (Mcginis ,2012 ; de Hoog et al. ,2005 ) ، ويكون الغزل الفطري متفرع وذو نمو كثيف ، ومقسم من الداخل الى خلايا وكل خلية تحتوي على عدد من الانوية ، ويحتوي على خلية قديمة Foot cell مثخنة الجدران تمتد الى الاعلى بشكل أنبوب أو خيوط هوائية غير مقسمة وغير متفرعة تدعى بالحوامل الكونيدية Conidiophores ، تنتهي

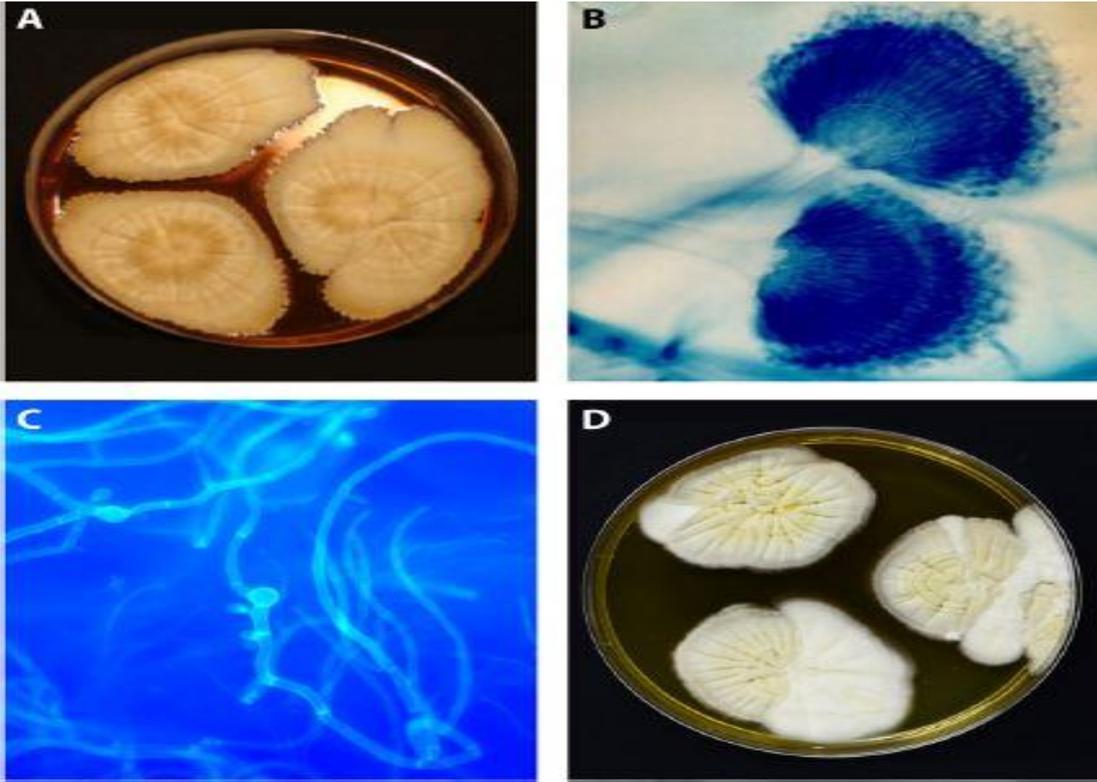
هذه الحوامل بإنتفاخ مستدير شبه كروي Globose أو Hemi Spherical يسمى بالحويصلة Vesicle ، وهي تحتوي على العديد من الانوية والعصيات والسائتوبلازم وينمو منها عدد كبير من الزوائد القصيرة تسمى بالذنيبات Sterigmata أو فياليدات Phialides ( ويطلق عليها Metulae ) والتي تكون بشكل صنف واحد Uniseriat أو صفين Biseriate ويحمل كل ذنيب سلسلة من الكونيدية (Ayugi et al. ,2015 ; Klich , 2002). هناك الكثير من الأبحاث التي تؤكد استخدام جنس *Aspergillus* في مدى واسع من التطبيقات كما مبين في الجدول (2-2) .

جدول (2-2) استعمال جنس *Aspergillus* في التطبيقات المختلفة

المصدر	التطبيقات	جنس <i>Aspergillus</i>
(Ward ;2011 , Yu et al. ,2017 )	صناعة الجبن، صناعة صلصة الصويا	<i>Aspergillus</i> spp.
(Han , 2023)	إنتاج الاستيلديهيد والايثانول	<i>Aspergillus oryzae</i>
( Mamo et al. ,2020)	إنتاج إنزيم بروتيز الاسبارتك	<i>Aspergillus oryzae</i> DRDFS13
(Barrios-González et al. ,2020)	إنتاج أدوية اللوفاستاتين	<i>Aspergillus terreus</i>
( Song et al. ,2020)	انتاج انزيم بروتيز الاسبارتك	<i>Aspergillus niger</i>
( Khootama et al. ,2018)	انتاج انزيم ألابييز	<i>Aspergillus niger</i>
( Ameen ,2020)	انتاج انزيم الزايلانيز xylanase	<i>Aspergillus fumigatus</i>
( Fadel et al. ,2021)	انتاج انزيم السيليليز	<i>Aspergillus fumigatus</i>
( Mauti et al. ,2023)	انتاج انزيم ألابييز	<i>Aspergillus terreus</i>
( Chergui et al. ,2021)	حامض الستريك citric acid	<i>Aspergillus niger</i>
(Niehoff et al. , 2023)	حامض الايتاكونك Itaconic acid	<i>Aspergillus terreus</i>
(Schmitt et al. , 2022)	حامض المالك Malic acid	<i>Aspergillus oryzae</i>
(Fernandes et al. , 2023)	حامض الكلوكونك Gluconic acid	<i>Aspergillus niger</i>

## 2.5.2 عفن *Aspergillus terreus*

أحد أنواع الفطريات الخيطية حقيقية النواة يقع ضمن مملكة الفطريات Fungi Kingdom شعبة Ascomycota فئة Eurotiomycetes رتبة Eurotiales عائلة Aspergillaceae وهو من الكائنات الحية الدقيقة الصناعية التي تلعب دوراً مهماً في العديد من المجالات مثل الطب والغذاء والصناعات الكيميائية ، يمتلك عفن *A. terreus* قيمة اقتصادية مهمة في مجال التكنولوجيا الحيوية ومنها إنتاج حامض الأيتاكونيك و itaconic و عقار اللوفستاتين lovastatin الخافض للدهون ، والانزيمات وفي صناعة الجلود والمنظفات وله القابلية على تخمير العديد من المنتجات الطبيعية ذات التطبيقات الصناعية (de Lima et al. ,2021;Huang et al. ,2021). كشفت المعلومات الجينية أن عفن *A.terreus* له القدرة على إنتاج عدداً كبيراً من المنتجات الثانوية (SM) secondary metabolites اذ يمتلك ما يقارب 93 منتجاً ايضياً (Blin et al.,2019). تظهر مستعمرات هذا العفن بلون بني مصفر الى بني غامق عند تنميتها على وسط dox Czapek أو Sabouraud dextrose Agar (الشكل 2-4 A) أو Malt Extract Agar أو Czapek yeast extract Agar ويمتاز بنمو سريع عند درجة حرارة 25 م° و 37 م° في حين يتوقف نموه عند درجة حرارة 5 م° ، غالباً ما يتم عزله من عينات بيئية مختلفة مثل التربة والمياه والنباتات والاعذية ومنتجات الاغذية الشرقية ، فضلاً عن المحاصيل الزراعية مثل الذرة والأرز والبقول السوداني والشعير، ولكن لم تصنف على أنها اعفان مرضية كذلك لايسبب تلف الاغذية ، وهي تمتلك رؤوس مخروطية مدمجة، وثنائية، وعمودية كثيفة (يصل طولها إلى 500 ميكرومتر وقطرها 30 إلى 50 ميكرومتر) (الشكل 2-4 B)، وتكون حوامل الكونيديا Conidiophores ناعمة وتختلف في اللون من الابيض إلى الأصفر الفاتح يصل قطرها 1.5 إلى 2.5 ميكرومتر (الشكل 2-4 C) أما الكونيديا Conidia فتكون كروية الشكل Spherical وصغيرة جداً إذ يتراوح قطرها بين ( 1.8 - 2.5 ) مايكرو ذات جدران ناعمة ، على عكس الأنواع الأخرى من *Aspergillus* ،فأن *A. terreus* ينتج كونيديا ثانوية تسمى aleurioconidia تتلون باللون البني ، يتحمل هذا النوع من العفن درجات الحرارة العالية التي تتراوح بين 30-48 م° (الشكل 2-4 D) (Lass-Flörl et al. ,2021 ; Pitt and Hocking , 2009 ) .



الشكل (2-4) (A) مستعمرة *Aspergillus terreus* النموذجية تظهر مورفولوجيا باللون البني على وسط Sabouraud dextrose agar عند الحضان لمدة 72 ساعة وبدرجة حرارة 37 م. (B) الفيروس المخروطية ثنائية وعمودية وكثيفة. (C) تُظهر الكونيديا في *A. terreus* بيضاء بحجم تكبير x 1,000 (D) نمو عفن *A. terreus* على وسط Sabouraud dextrose agar عند الحضان لمدة 72 ساعة وبدرجة حرارة 37 م. إذ تظهر مستعمرات بيضاء (أقل تصبغاً) (Lass-Flörl *et al.*, 2021).

## 6.2 تخمرات الحالة الصلبة (SSF) Solid-State Fermentation

استعملت تخمرات الحالة السائلة **Liquid state fermentation** منذ العقد الماضي بشكل واسع في انتاج العديد من منتجات التكنولوجيا الحيوية كالكحولات مثل الاسيتون والبيوتانول والمضادات الحيوية مثل البنسلين ، وبالرغم من ذلك فإن الاستهلاك العالي للطاقة فضلاً عن تلوث المنتج تُعد من المؤثرات السلبية على هذا النوع من التخمرات (Chen., 2013) ، مما دعى بالباحثين الى استعمال تخمرات الحالة الصلبة (SSF) التي تميزت بقلّة التكلفة وقلّة استهلاك الطاقة وامكانية الاستفادة من المخلفات الصناعية والزراعية كمادة خاضعة وتركيز أعلى للمواد المنتجة (Ruslan *et al.*, 2023).

يمكن تعريف تخمرات الحالة الصلبة بأنها التخمرات التي يتم فيها إنتاج العديد من المنتجات الحيوية مثل المضادات الحيوية والإنزيمات وغيرها عن طريق نمو بعض الأحياء المجهرية سواء كانت أعفان أو بكتيريا أو خمائر في محتوى مائي منخفض ، وبأستعمال المخلفات الصناعية والزراعية كمادة خاضعة مثل نخالة الحنطة ومخلفات التمر والمولاس وكسبة فول الصويا وقشور الرز ، إذ تُعد هذه التخمرات من التقنيات المفضلة للفطريات وبعكس الكائنات الحية الأخرى التي تحتاج إلى نشاط مائي مرتفع (Kuila and Sharma. , 2018).

استخدمت تخمرات الحالة الصلبة في مجال إنتاج الأغذية التقليدية بشكل واسع، مثل إنتاج الجبن باستخدام بكتيريا *Lactococcus lactis* و *Streptococcus* أيضاً إنتاج صلصة الصويا من فول الصويا ودقيق القمح بأستخدام عنف *Aspergillus oryzae* فضلاً عن منتجات أخرى مثل الخبز والنبيذ والخل (Zhao et al. , 2018) ، كما أستعملت تخمرات الحالة الصلبة في المجالات الصيدلانية والكيميائية ، إذ تم إنتاج حامض اللاكتيك وحامض الستريك ، و تم أيضاً أستعمال هذه التخمرات في إنتاج حامض الفورميك والأكساليك واللينولينيك من الفطريات أو البكتيريا الخيطية بعد تنميتها على المخلفات الزراعية مثل بنجر او قصب السكر (Vandenberghe et al. , 2018) .

أشار (Ma et al. ( 2020) الى امكانية إنتاج حامض اللاكتيك من عنف *Rhizopus oryzae* بأستعمال تقنية تخمرات الحالة الصلبة . كذلك أظهرت الدراسات الحديثة إمكانية استعمال تخمرات الحالة الصلبة في إنتاج مختلف المنتجات الثانوية الميكروبية ، مثل حامض الكلوتاميك ، والأصباغ ، والفيتامينات ، والكاروتينات ، وصمغ الزانثان ، وكما تعد تخمرات الحالة الصلبة أقل استهلاكاً للطاقة كما تحافظ على البيئة من التلوث ( Yin et al. , 2023 , Pavlović et al. , 2023 , Colla et al. , 2023 , Ooi et al. , 2021) ، غالباً ما تكون المخلفات الزراعية غنية بالمغذيات ، مما يوفر موطناً مثالياً لنمو الميكروبات ، لذلك استخدمت المخلفات الزراعية لإنتاج منتجات ذات قيمة عالية ، كما طبقت تخمرات الحالة الصلبة أيضاً بنجاح في إنتاج الوقود الحيوي ، والمبيدات الحيوية، وإزالة السموم البيولوجية ، والمعالجة الحيوية. (Mattedi et al., 2023) .

وفي الآونة الأخيرة استعمل الكثير من الباحثين تخمرات الحالة الصلبة في إنتاج الإنزيمات ومنها إنزيم البروتيز من بعض الأحياء المجهرية ، منهم قيام (2020) Chimbekujwo et al. بإنتاج الإنزيم من عنف *Aspergillus brasiliensis strain*

BCW2 ، وكذلك انتج ( Mamo et al. ( 2020 ) انزيم البروتيز من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة وأيضاً تمكن (2021) Osmolovskiy et al. من استعمال تخمرات الحالة الصلبة في انتاج البروتيز من *Aspergillus sp.* ، كما انتج ( Liu et al. ( 2023 ) انزيم البروتيز من بكتريا *Bacillus licheniformis* باستخدام تخمرات الحالة الصلبة .

## 7.2 العوامل المؤثرة في انتاج البروتيزات من الفطريات

تلعب الظروف المثلى دوراً مهماً في إنتاج الإنزيمات إذ يشكل الوسط الزراعي 30% من الكلفة الكلية لعملية التخمير وبالتالي فهو يُعد عاملاً مهماً في نمو الاحياء المجهرية المنتجة للإنزيمات (dos and Sato, 2018) . ان التغيرات في درجة الحموضة، ودرجة الحرارة، والمادة الخاضعة ، ومحتوى الماء، وحجم اللقاح، وما إلى ذلك لها تأثير كبير على الأنشطة الأيضية للكائنات الحية الدقيقة. وتختلف هذه المعايير بشكل كبير من نوع إلى آخر، ولذلك فإن معرفة الظروف المثلى لنمو الفطريات لإنتاج معظم الإنزيمات يعد أمراً ضرورياً (Othman and Sebo, 2023)، إذ ان حاجة الكائنات الحية لمصادر الكربون والنيتروجين تختلف من كائن حي إلى آخر، أو حتى بين نفس الأنواع المعزولة من مصادر مختلفة ( Hamza et al. , 2017) .

الوسط الزراعي يجب ان يحتوي على مصدر كاربوني ومصدر نتروجيني ، فالمصدر الكاربوني يعتبر محفزاً لإنتاج الإنزيمات او مثبطاً لها وهذا يعتمد على نوع المصدر الكاربوني وتركيزه في الوسط ، وكذلك نوع الكائن المجهرى المستخدم للأنتاج ، كما ان المصدر النتروجيني يزود الوسط الزراعي اما بالاملاح اللاعضوية التي قد تكون مثبطاً لأنتاج الانزيم عند اضافتها للوسط مثل كلوريد الامونيوم  $NH_4Cl$ ، او تزود الوسط الزراعي بالمصادر العضوية التي تحفز نمو الكائن المجهرى مثل البروتين والاحماض الامينية وغيرها ، وبالتالي فأنها تلعب دوراً كبيراً في تخليق الإنزيمات ، هناك بعض الاملاح تضاف الى الوسط الزراعي بتركيز معينة والتي تكون مصدراً للمعادن النادرة فضلاً عن الكبريت والفوسفات والكالسيوم مثل  $(CaCl_2)$  للمحافظة على درجة الحموضة وبالتالي تحافظ على ثباتية الانزيم (Aunstrup et al. , 1979)، اشارة (Othman and Sebo . (2023) في دراسته لأنتاج انزيم البروتيز الحامضي من عزله *Aspergillus niger* بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة ، الى ان إضافة مصادر الكربون والنيتروجين إلى الوسط الصلب أدت إلى

زيادة إنتاج الإنزيمات وتوليفها، كأستخدام الكازين كمصدر للنيتروجين والفركتوز كمصدر للكربون، كما لاحظ (Bano et al. (2016) ارتفاع معدل إنتاج انزيم البروتيز عند تنمية فطر *Pleurotus eryngii* في وسط معدني يحتوي على 0.5% سكروز و1% كازين . (، كما اشار (Asha et al. (2018) الى ان الكازين هو افضل مصدر نايتروجيني لأنتاج انزيم البروتيز من العزلة البكتيرية *Bacillus cereus* FT من بين المصادر النتروجينية العضوية وغير العضوية وبفعالية انزيمية تصل الى 151 وحدة / مل ، كما لاحظ (Vishwanatha(2009) من خلال تنمية عفن *Aspergillus oryzae* على مجموعة من المخلفات ( نخالة الحنطة ، نخالة الرز ، نخالة الراجي (Raji ) بطريقة تخمرات الحالة الصلبة لأنتاج أنزيم البروتيز الحامضي ، وجد أن أعلى أنتاجية للأنزيم كانت عند أستعمال نخالة الحنطة ، وأشار (Novelli et al. (2016) ، وأنشأ الذي أستعمل عدة أوساط زرعية لإنتاج إنزيم البروتيز بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة ، إذ كانت نخالة الحنطة هي أفضل الاوساط المستعملة في إنتاج الأنزيم ، واكد (da Silva et al., (2016) أن أفضل وسط لإنتاج إنزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus tamaris* URM4634 هو وسط نخالة الحنطة وبفعالية انزيمية 340 وحدة / مل ، كما لاحظ (Anwar (2023) الذي أنتج مجموعة من الانزيمات من عفن *Rhizopus Oryzae* منها أنزيم بروتيز الاسبارتك بطريقة تخمرات الحالة الصلبة ان أعلى أنتاجية للأنزيم كانت بأستعمال نخالة الحنطة مقارنة مع بقية المخلفات .

إن الاختلاف في نسبة محلول الترطيب المستخدمة في تخمرات الحالة الصلبة يؤثر بشكل كبير على نمو وأيض الأحياء المجهرية مما يؤثر سلباً وإيجاباً على إنتاجيتها لأنزيم بروتيز الاسبارتك (Bensmail et al. , 2015) ، إذ ان انخفاض وارتفاع نسبة محلول الترطيب يسبب قلة المغذيات وبالتالي يوفر بيئة غير ملائمة لنمو ونشاط الاحياء المجهرية إذ ان رطوبة المادة الصلبة يجب ان لاتقل عن 12 – 15 % والتي تعد الحد الأدنى لتوقف الفعاليات الحيوية للأحياء المجهرية وبصورة عامة يستعمل الماء أو المحاليل الملحية في عملية الترطيب بنسب تتراوح بين 1:1 الى 8:1 (وزن : حجم) (Luti et al. , 2014) .

اشار (Othman and Sebo . (2023) في دراسته لأنتاج انزيم البروتيز الحامضي من عزله *Aspergillus niger* بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة ، الى ان افضل نسبة لمحلول الترطيب في إنتاج الانزيم هي 1:0.75 ، كما اكد (Palsaniya et al. (2012) استخدام حجم لفاح 1 مل لأنتاج البروتيز من العزلات المايكروبية .

كذلك تُعد الأنشطة الأيضية للكائنات الحية الدقيقة حساسة للغاية لتغيرات الرقم الهيدروجيني، كونه يؤثر على العديد من العمليات الأنزيمية ونقل العناصر الغذائية المختلفة عبر غشاء الخلية مما يضمن نمو وإنتاج المنتجات الأيضية ، تؤدي هذه الأنشطة حتمًا إلى تحول أبيض في توازن أيونات الهيدروجين وبالتالي الرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي (Othman and Sebo , 2023) ، أشار Vishwanatha (2009) بأن أعلى إنتاج للأنزيم الحامضي من عفن *Aspergillus oryzae* كانت عند رقم هيدروجيني 5 ، و أوضح (Bensmail et al. (2015) بأن اقصى إنتاج لأنزيم البروتيز بواسطة عفن A. *niger* FFB1 كان عند رقم هيدروجيني 4 ، في حين انخفضت الانتاجية عند جميع قيم الرقم الهيدروجيني الأعلى من 4 ، كما بين (Mamo et al. (2020) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لإنتاج انزيم البروتيز الحامضي من عزلة *Aspergillus oryzae* DRDFS13 هو (5) ، في المقابل ذكر (Chahrazad et al. (2021) ان درجة الحموضة المثلى لإنتاج انزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus niger* كان عند رقم هيدروجيني (3) ، وأشارت النتائج إلى أن السلالة المختارة كان لها أيضًا نشاط تحلل بروتيني عند درجة حموضة محايدة، لكنه كان أقل أهمية، وقد يقترح أن السلالة أنتجت على الأقل اثنين من البروتيز، أحدهما حامضي بدرجة حموضة مثالية 3 والآخر متعادل عند درجة حموضة 7 .

تُعد درجة الحرارة من العوامل الأساسية المؤثرة بشكل كبير على معدلات نمو وإنتاج الأحياء المجهرية إذ تختلف درجات الحرارة حسب نوع الكائن المجهرى المستخدم ، كما تؤثر على معظم التفاعلات الأيضية للأحياء المجهرية بالأخص النشاطات الإنزيمية في الخلية من خلال تأثيرها على الصفات الفيزيائية للغشاء الخلوي (Banerjee and Ray , 2017) ، إذ بيّن (Othman and Sebo. (2023) أنّ الحد الأقصى لإنتاج انزيم البروتيز الحامضي من عفن *Aspergillus niger* كان عند درجة حرارة 35 م° الا أنّ الارتفاع عن هذه الدرجة يؤدي الى الانخفاض في انتاجية الانزيم حتى يفقد فعاليته عند 45 م° بسبب إطلاق الحرارة الأيضية التي تسبب تجفيف الوسط الزراعي وبالتالي انخفاض النشاط المائي الذي يؤدي إلى انخفاض توافر العناصر الغذائية ، مما يقيد التهوية ويقلل من نمو وإنتاج الأحياء المجهرية أو قد يكون ناتجاً عن دنتره البروتينات وتثبيط الإنزيم وانخفاض نمو الفطريات .

اشار (2012) Shivakumar الى ان درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز الحامضي من عفن *Aspergillus sp.* بلغت 30 م° كما لاحظ كلاً من (Khademi et al. (2013) و (Foda et al. (2012) أن إنتاج البروتيز من *A. niger* باستخدام تخمرات الحالة الصلبة يحدث بشكل أفضل عند درجة الحرارة (30) م°. اشار(2020) Chimbekujwo et al. إن درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus brasiliensis* BCW2. عن طريق استعمال تخمرات الحالة الصلبة هي 30 م° .

ايضاً يختلف حجم اللقاح المستعمل باختلاف نوع وسلالة الكائن المجهرى فضلاً عن طبيعة عملية التخمر ، اذ يعد وسيلة لقياس نمو الكائنات الحية الدقيقة. وأمرًا حيويًا لتحقيق أقصى كمية من الناتج المرغوب أن انخفاض حجم اللقاح المضاف قد لا يكون كافيًا لبدء نمو الاحياء المجهرية أو أنه يستغرق وقتًا طويلاً لنمو وتكاثر الاحياء المجهرية من ناحية أخرى ، سيؤدي ارتفاع حجم اللقاح إلى تقييد حركة الأحياء المجهرية مع تثبيط نموها وتقليل إنتاجية التخمر (Othman and Sebo , 2023). اذ استعمل (Chimbekujwo et al. (2020) 1مل من حجم اللقاح لإنتاج إنزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus brasiliensis* ، كما ذكر (Bensmail et al. (2015) أن حجم اللقاح الأمثل لإنتاج إنزيم البروتيز من عفن *Aspergillus niger* كان  $1 \times 10^6$  بوغ / مل . كما ان هناك ارتباطاً وثيقاً ما بين إنتاج الإنزيمات الميكروبية ومدة التحضين وهذا يعود لوجود علاقة ما بين إنتاج الإنزيمات ونمو الخلايا ، إذ تُعد مدة الحضانة من العوامل المهمة التي تؤثر على نمو وإنتاج الأحياء المجهرية. أن فترة التحضين المثلى لنمو الكائن المجهرى لإنتاج الإنزيمات تتأثر بعوامل عدة أهمها مكونات الوسط الزراعي ونوع الكائن المجهرى ( , Park et al. (1979) ، اذ تختلف فترة التحضين للحصول على أقصى إنتاجية للإنزيم بين الأنواع المختلفة أو حتى في نفس الأنواع المعزولة من مصادر مختلفة( Yimer and Kebede , (2014) .

فقد أشار (2020) Chimbekujwo et al. أن فترة التحضين المثلى لإنتاج إنزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus brasiliensis* BCW2 هي عند 72 ساعة ، كما ذكر(2021) Usman et al. إن أفضل مدة حضانة لإنتاج إنزيم البروتيز الحامضي من الفطريات الخيطية كانت 120 ساعة .

## 8.2 تنقية الإنزيم

وهي سلسلة متتابعة من الخطوات التي يمكن بها فصل الإنزيم عن بقية المواد والبروتينات الأخرى الموجودة في المستخلص الخام والتي يمكن من خلالها ان تزداد الفعالية النوعية للإنزيم ، لقد استخدمت طرق عدّة لتنقية الإنزيم (Banerjee and Ray , 2017) ، منها الترسيب بواسطة الاملاح مثل كبريتات الامونيوم التي تعتمد على اساس معادلة الشحنات على سطح البروتين ، أذ تم اختيارها بسبب الذوبانية العالية لها في الماء حيث يزداد تركيز الملح في كل مرحلة لكي يتم ترسيب البروتينات الأخرى والتي يتم التخلص منها فيما بعد ، وبعد ذلك يذاب الإنزيم بأستخدام داريء معين او بالماء المقطر عن طريق النضح الغشائي بواسطة استخدام اكياس الديلزة ، ويمكن ترسيب الإنزيمات ايضاً عن طريق استخدام المذيبات العضوية مثل الاسيتون والكحول الايثيلي من خلال خفض نقطة التعادل الكهربائي مما يؤدي الى زيادة قوة الجذب بين جزيئات البروتين وبالتالي ترسيبه ( , Fairooz et al. 2021)، والقسم الاخر من طرق التنقية والتي تعتمد على اساس الوزن الجزيئي مثل طريقة النضح الغشائي Dialysis وطريقة الترشيح الفائق Ultra Filtration وطريقة الترشيح الهلامي Gel filtration . وبعضها الأخر يعتمد على مبدأ الشحنات مثل طريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresis وطريقة كروماتوغرافيا التبادل الايوني Ion-exchange chromatography (Kamal et al. , 2017).

اشار (AO et al. (2018) عند استعمال كبريتات الامونيوم لترسيب انزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* وبنسبة اشباع 70% نحصل على فعالية نوعية مقدارها 823.4 وحدة / ملغم وبحصيلة أنزيمية مقدارها 72 % وبتنقية جزئية بلغت 3.6 مرة . كما لاحظ Purushothaman et al. (2019) عند أستعمال كبريتات الامونيوم لترسيب انزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus niger* وبنسبة اشباع 60 % تكون الفعالية النوعية 803.2 وحدة / ملغم ، كما أوضح (Ja'afaru et al. (2020) ان استعمال كبريتات الامونيوم لترسيب انزيم البروتيز المنتج من عفن *Fusarium oxysporum* وبنسبة اشباع 30-80 % يعطي فعالية أنزيمية مقدارها 486 وحدة / مل وبحصيلة أنزيمية مقدارها 27 % وبتنقية جزئية بلغت 1.9 مرة .

قام ( Mamo et al. ( 2020 ) بتنقية أنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 تحت تخمرات الحالة الصلبة بواسطة تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني (IEC) باستعمال عمود DEAE Sepharose fast flow بفعالية انزيمية ( 477.11 ) وحدة / مل وفعالية نوعية ( 183.50 ) وحدة / ملغم بعدد مرات تنقية 6.20 وبحصيلة انزيمية 9.2 % ، وكذلك تمكن ( Rocha et al. ( 2021 ) من استعمال خطوة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-75 لتنقية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus sydowii* URM5774 بفعالية نوعية مقدارها 352 وحدة / ملغم وبحصيلة أنزيمية مقدارها 51 % وبتنقية جزئية بلغت 5.94 مرة ، كما قام ( Hsiao et al. ( 2014 ) بتنقية أنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* بواسطة تقنية AKTA Purifier 10 على عمود Q Sepharose بعدد مرات تنقية 22 وبحصيلة انزيمية 90.6 % ومن ثم استخدم عمود Phenyl Sepharose بعدد مرات تنقية 3.4 وبحصيلة انزيمية 58.8 % ، كما بين ( Li et al. ( 2014 ) عند استعمال خطوة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-75 لتنقية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* و *Aspergillus niger* بفعالية نوعية مقدارها 4015 وحدة / ملغم وبحصيلة أنزيمية مقدارها 33.56 % وبعدد مرات تنقية بلغت 17.09 مرة .

## 9.2 توصيف إنزيم البروتيز

### 1.9.2 الوزن الجزيئي

تختلف البروتيزات في أوزانها الجزيئية نتيجة لإختلاف المصادر المستخلصة منها ، اذ تستعمل عدة طرق لتحديد الأوزان الجزيئية مثل الترشيح الهلامي Gel-Filtration والترحيل الكهربائي Electrophoresis بوجود المادة الماسخة SDS والنبد فائق السرعة Ultracentrifuge ، ويعد الترحيل الكهربائي والترشيح الهلامي من أكثر الطرق المستخدمة لقياس الوزن الجزيئي ( حسناوي وآخرون ، 2024 ، Devi and Hemalatha 2024 ) . ( 2014 ) .

كما لاحظ (Xue et al. (2024) أن الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Trichoderma asperellum* يساوي 36 كيلو دالتون ، وأشار (Wei et al. (2023) إلى أن الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus niger* هو 50 كيلودالتون باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis وباستعمال SDS – PAGE . كذلك لاحظ (Tarek (2023) ان الوزن الجزيئي للبروتيز المستخلص من بكتريا *Bacillus siamensis* CSB55 هو 25 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis ، وأشار (Karray et al. (2021) الى أن الوزن الجزيئي للبروتيز المنتج من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* هو 28 كيلودالتون باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis ، كما لاحظ (Chimbekujwo et al. (2020) ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus brasiliensis* BCW2 هو 68 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis وبوجود المادة الماسخة SDS – PAGE ، واكد (da Silva et al. (2020) ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Rhizopus microspores* يساوي (36) كيلودالتون ، وأشار (Mamo et al. (2020) الى ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis يساوي (40) كيلودالتون ، وأكد (Ao et al. (2018) أن الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* Y1 هو 45 كيلودالتون باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis ، كما اشار (Hsiao et al. (2014) الى ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* يساوي (39) كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis ، وأشار (Devi and Hemalatha (2014) أن الوزن الجزيئي للبروتيز المستخلص من بذور نبات البطيخ هو 54 كيلودالتون بأستعمال طريقة الترشيح الهلامي Gel- Filtration وباستخدام عمود Sephadex G-200 . وأوضح (Al-Soufi (2013) إلى إن الوزن الجزيئي للبروتيز المستخلص من اوراق نبات الخس الشوكي *Lactuca serriola* L. هو 31000 دالتون باستعمال طريقة الترشيح الهلامي Gel-Filtration وباستخدام عمود Sephacryl S- 200 ، لاحظ (Yadav (2011) أن الوزن الجزيئي للبروتيز المستخلص من نبات

في *Euphorbia neriifolia* Linn 35.24 كيلودالتون باستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis وبوحود المادة الماسخة PAGE - SDS ، قد اشار Kumar et al. , (2005) الى ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتين الاسبارتك المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* هو 34 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي . Electrophoresis

## 2.9.2 تأثير الرقم الهيدروجيني على فعالية الإنزيم وثباته

تتأثر فعالية وثباتية الإنزيم بالرقم الهيدروجيني ، وتكون الفعالية القصوى لكل إنزيم عند رقم هيدروجيني معين يسمى بالرقم الهيدروجيني الأمثل وتقل فعالية الإنزيم عند الانحراف عن هذا الرقم (Kuddus , 2019) ، إذ تعتمد الأرقام الهيدروجينية المثلى للأنزيمات على عوامل عدّة مثل طبيعة المحلول الدارء والقوة الأيونية ودرجة الحرارة والمادة الخاضعة وتركيز ومصدر الإنزيم وتركيز المثبطات والمنشطات للأنزيم ، وقد يسبب التغيير في الرقم الهيدروجيني الى حدوث مسخ Denaturation في تركيب البروتين مما يؤدي الى التأثير في طبيعة الإنزيم وفعاليتة ، وللرقم الهيدروجيني تأثير على ايونية الاحماض الامينية الموجودة في الموقع الفعال للأنزيم مما يؤثر على الفعالية الإنزيمية الكلية نتيجة لتأين مكونات وسط التفاعل مثل تأين معقد الإنزيم والمادة الخاضعة وتأين المادة الخاضعة فضلاً عن تأثيره الكبير في ثباتية الإنزيم (Segel , 1976) ،

لاحظ (Hsiao et al. (2014 ان ثباتية فعالية انزيم البروتين المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 3- 3.6 ) في حين إن الرقم الهيدروجيني الامثل للأنزيم كان (3.4) .ونذكر Purushothaman et al. (2019) ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم البروتين المنتج من عفن *Aspergillus niger* كان 4 ، كما لاحظ (Ja'afaru et al. (2020 من أن الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم البروتين المنتج من عفن *Fusarium oxysporum* كان 5 ، واكد da Silva et al. (2020 ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم البروتين المنتج من عفن *Rhizopus microsporus* كان 5.5 ، وأشار (Mamo et al. (2020 أنّ ثبات فعالية الإنزيم المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 كانت في رقم هيدروجيني يتراوح ما بين ( 4.5- 6.5 ) في حين أنّ الرقم الهيدروجيني الامثل للأنزيم

البروتيز كان 5 . وأكد ( Guo et al. (2021) إن ثباتية إنزيم البروتيز المنتج من عزلة *Penicillium sp. XT7* كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين (3-6)، بينما أظهر أعلى نشاط له عند الرقم الهيدروجيني 3 ، وأشار ( Chimbekujwo et al. (2020) إن ثباتية إنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus brasiliensis strain BCW2* كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين (4-6) بينما كان الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم كان 9 ، وذكر ( Karray et al. (2021) ان ثبات فعالية أنزيم البروتيز المنتج من بكتريا *Bacillus stearotherophilus* كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين (7-11) في حين ان الرقم الهيدروجيني الأمثل كان 10 ، اشار *Correia et al. (2023)* بأن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus sp.* كان 5 ، ولاحظ ( Wei et al. (2023) ان ثباتية فعالية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus niger* في رقم هيدروجيني يتراوح بين (2-5) والرقم الهيدروجيني الأمثل للإنزيم كان 3 .

### 3.9.2 تأثير درجة الحرارة على فعالية الإنزيم وثباته

تؤثر درجة الحرارة في سرعة التفاعل الإنزيمي نتيجة لتأين المجاميع الفعالة لكل من الأنزيم والمادة الخاضعة ، وتكون الفعالية القصوى لكل إنزيم عند درجة حرارة معينة تسمى بدرجة الحرارة المثلى ، ويعتمد تأثير درجة الحرارة في فعالية الإنزيم على تركيز المادة الخاضعة وثباتها وطبيعة بروتين الإنزيم وثباته والافه بين الأنزيم والمادة الخاضعة والقوة الأيونية ووجود المنشطات والمثبطات والرقم الهيدروجيني ، فضلاً عن ان وجود بعض المواد الأخرى مع الأنزيم مثل الكربوهيدرات والبروتينات التي تعطي حماية للأنزيم وتجعله أكثر مقاومة للحرارة ، فالإنزيمات النقية لاتستطيع مقاومة الارتفاع في درجات الحرارة بينما الإنزيمات غير النقية تكون أكثر مقاومة للحرارة (Punekar , 2018) .

أشار ( Wei et al. (2023) أن درجة الحرارة المثلى لأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus niger* كانت 50 م° واحتفظ الإنزيم بنشاطه بنسبة 81% عند درجة حرارة 60 م° ، لكن لم يظهر اي نشاط للإنزيم عند درجة حرارة 65 م° وعندما تم تحضين الأنزيم عند درجة حرارة 30-50 م° لمدة 3 ساعات، أظهر الإنزيم ثباتاً عالياً، بينما انخفض نشاط الإنزيم بشكل ملحوظ إلى ما بعد 50 م° ، وتم تعطيله تماماً بعد 10 دقائق من التحضين عند 60 م° ، وأشار ( Tarek et al. (2023) ان درجة الحرارة المثلى لأنزيم البروتيز المنتج

من عفن *Bacillus siamensis* CSB55 كانت 55 م° وان ثباتية الانزيم تكون عند مدى من درجات الحرارة تراوحت بين (30-80) م° واحتفظ الإنزيم بنشاطه بنسبة 80% عند درجة حرارة 40 و50 و60 و70 و80 م° لمدة 16 و14 و10 و6 و4 ساعات على التوالي ، واحتفظ الإنزيم بنشاطه بنسبة 50% عند حضنه عند درجة حرارة 80 و90 م° لمدة 4 و2 ساعة على التوالي ، ولاحظ ( Guo et al. (2021) ان درجة الحرارة المثلى لأنزيم البروتيز المنتج من عزله *Penicillium sp. XT7* كانت 30 درجة مئوية واحتفظ الانزيم بنسبة 86.8% من الحد الأقصى للنشاط عند 20 درجة مئوية وانخفض نشاطه المتبقي بشكل ملحوظ بعد الحضان عند 50 م° ، واكد ( Ao et al. (2019) من أن درجة الحرارة المثلى لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* كانت 55 م° ، كما أشار Souza et al. (2017) عند توصيف البروتيز الحامضي المنتج من عفن *Aspergillus foetidus* ان درجة الحرارة المثلى لأنزيم البروتيز هي (55) م° وان ثباتية الانزيم تكون عند مدى واسع من درجات الحرارة تتراوح بين (30-60) م° ، وقد لاحظ ( Sampaio et al. (2011) عند دراسته تأثير درجة الحرارة على الإنزيم البروتيني الحامضي المنقى والمنتج من عفن *Aspergillus clavatus* عند مدى واسع من درجات الحرارة تراوحت بين (20-65) م° أنّ درجة الحرارة المثلى لإنزيم البروتيز هو (55) م° وان ثباتية الانزيم تكون عند مدى من درجات الحرارة تراوحت بين (30-60) م° .

#### 4.9.2 الثوابت الحركية

تعد الثوابت الحركية التي تشمل السرعة القصوى (Vmax) وثابت ميكالس (Km) من القيم المهمة للتفاعلات الإنزيمية ، ، اذ يعرف ثابت ميكالس (Km) بأنه تركيز المادة الخاضعة التي تكون عندها سرعة التفاعل الانزيمي تساوي نصف السرعة القصوى ، وتعتبر قيمة ثابت ميكالس (Km) عن الألفة بين الانزيم والمادة الخاضعة ، إذ ان الفعالية الإنزيمية تكون عالية للأنزيمات التي تكون فيها قيمة ثابت ميكالس واطئة وعلى العكس من ذلك تكون الفعالية الانزيمية واطئة للأنزيمات التي تكون فيها قيمة ثابت ميكالس عالية (2000, Copeland) .

أشار ( Wei et al. (2023) عند استعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة (الكازين) تراوحت بين (0.2 - 3) غرام / لتر عند رقم هيدروجيني 3 ودرجة حرارة

40 م<sup>3</sup> وباستخدام طريقة Lineweaver-Burk ، ان قيم الثوابت الحركية (Km) و (Vmax) لأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus niger* كانت 2.44 ملغم /مل و 83.54 وحدة / ملغم على التوالي ، كما ذكره (Ahmadi et al. (2021) أن قيم الثوابت الحركية لأنزيم بروتيز الاسبارتك Km و Vmax عند استعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة ( الكازين ) كانت 1.017 ملغم / مل و 128 وحدة / مل على التوالي ، كما أشار (Mamo et al. (2020) ان الثوابت الحركية Km و Vmax لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 كانت 17.5 ملي مولاري و 1369 وحدة / مل على التوالي . ولاحظ (Song et al. (2020) بأن قيم الثوابت الحركية Km و Vmax لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus niger* F0215 كانت 3.6 ملغم / مل و 504.8 غرام / مل في الدقيقة على التوالي ، وأوضح (Purushothaman et al. (2019) ان قيم الثوابت الحركية (Km) و (Vmax) لأنزيم بروتيز الأسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus niger* كانت 6.3 ملغم / مل (98.52 مايكرومتر) ، و 50 مايكرومول / دقيقة على التوالي ، ولاحظ (Ao et al. (2018) عند استعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة ( الكازين ) تراوحت بين ( 0.5 - 3 ) غرام / لتر عند رقم هيدروجيني 7 ودرجة حرارة 55 م<sup>3</sup> وباستخدام طريقة Lineweaver- Burk ، أن قيم الثوابت الحركية Km و Vmax لأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* Y1 كانت 20.0769 ملغم /مل و 256.4103 غرام / مل في الدقيقة على التوالي ، كما أكد (Souza et al. (2017) ان قيم الثوابت الحركية Km و Vmax لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى المنتج من عفن *Aspergillus foetidus* كانت 0.81 ملي مولاري و90 وحدة/مل على التوالي ، كما استطاع (Niyonzima et al. (2015) من تحديد قيمة الثوابت الحركية (Km) و (Vmax) لأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus terreus* gr وكانت 5.4 ملغم /مل و 12.8 وحدة لكل مل على التوالي عند رقم هيدروجيني 11 ودرجة حرارة 50 م<sup>3</sup> وباستخدام طريقة Lineweaver- Burk .

## 5.9.2 تأثير العناصر المعدنية والمنشطات والمثبطات على فعالية انزيم بروتيز

### الاسبارتك

تؤثر المركبات والايونات المعدنية على فعالية الإنزيمات ، فبعضها يرتبط بالإنزيم ويزيد من فعاليته وتسمى بالمنشطات Activators والبعض الاخر يقلل من فعالية الانزيم وتسمى بالمثبطات Inhibitor ، (Usharani et al. , 2010) .

ان تأثير المثبطات على المادة الخاضعة يكون من خلال ارتباطها بالموقع الفعال مما يؤدي الى تقليل الالفة بين المادة الخاضعة والانزيم ، إذ أنّ عملية تثبيط الانزيم تعتمد على تركيز المثبط وتركيز المادة الخاضعة وطبيعتها وتركيز الإنزيم ومصدره ووقت التفاعل ودرجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والقوة الأيونية ( Panesar et al. ,2006) .

لاحظ (Xue et al. (2024) أن الفعالية الانزيمية لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Trichoderma asperellum* أنخفضت بوجود مركب Pepstatin A بستعمال التراكيز (0.01 , 0.02 ) ملي مولاري ، كما أنخفضت الفعالية الانزيمية بوجود مركب EDTA و PMSF عند أستعمال تركيز ( 1 ) ملي مولاري عند أستعمال تركيز ( 5 ) ملي مولاري ، وأشار ( Song et al. ( 2020 ) إلى أنّ ايونات  $Mn^{2+}$  و  $Cu^{2+}$  كان لها تأثير في زيادة فعالية انزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus niger* F0215 في حين ان استعمال البيستاتين ادى الى تثبيط الانزيم بصورة كاملة ، وذكر ( Souza et al. (2017) من أن فعالية أنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى المنتج من عفن *Aspergillus foetidus* ازدادت بوجود بعض الأيونات مثل النحاس والمغنسيوم والكالسيوم والزنك بفعالية باستعمال تركيز (1) ملي مولاري كما ارتفعت الفعالية الانزيمية بأستعمال مركب SDS باستعمال تركيز ( 1 ) ملي مولاري ، في حين أنخفضت الفعالية الانزيمية بوجود مركب Pepstatin A و EDTA باستعمال تركيز ( 5 ) ملي مولاري ، كما لاحظ ( 2014 ) ( Devi and HemaLatha بأن انزيم البروتيز المنتج من بذور *Cucumis melo* Var *agrestis* قد تُبط بصورة كاملة عند حضنه مع 5 ملي مولاري من مادة PMSF بينما تأثر الانزيم قليلاً عند حضنه مع مادة EDTA ، كما لاحظ (Hsiao et al. (2014) عدم وجود إي تأثير تثبيطي عند إضافة 10 ملي مولاري من EDTA لأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* عند الرقم الهيدروجيني 3.4 ودرجة حرارة 35 م° ، بينما حصل تثبيط عمل الانزيم بشكل كامل عند استعمال مادة البيستاتين Pepstatin A ، في حين لم

يكن لإضافة 1 ملي مولار  $Ca^{2+}$  أي تأثير على نشاط التحلل البروتيني، اما عند إضافة 1 ملي مولاري  $Zn^{2+}$  و  $Ni^{2+}$  و  $Cu^{2+}$  و  $Mn^{2+}$  و  $Co^{2+}$  أدت إلى تقليل نشاط الإنزيم بشكل طفيف ، وأشار (Yin et al. (2013) بأن فعالية أنزيم البروتيز المنقى المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* BCRC ازدادت بوجود بعض الأيونات مثل البوتاسيوم والكوبلت والمغنسيوم والزنك عند استعمال تركيز ( 1 ) ملي مولاري بينما أنخفضت الفعالية الانزيمية بوجود أيونات أخرى مثل الصوديوم والحديدوز والحديدك عند استعمال تركيز ( 1 ) ملي مولاري ، وفي دراسة قام بها (Marcial et al. (2011) لإنتاج إنزيم بروتيز الأسبارتك من فطر *Amylomyces rouxii* ، إذ أظهرت النتائج ان استعمال 3 ملي مولاري من البيستاتين يعمل على تثبيط الإنزيم بنسبة 73% ، الا أن استعمال 1 ملي مولاري من PMSF يعمل على تثبيط عمل الانزيم بنسبة 12% ، في حين ان استعمال 1 ملي مولاري من EDTA يعمل على تثبيط عمل الانزيم بنسبة 20% .

## 10.2 تطبيقات انزيم بروتيز الأسبارتك

تعد البروتيزات من أهم الإنزيمات التي تلعب دوراً مهماً في مجال التطبيقات الغذائية والصناعية والعلاجية ، إذ استخدمت البروتيزات بنسبة 75% في تصنيع الكثير من المواد مثل صناعة الجلود والصناعات الغذائية والمستحضرات الصيدلانية ومستحضرات التجميل، ويتميز البروتيز بالقدرة على تخثر الكازين في صناعة الاجبان وتحسين النكهة في الأطعمة وتصفية عكارة العصائر والنيبيذ ، وتلعب البروتيزات دوراً بارزاً في تطرية اللحوم، وخاصة لحم البقر فهي تمتلك القدرة على تحلل بروتينات النسيج الضام بالإضافة إلى بروتينات الألياف العضلية ( Panda et al. ,2016 ; Gimenes et al. ,2021 ) .

كذلك كان للبروتيز المنتج من مصادر ميكروبية دور فعال لعلاج بعض الأمراض مثل تقرحات الجلد والسرطان ومشاكل القلب واضطرابات الجهاز الهضمي والالتهابات ( Chanalia et al. ,2011 ) . كما استعمل بروتيز الأسبارتك في صناعة بعض الأدوية التي تمت الموافقة عليها من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية ( Craik et al. ,2011 ) ، فضلاً عن ذلك استعملت البروتيزات في المجال الطبي لمعالجة المرضى الذين يعانون من اضطرابات الجهاز الهضمي ومعالجة الحساسية تجاه بعض الأغذية ( Souza et al. ,2015 ) ، كما تستعمل البروتيزات في صناعة حليب الأطفال وخصوصاً للأطفال الذين

يعانون من حساسية الحليب لعدم قدرتهم على هضم بعض البروتينات ، *Fleischer et al.* , (2016) ، تُعد البروتينات المنتجة من انواع بكتريا *Bacillus* من اكثر البروتينات المستخدمة في المدابغ كبديل عن المضافات الكيميائية الخطرة ، إذ إن استعمال الإنزيمات المحللة للبروتين يقلل من التلوث ويحسن من جودة الجلد (*Da Silva , 2017*) ، كما كان للبروتين دوراً مهماً في صناعة البيرة فقد أظهرت إحدى الدراسات ان البروتين المنتج من *Sphaerobacter thermophiles* كان فعالاً للغاية في إنتاج بيرة خالية من الكلوتين. إذ تمت إضافة البروتين إلى الشعير أثناء عملية التخمير مما أدى إلى الحصول على بيرة عالية الجودة خالية من الكلوتين (*Shetty et al. , 2017*) ، تعتمد صناعة الخبز بصورة رئيسية على تحلل الكلوتين من اجل تحسين جودة القمح المستخدم في تحضير العجين ، وتُعد البروتينات الميكروبية من الانزيمات المناسبة لتحلل الكلوتين وتحسين نوعية العجينة المستخدمة في صناعة الخبز كما ان البروتين المنتج من بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* يلعب دوراً حيوياً فعالاً في تحسين جودة العجين المستخدم في صناعة البسكويت (*Gurumallesh et al. , 2019*) ، وكما يُعد التضبب إحدى المشاكل الشائعة في تصنيع البيرة لأنه يؤثر على صفات المنتج النهائي ، والذي يتكون من تفاعل البروتينات والبوليفينول المستخرج من الانسجة النباتية ، وهو مكون من البروتينات بنسبة (40 - 75 %) والبوليفينول بنسبة (2- 15 %) ، وتسمى البروتينات التي تساهم في تكوين التضبب بالبروتينات الغنية بالسستين ، فعند اضافة انزيم بروتيناز الاسبارتك الى البيرة فإنه يعمل بشكل فعال على تحلل هذه البروتينات ومنع تكوين الضباب في البيرة المعبأة في القناني الزجاجية دون التأثير على رغووة البيرة المرغوبة (*Lopez and Edens , 2005 ; Mamo and Assefa ,2018*) .

استعملت البروتينات في انتاج المتحللات البروتينية من مخلفات الحيوانات والاسماك في المجازر ، والتي تتميز بقيمتها الغذائية العالية إذ يمكن إضافتها الى الاعلاف الحيوانية والبروتينات الاخرى لغرض تحسين خواصها الوظيفية (زيادة الذائبية والسعة الرغوية والثبات) ، وبالتالي إمكانية استعمال هذه المتحللات في الكثير من التطبيقات منها استخدامها في تصنيع أغذية الأطفال الرضع، ومنتجات غذائية علاجية محددة ، وعصائر الفاكهة والمشروبات الغازية وغيرها (*dos Santos Aguilar and Sato, 2018*) ، إذ قام

Wei et al. (2023) بأستعمال بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus niger* في تحلل بروتين فول الصويا .

كذلك البروتيزات لها القدرة على تخثر بروتينات الكازين الموجودة في الحليب و تصنيع الجبن بعد إزالة مصل الحليب منها ، وبهذا فأن انزيم البروتيز المايكروبي يحل محل انزيم الرنين الذي ينتج من المعدة الرابعة للعجول الرضيعة ، إذ استعملت البروتيزات المنتجة من الميكروبات مثل *Bacillus subtilis* و *Mucor michei* و *Endothia parasitica* و *Aspergillus saitoi* ، *Aspergillus fumigates* ، *Aspergillus oryzae* ، *Aspergillus niger* *Aspergillus awamori* في انتاج الجبن ( ، Ghani et al. ، 2013 ; Hailemichael et al., 2021 ) .

يتمثل دور الانزيمات لأنتاج الجبن في تحلل الاصرة الببتيدية في الموقع ( Phe 105 - Met 106 ) لتكوين para-K-casein والببتيدات ، اذ يستخدم انزيم الرنين نظراً لتخصصه العالي في تخثر الكازين، وهو ما يفسر أدائه الاستثنائي في إنتاج الجبن ، ان عملية التخثر الانزيمي للحليب تمر بمرحلتين ، المرحلة الاولى تتمثل بدور المنفحة الحيوانية ( الرنين ) او بعض البروتيزات الاخرى التي تقوم بتخثر الحليب مع انقسام K-casein في الاصرة الببتيدية ( 106-105 ) وتحرر الكلايكوببتيد glycopeptide المحب للماء ( hydrophilic ) للسلاسل الجانبية للبروتين من الاواصر ( 106 ) الى ( 169 ) و para-K-casein الكاره للماء ( hydrophobic ) مع تحلل البروتينات الاخرى مثل (  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2-, and  $\beta$ -caseins and  $\alpha$ -lactalbumin ) ولكن بنسبة منخفضة ( Crabbe , 2004 ; Yegin et al. , 2011 ) . اما دور البروتيزات الفطرية في هذه المرحلة فأنها تسبب تحللاً مائياً غير محدد وواسع النطاق لكل من K-casein و para-K-casein مقارنة بالمنفحة الحيوانية ( الرنين ) التي يقتصر نشاطها على التحلل المائي للـ K-casein مع تحرر الببتيدات و para-K-casein ، اما المرحلة الثانية تكون غير إنزيمية حيث يتجمع para-K-casein والكازينات الأخرى تحت تأثير ايونات الكالسيوم  $Ca^{2+}$  مما يؤدي في النهاية إلى تكوين الهلام ( Mamo and Assefa , 2018 ) . وفي دراسة قام بها كل من ( Abbas et al. (2013) و Amer et al. (2015) اذ أظهرت النتائج ان إنتاج الجبن الأبيض الطري باستخدام البروتيز الفطري ( 1 مل بروتيز فطري / 100 مل حليب) المنتج من *Rhizomucor miehei* NRRL

2034 كان قريب جداً من الجبن المنتج بواسطة المنفحة الحيوانية ، وأظهر الجبن المنتج باستخدام المنفحة الفطرية قيماً أفضل للنيتروجين الذائب (SN)، والأحماض الدهنية الكلية المتطايرة (TVFAs)، والتايروسين، والتريبتوفان مقارنة بالجبن المنتج بواسطة المنفحة الحيوانية . علاوة على ذلك، أظهر الفحص الحسي الذي أجري على الجبن المنتج بالمنفحة الفطرية أن الجبن المنتج كان له مظهر وملمس ناعم وطعم مرغوب أثناء التخزين البارد لمدة شهرين . وفي دراسة اخرى للمقارنة بين منفحة العجل والمنفحة الميكروبية المنتجة من *Bacillus amyloliquefaciens* لإنتاج جبن الشيدر ، لم يكن هنالك اختلافاً كبيراً في التركيب الإجمالي باستثناء الرقم الهيدروجيني مع زيادة تركيز البيبتيدات في العينتين من الجبن أثناء فترة النضج . ومع ذلك، كانت نسبة البيبتيدات الكارهة للماء اعلى من البيبتيدات المحبة للماء في التخثر بأستعمال المنفحة الحيوانية . وكان الجبن المنتج بواسطة المنفحة الميكروبية أكثر ليونة من الجبن المنتج من المنفحة الحيوانية نتيجة للتحلل المائي العالي للبروتين مما أدى إلى تقليل وقت النضج (An et al. , 2015) . كما اشار (Mamo et al. (2020) في دراسته حول انتاج إنزيم بروتيز الأسبارتك من عفن *Aspergillus DRDFS13 oryzae* بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة ، الى انه يمكن استعمال انزيم البروتيز المنتج كمصدر بديل عن المنفحة الحيوانية في انتاج الجبن .

### 1.10.2 تطبيقات انزيم بروتيز الأسبارتك في تطرية اللحوم

الطراوة من أهم الصفات النوعية في اللحم والتي تحدد مدى قابلية اللحم للطهي وسهولة المضغ وهي من الأهداف المهمة للمختصين بصناعة اللحوم ، وإن انخفاض طراوة اللحوم مع تقدم العمر يعزى الى التغيرات الطبيعية التي تحدث في بروتينات الأنسجة الرابطة الموجود في اللحم (الكولاجين والرتكيولين، والايلاستين) والتي تتصلب مع تقدم العمر (Warner et al. , 2022) ، إن قوام اللحم يعتمد على الكولاجين ونوعيته في الأنسجة الرابطة وكذلك يعتمد على بروتينات اللييفات المسؤولة عن ميكانيكية العضلة ، اذ تتكون الأنسجة العضلية من الروابط الكولاجينية بين جزيئات الكولاجين وهما الروابط العضلية والروابط الطولية ، فعندما تحتوي العضلة على الروابط الطولية بكمية اكبر من الروابط العضلية سيكون اللحم اكثر طراوة وهذا ما موجود في الحيوانات الصغيرة . أما إذا احتوت العضلة على نسبة أكبر من الروابط العضلية فيكون اللحم صلباً وهذا ما موجود في الحيوانات الكبيرة (Singh, 2019; الطائي ، 1986) .

إن عمليات التطرية تعمل على تحطيم الأنسجة الضامة والبروتين الليفي العضلي في الحيوانات المسنة ، ومن الطرق الأكثر شيوعاً لتطرية اللحوم هي العمليات الميكانيكية والكيميائية والبيولوجية، اذ يتم استخدام العمليات الميكانيكية مثل طريقة التعليق، والتحفيز الكهربائي، والتدحرج، والطحن (Verma et al., 2019) .

تعد الطرق الكيميائية لتطرية اللحوم من الطرق السريعة وقليلة التكلفة مثل استعمال المخلاتات ، اذ يتم استعمال المخلاتات مع الإبر التي يتم حقنها في الذبائح أو أجزائها العميقة ، ومن الطرق التي اعتاد المكسيكيون الأوائل على استخدامها هي تغليف اللحوم عن طريق لفها بأوراق البابايا لتطريتها . كما تستعمل الطرق البيولوجية في تطرية اللحوم مثل الإنزيمات ، والتي تتم عن طريق حقن اللحوم بالإنزيمات اونقعها لتسريع عملية التطرية (Zhang et al. , 2017 ; Mohd et al. , 2023) .

لاحظ (Jahanbin 2021) من أن ارتفاع نسبة الأحماض الأمينية الناتجة عن التحلل البروتيني لبروتينات اللحوم انعكس بشكل كبير على زيادة عامل التايروسين / التربتوفان الذي كان مؤشراً على زيادة المواد النيتروجينية الذائبة ، أشار البدر ( 1998 ) بأن حجم المستخلص المتحرر سوف ينخفض عند معاملة اللحم البقري بالإنزيمات المختلفه مما يؤدي الى زيادة طراوة اللحوم ، وأكد (Ashie et al. 2002) ان استعمال بروتيز الاسبارتك في تطرية لحوم الابقار ادى الى زيادة الطراوة بنسبة 25 إلى 30% ولم يتأثر الإنزيم سلبيًا بتركيز الملح والفوسفات والحامض عند اضافته للحوم المتبله ، ولاحظ حسين ( 2005 ) ان قيمة الرقم الهيدروجيني لاتنخفض عند معاملة اللحم البقري بأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Penicillium camemberti* ، وفي دراسة مقارنة قام بها (Ha et al. 2013) بين البروتيز التجاري البكتيري والفطري من جهة وانزيم الباباين من جهة اخرى واستعمالها في تطرية لحوم الابقار ، اذ لاحظ ان البروتيز البكتيري كان فعالاً في التحلل المائي لمعظم البروتينات اللبينة العضلية والكولاجين، ويبدو أنه أكثر كفاءة من انزيم الباباين في التحلل المائي لبروتينات الكولاجين ، من ناحية أخرى، أظهر البروتيز الفطري خصوصية انتقائية تجاه البروتينات اللبينة العضلية في اللحوم، كما كانت له ألفة عالية تجاه بروتينات الكولاجين وان هذه البروتيزات لديها قدرة جيدة لتطرية اللحوم بسبب آثارها الخفيفة على بروتينات اللحوم المختلفة .

أشار ( Akpan and Omojola (2015) عند استعمال تراكيز مختلفة من إنزيم البروتيزفي تطرية اللحوم ، أذ كان هناك تحسن في الطراوة و العصيرية ودرجات القبول العام في عينات اللحم البقري المعاملة بأنزيم البروتيز ، كما لاحظ ( Lee et al. (2017 بأن نسبة الفقد بالوزن للحوم أثناء الطبخ تنخفض عند إضافة الإنزيم نتيجة لزيادة الارتباط وبالتالي انخفاض الفقد بالوزن ، كما أكد ( Chanalia et al. (2018 الى إمكانية استعمال بروتيز الأسبارتك المنتج من بكتريا *Lactobacillus plantarum* لأداء الوظيفة المزدوجة كاستعمالها لصحة الامعاء وتطرية اللحوم ، وأنَّ فعالية الإنزيم في شكله المنقى او بالاشتراك مع إنزيمات أخرى يؤدي إلى تحلل الكولاجين وتطرية اللحوم ، لاحظ ( Sun et al. (2018 عند دراسته تأثير إنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من غفن *Rhizomucor miehei* CAU432 على لحم الخنزير من حيث نسبة الفقد بالوزن اثناء الطبخ cooking loss وقوة القطع shear force وبالمقارنة مع إنزيم الباباين papain والعينة الضابطة ( blank ) ، وبينت النتائج عدم وجود فرق كبير في نسبة الفقد بالوزن اثناء الطبخ بين العينة المعالجة بأنزيم بروتيز الاسبارتك وبين العينات الأخرى ، بينما كانت قوة القطع في العينة المعالجة بأنزيم بروتيز الاسبارتك هي ( 26.7 نيوتن ) وهي أقل من العينات الأخرى التي كانت قوة القطع فيها ( 27.9 نيوتن ) ، كما لاحظ ( Habtu et al. (2020 عند معاملة اللحم البقري بأنزيم البروتيز فأن الانخفاض في الرقم الهيدروجيني يكون قليل وبالتالي تبقى قيمة الرقم الهيدروجيني مبتعدة عن نقطة التعادل الكهربائي مما يؤدي الى الحفاظ على طراوة اللحوم ، وأكد ( Jahanbin (2021 من أن ارتفاع نسبة الأحماض الأمينية الناتجة عن التحلل البروتيني لبروتينات اللحوم انعكس بشكل كبير على زيادة عامل التايروسين / التربتوفان الذي كان مؤشراً على زيادة المواد النيتروجينية الذائبة ، وقد ذكر ( Akbari et al. (2021 أن انخفاض الفقد بالوزن للحوم المعاملة بالإنزيم أثناء الطبخ يعود الى التماسك الحاصل للشبكة البروتينية بين سلاسل الأكتين والمايوسين ، وكما أشار ( et al. (2023) عند دراستهم نسبة الفقد بالوزن للحوم المعامل بأنزيم البروتيز ، أذ انخفضت نسبة الفقد بالوزن للحوم المعامل بالإنزيم مقارنة بعينة اللحم غير المعامل .

## 3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

## 1.3 الأجهزة والأدوات المستخدمة في الدراسة وكما في الجدول ( 1.3 )

جدول ( 1.3 ) الاجهزة والأدوات المستخدمة في الدراسة

ت	أسم الجهاز	المنشأ	الشركة المصنعة
1	أكياس ديلزة 12000 - 14000 دالتون	British	Serva
2	جهاز polymerase chain reaction ( PCR )	USA	labnet international inc
3	جهاز الترحيل الكهربائي Electrophoresis Device	USA	CBS, Scientific
4	جهاز التعقيم ( المؤصدة ) Autoclave Device	Japan	Hirayama
5	جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer uv/visible Device	Germany	Pye Germany
6	جهاز النبذ المركزي المبرد Refrigerated centrifuge Device	Germany	Tafesa Hannover-W-
7	الحاضنة Incubator	Germany	Binder
8	حاضنة هزازة Shaker incubator	Germany	Kottermann
9	حمام مائي Water bath	Germany	GFL
10	فرن حراري هوائي Air oven	Germany	Kottermann
11	مازج Vortex	Brazil	Fanem
12	مازج مغناطيسي ذو الصفيحة الساخنة hot plate Magnatic stirrer	Germany	Heldolph MR3001
13	المجفف Freeze dryer	Denmark	Hetosicc
14	مجهر ضوئي Light Compound Microscope	Germany	Ernstieitz Wetzlirgm
15	Vacuum pump	USA	Platinum

EMCO	Germany	pH-meter	16
Denver	Germany	Sensitive balance	17
Biohazard	Germany	millipore filter 0.45 µm	18
CBS, Scientific	USA	Slab gel electrophoresis	19
EuroClone	Italy	AURA TM PCR Cabinet	20
Vilber Lourmat	France	UV.transmission	21

### 2.3 المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة كما في الجدول ( 3 - 2 )

جدول ( 3 - 2 ) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة

الشركة المنتجة	المادة	ت
BDH	2-Mercaptoethanol	1
Intron / Korea	6X Loading dye	2
Gainland Chemical Company / U. K.	Acetic acid	3
Santa Cruz Biotechnology / USA	Acrylamide	4
Himedia	Agar- Agar	5
Conda / USA	Agarose	6
Santa Cruz Biotechnology / USA	Ammonium persulfate	7
Thomas Baker	Ammonium sulphate	8
Biopure / Korea	Bis-Acrylamide	9
Fluka	Boric acid	10
Pharmacia Fine and chemicals	Bovine Serum Albumin (BSA)	11
BDH	Calcium chloride	12
BDH	Casein	13
BDH	Chloroform	14
BDH	Cobalt chloride	15
Pharmacia/Sweden	cotton blue	16
BDH	copper dichloride	17
BDH	Copper sulfate pentahydrate	18

BDH	Chloramphenicol	19
Pharmacia/Sweden	Coomassie Brilliant Blue R- 250	20
BDH	Dipotassium phosphate	21
BDH	Dimethylsulfoxide DMSO	22
BDH	Ethanol	23
BDH	Ethylene diamine tetra acetic acid ( EDTA )	24
BDH	Folin Reagent	25
BDH	Glacial Acetic Acid	26
Merck	Glycerol	27
Santa Cruz Biotechnology / USA	Glycine	28
Thomas baker/ India	Hydrochloric acid	29
Merck	<b>iron dichloride</b>	30
BDH	Iron(II) sulfate heptahydrate	31
Merck	Iron(III) chloride	32
Intron / Korea	Ladder 100 bp	33
BDH	Lactic acid	34
Fluka	magnesium sulfate heptahydrate	35
BDH	Manganese dichloride	36
BDH	<b>Manganese sulfate heptahydrate</b>	37
Alpha Chemika / India	Methanol	38
MCE	Pepstatin	39
Himedia	Peptone	40
BDH	Potassium chloride	41
BDH	Potassium nitrate	42
Intron / Korea	Pre mix pcr	43
Integrated DNA technologies /USA	Primer	44
Bioneer/ Korea	Protein Size Marker (Broad)	45
Intron / Korea	Red safe staining souluion	46
Spain / Scharlau	Sephadex G – 100	47
Regilait	skimmed milk powder	48

Thomas baker/ India	Sodium acetate	49
BDH	Sodium azide	50
BDH	Sodium carbonate	51
BDH	Sodium citrate	52
Santa Cruz Biotechnology / USA	Sodium Dodecyl sulphate ( SDS)	53
Proanalysis/ Sweden	Sodium hydroxide	54
BDH	Sodium hypochlorite	55
BDH	Sodium nitrate	56
BDH	sodium phosphate	57
Pharmacia	Sodium sulfate	58
BDH	Sodium tartrate	59
السوق المحلي	Soybean hull	60
Sigma	Sulfuric acid	61
Conda / USA	TBE buffer 10 X	62
Scharlauchemie S.A./SPAIN	N,N,N,N, Tetra methyl ethylene diamine TEMED	63
BDH	Trichloro acetic acid (TCA)	64
Santa Cruz Biotechnology / USA	Tris Base	65
مطحنة ميسان / محافظة ميسان	Wheat bran	66
Himedia	Yeast extract	67
BDH	Zinc sulfate heptahydrate	68
BDH	Zinc chloride	69
Zymo / USA	ZR Fungal/Yeast/Bacterial DNA MiniPrep	70

### **Raw materials 3.3 المواد الأولية**

تضمنت المواد الأولية 2 كغم من اللحم تم شرائها من المجزرة التابعة الى كلية الزراعة / جامعة البصرة .

### **4.3 مصادر العزلات**

#### **1.4.3 التربة**

جُمعت نماذج التربة من مناطق مختلفة في محافظة البصرة (وشملت شارع الألبان في العشار ، أبي الخصيب ، الزبير ، تربة حدائق جامعة البصرة / كلية الزراعة ، القرنة ، الدير

،حدائق كلية العلوم ، كرمة علي ، حدائق كلية التربية ، محطة أبحاث الهارثة ) وأخذت العينات من عمق 2- 5 سم باستخدام ملعقة معقمة ووضع في أكياس من البولي إثيلين المعقمة وتم غلقها بإحكام ونقلت الى المختبر لأجراء عملية العزل (Baxter *et al.*, 1999).

### 2.4.3 الحبوب

جُمعتُ عينات الحبوب من الرز والحنطة والشعير والذرة ( كل عينة تحتوي على 100 حبة والمأخوذه من كل 1 كغم من الحبوب وبشكل عشوائي ) للحصول على عينة ممثلة من الحبوب التجارية المتوفرة في الأسواق المحلية ، ووضع في أكياس من البولي إثيلين المعقمة وتم غلقها بإحكام ونقلت الى المختبر لأجراء عملية العزل (Inyawilert *et al.*, 2020).

### 5.3 المحاليل

#### 1.5.3 محلول البيبتون المخفف ( 0.1 % )

حُضِرَ بإذابة 1 غم من مادة البيبتون في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم الى 1 لتر ، ثم عقم في جهاز المؤصدة على درجة حرارة 121م ولمدة 15 دقيقة واستعمل هذا المحلول لعمل التخافيف العشرية أثناء عملية العزل (Maitig *et al.*, 2018) .

#### 2.5.3 محلول اللاكتوفينول

حضر حسب طريقة (Mcginnis 2012) باستعمال 20 مل من الماء المقطر لإذابة 0.05 غم من صبغة cotton blue وأضيف إليها مع المزج 20 مل من حامض اللاكتيك و20 غم من الفينول البلوري و40 مل من الكليسرول ، أستعمل هذا المحلول في عملية تصبيغ المستعمرات .

#### 3.5.3 محلول الأمونيا

حُضِرَ حسب مايبينه ( Saito and Machida ( 1999 ) وذلك بأخذ 25 مل من محلول هيدروكسيد الامونيوم ( تركيز 96% ) وأضيف اليه 75 مل من الماء المقطر ليصبح تركيز المحلول 25 % . اذ استعمل لأختبار قابلية الاعفان على انتاج الافلاتوكسين .

**4.5.3 محلول دارىء فوسفات البوتاسيوم 0.2 مولاري ( pH 5 )**

حُضِرَ من أذابة 12.864 غم من  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  و 6.292 غم من  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 600 مل ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

**5.5.3 المحلول الملحي تركيز 0.5%**

حُضِرَ بإذابة 2 غم من  $\text{KNO}_3$  و 0.5 غم من  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ، 1 غم من  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ، 0.439 غم من  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ، 1.116 غم من  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ، 0.203 غم من  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  في لتر من الماء المقطر مع ضبط الرقم الهيدروجيني عند 5 (Usman et al.,2021) ، استعمل هذا المحلول في عملية الترطيب اثناء التخمرات الصلبة .

**6.5.3 محلول دارىء السترات 0.2 مولاري ( pH 3 )**

حُضِرَ محلول دارىء السترات بإذابة 9.12 غم من خلات الصوديوم في الماء المقطر وبعد ذلك اضيف اليه 0.64 غم من حامض الستريك ثم اكمل الحجم الى 250 مل بالماء المقطر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

**7.5.3 محلول دارىء السترات 0.2 مولاري ( pH 4 )**

حُضِرَ بإذابة 6.72 غم من خلات الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد ذلك أُضِفَ إليه 3.87 غم من حامض الستريك ثم اكمل الحجم الى 250 مل بالماء المقطر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

**8.5.3 محلول دارىء الخلات 0.2 مولاري ( pH 5 )**

حُضِرَ محلول دارىء الخلات بإذابة 2.38 غم من خلات الصوديوم المائية في الماء المقطر وبعد ذلك أُضِفَ إليه 1.95 غم من حامض الخليك ثم اكمل الحجم الى 250 مل

بالماء المقطر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

### 9.5.3 محلول دارىء فوسفات الصوديوم 0.2 مولاري ( pH 6 )

حُضِرَ المحلول الدارىء حيث تم وزن 23.13 غم من (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ) ووزن 5.225 غم من (  $\text{K}_2\text{H PO}_4$  ) واذابتها في لتر من الماء المقطر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

### 10.5.3 محلول دارىء فوسفات الصوديوم 0.2 مولاري ( pH 7 )

حُضِرَ المحلول الدارىء حيث تم وزن 16.6 غم من (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ) ووزن 13.58 غم من (  $\text{K}_2\text{H PO}_4$  ) واذابتها في لتر من الماء المقطر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

### 11.5.3 محلول دارىء الكلايسين-حامض الهيدروكلوريك (0.05) مولاري ( pH 3 )

حُضِرَ المحلول الدارىء وذلك بإذابة ( 3.023 ) غم من الكلايسين في الماء المقطر وأضيف له ( 0.826 ) مل من حامض الهيدروكلوريك ثم اكمل الحجم الى 1 لتر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

### 12.5.3 محلول دارىء السترات 0.1 مولاري ( pH 4 )

حُضِرَ محلول دارىء السترات بأذابة 3.43 غم من سترات الصوديوم في الماء المقطر وبعد ذلك اضيف اليه 1.83 غم من حامض الستريك ثم اكمل الحجم الى 250 مل بالماء المقطر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

### 13.5.3 محلول دارىء السترات 0.1 مولاري ( pH 5 )

حُضِرَ محلول دارىء السترات بإذابة 1.44 غم من سترات الصوديوم في الماء المقطر وبعد ذلك اضيف اليه 4.5 غم من حامض الستريك ثم اكمل الحجم الى 250 مل بالماء المقطر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

**14.5.3 محلول دارى فوسفات البوتاسيوم 0.1 مولاري ( pH 6 )**

حُضِرَ المحلول الدارىء حيث تم وزن 2.7 غم من ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ووزن 0.87 غم من ( $\text{K}_2\text{H PO}_4$ ) واذابتها في 250 مل من الماء المقطر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

**15.5.3 محلول دارى فوسفات البوتاسيوم 0.1 مولاري ( pH 7 )**

حُضِرَ المحلول الدارىء حيث تم وزن 1.02 غم من ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ووزن 3.04 غم من ( $\text{K}_2\text{H PO}_4$ ) واذابتها في 250 مل من الماء المقطر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

**16.5.3 محلول دارى فوسفات البوتاسيوم 0.1 مولاري ( pH 8 )**

حُضِرَ المحلول الدارىء حيث تم وزن 0.34 غم من ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ووزن 3.61 غم من ( $\text{K}_2\text{H PO}_4$ ) واذابتها في 250 مل من الماء المقطر ومن ثم عدل رقمه الهيدروجيني بأستعمال محلول حامض الهيدروكلوريك وهيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

**17.5.3 تحضير محلول البيستاتين تركيز ( 5 ) ملي مولاري**

حُضِرَ محلول البيستاتين أنياً حسب تعليمات الشركة المنتجة MCE الامريكية وذلك بإذابة 2 ملغم من البيستاتين في 0.5832 مل من DMSO .

**18.5.3 تحضير محلول البيستاتين تركيز ( 1 ) ملي مولاري**

حُضِرَ محلول البيستاتين أنياً حسب تعليمات الشركة المنتجة MCE الامريكية وذلك بإذابة 2 ملغم من البيستاتين في 2.916 مل من DMSO .

**19.5.3 محلول منظم ( TBE ) Tris – Borate EDTA 1x**

حُضِرَ المحلول بأذابة 54 غم من Tris- base و 20 غم من ethylene diamine و 27.5 غم من حامض اليوريك في 100 مل من الماء المقطر وأكمل

الحجم الى 1000 مل من الماء المقطر ، ثم سحب منه 100 مل ووضع في دورق حجمي ثم أكمل الحجم بالماء المقطر الى 500 مل للحصول على محلول ( TBE ) تركيزه 1x وبعد ذلك عقم المحلول بجهاز المؤصدة لمدة 15 دقيقة وعلى درجة حرارة 121 م ( Sambrook and Russell,2006 ) أستعمل هذا المحلول في تحضير هلام الاكاروز وكمحلول في الترحيل الكهربائي للكشف عن DNA .

### 6.3 الأوساط الزراعية

#### 1.6.3 وسط دكستروز-البطاطا الصلب Potato Dextrose Agar

حضر الوسط (PDA) حسب تعليمات الشركة المجهزة بأذابة 39 غم في لتر من الماء المقطر ، مع ضبط الرقم الهيدروجيني عند 5.2 ، استعمل هذا الوسط في عزل وتنقية الأعفان .

#### 2.6.3 وسط الإنتاج الإنزيمي

حُضِرَ هذا الوسط بخلط 10 غم من نخالة الحنطة و2 غم من حليب الفرز و10 مل من المحلول الملحي المبيّن في الفقرة ( 5.5.3 ) ومن ثم التعقيم على درجة حرارة 121 م ولمدة 15 دقيقة باستخدام جهاز المؤصدة Autoclave (Usman et al., 2021) .

#### 3.6.3 وسط حليب الفرز الصلب ( Skim Milk Agar , SMA )

حُضِرَ بإذابة 20 غم من حليب الفرز في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم إلى 200 مل من الماء المقطر ، ومن ثم وزن 20 غم من الاكار واذابته في 200 مل من الماء المقطر ، وحضر 600 مل من محلول داريء فوسفات البوتاسيوم المبيّن في الفقرة ( 4.5.3 ) . وعقمت جميع مكونات الوسط الثلاثة بشكل منفصل في المؤصدة على درجة حرارة 121 م ولمدة 15 دقيقة ومن ثم خلطها بعد ذلك في كابينة الزرع وتحت ظروف معقمة ، واستعمل هذا الوسط في عملية الغربلة الأولية للأعفان المعزولة (Usman et al., 2021) .

#### 4.6.3 وسط خلاصة جوز الهند الصلب Coconut Extract Agar

حُضِرَ وسط (CEA) أستناداً الى طريقة (Saito and Machida (1999) بأضافة 300 مل من الماء المقطر الساخن الى 100 غم من مبروش جوز الهند وخلطها بالخلط الكهربائي ثم رشح المحلول خلال قطعة من قماش الململ واكمل الراشح بالماء المقطر الى

300 مل ، واضيف 1.5 % من الاكار بعد ذلك اضيف المضاد الحيوي الكلورامفينيكول Chloramphenicol بتركيز 250 ملغم / لتر ، وأستعمل الوسط في الكشف عن السموم الفطرية .

### 5.6.3 وسط زابك – مستخلص الخميرة الصلب

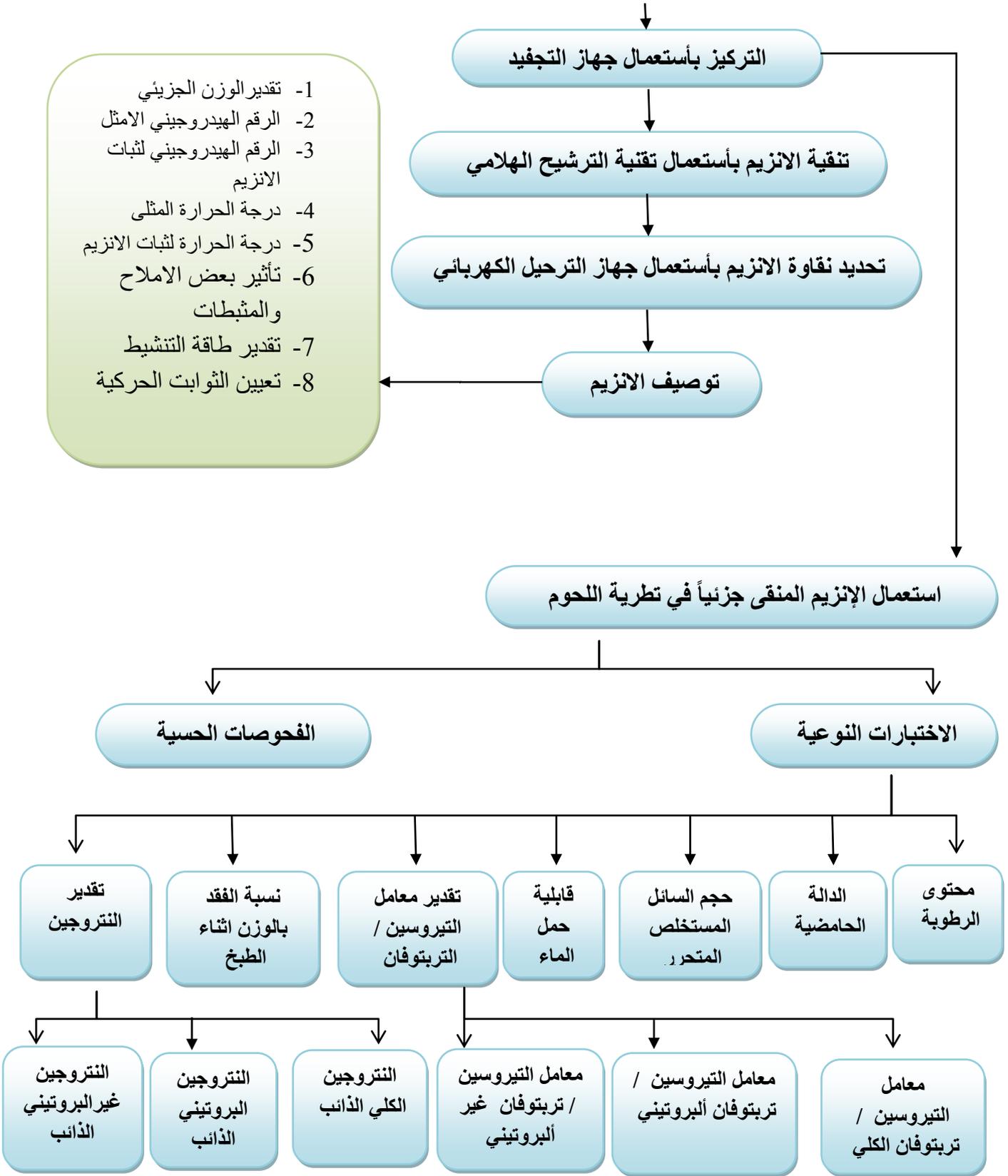
#### Czapek Yeast extract Agar(CYA)

حُضِرَ هذا الوسط حسب الطريقة التي ذكرها (Klich 2002) والذي يتكون من 10 مل محلول زابك المركز ( حضر بإذابة 5 غم KCl و 30 غم  $\text{NaNO}_3$  و 0.1 غم  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و 0.1 غم  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و 0.05 غم  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  و 5 غم  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  في 100 مل من الماء المقطر ) و 1 غم  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  و 30 غم سكروز و 15 غم أكار و 5 غم مستخلص الخميرة في 1 لتر من الماء المقطر ، عدل الرقم الهيدروجيني عند ( 6.7 ) ، استعمل هذا الوسط في تشخيص نوع العزلة .

### 6.6.3 وسط خلاصة المالت الصلب (MEA) Malt Extract Agar

حُضِرَ هذا الوسط حسب الطريقة التي ذكرها (Klich 2002) وذلك بإذابة 1 غم بيتون و 20 غم كلوكوز و 20 غم مستخلص المالت و 20 غم أكار وأكمل الحجم الى 1 لتر و عدل الرقم الهيدروجيني للوسط عند 5.6 ، استعمل هذا الوسط في تشخيص نوع العزلة .





شكل ( 3 - 1 ) مخطط طرائق العمل للدراسة الحالية

### 7.3 العزل Isolation

#### 1.7.3 عزل الفطريات من التربة

أخذ 10 غم من كل نموذج من نماذج التربة وأضيف الى 90 مل من ماء البيبتون المعقم في اسطوانة سعة 200 مل رجت بشكل جيد لغرض التجانس لمدة 20 دقيقة واخذ 1 مل من عالق التربة وأضيف الى 9 مل من ماء البيبتون المعقم في أنبوب اختبار سعة 10 مل ومنه أجريت تخافيف عشرية متسلسلة لنماذج التربة لغاية  $10^{-5}$  ، بعدها نقل 0.1 مل من كل تخفيف ونشر باستخدام الناشر الزجاجي L-shap على وسط دكستروز البطاطا الصلب ( Potato Dextrose Agar ) المبين في فقرة ( 1.6.3 ) والمضاف له المضاد الحيوي Chloramphenicol بتركيز 0.05 غرام / لتر وبمعدل ( 20 مل لكل طبق ) وحضنت عند درجة حرارة ( 28 – 30 م ) لمدة 5-7 أيام ( Usman et al., 2021 ) .

#### 2.7.3 عزل الفطريات من الحبوب

- 1- عزل الفطريات من سطح الحبوب ( طريقة الزرع المباشر )  
غسلت الحبوب ( 100 حبة من كل عينة ) بالماء المقطر المعقم (2-3 مرات) وجففت بأوراق ترشيح معقمة بعدها نقلت الحبوب (8-12) حبة بواسطة ملقط معقم لكل طبق بتري المحتوي على وسط (PDA) والحاوي على المضاد الحيوي Chloramphenicol بتركيز 0.05 غرام / لتر ، وتركت مسافة بين حبة وأخرى ( 8-10 ملم ) ، وحُضنت الاطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 25 - 28 م لمدة 5-7 ايام .
- 2- عزل الفطريات من داخل الحبوب ( طريقة الغسل السطحي )  
نقعت الحبوب في محلول هيبوكلوريت الصوديوم NaClO ( تركيز 1% ) ولمدة دقيقتين ومن ثم غسلت الحبوب بالماء المقطر المعقم 2-3 مرات وجففت بأوراق ترشيح معقمة بعدها نقلت الحبوب (8-12 حبة لكل طبق) بواسطة ملقط معقم الى أطباق بتري حاوية على وسط ( PDA ) المضاف له المضاد الحيوي Chloramphenicol وتركت مسافة بين حبة وأخرى ( 8-10 ملم ) ، وحضنت الاطباق في الحاضنة عند درجة حرارة 25 - 28 م لمدة 5-7 ايام ( Umbrey et al.,2021 ) .

### 8.3 تنقية العزلات Purification of Isolates

بعد عزل الفطريات ونموها تم نقل جزء من مستعمرات الأعفان النامية بواسطة Needle وتحت ظروف معقمة الى نفس الوسط ( PDA ) لغرض تنقيتها ، وكررت العملية عدة مرات لحين الحصول على عزلات نقية (Usman *et al.*, 2021).

### 9.3 حفظ العزلات

أجريت عملية حفظ العزلات النقية بعد تنميتها على وسط ( PDA ) المحضر بشكل مائل Slant وحضنت عند درجة حرارة ( 28 – 30 م ) لمدة 5-7 ايام ثم حفظت في الثلاجة على درجة حرارة 4 م (Usman *et al.*, 2021) .

### 10.3 تشخيص العزلات على مستوى الجنس

أجريت عملية تشخيص جنس العزلات المحلية وذلك بتنميتها على وسط PDA عند درجة حرارة 30 م لمدة 6 ايام وحسب المفاتيح التصنيفية المبينة في Pitt and Hocking (2009) (2005) de Hoog *et al.* (2012) , Mcginnis وذلك من خلال دراسة الفحوصات المظهرية التي تضمنت لون الغزل الفطري وشكل المستعمرات فضلاً عن الفحوصات المجهرية وبأستعمال المجهر الضوئي المركب عن طريق تحضير شرائح زجاجية وبأستخدام محلول ألاكثوفينول ( Lactophenol ) المبين في فقرة ( 2.5.3 ) لفحص أشكال الكونيديات ولونها .

### 11.3 غربلة الأولية Primary screening

أجريت عملية غربلة أولية حسب الطريقة التي ذكرها ( Usman *et al.* ( 2021 ) وذلك لمعرفة الاعفان التي لها القدرة على انتاج الانزيم بأستعمال وسط ( SMA ) Skim Milk Agar المبين في الفقرة (3.6.3) بعد تنشيطها ، أذلق الوسط بمستعمرات الاعفان المعزولة المنشطة بعمر 5 ايام وذلك بنقل قرص واحد من كل عزلة الى وسط حليب الفرز الصلب بواسطة الثاقب الفليني المعقم (Cork borer) بقطر 5 ملم وحضنت عند درجة حرارة 30 م لمدة 48 ساعة . بعد ذلك تم فحص الاطباق وملاحظة مدى امكانية الاعفان على أنتاج الانزيم من خلال الهالات المتكونة حول المستعمرات عند غمرها بمحلول 10%.

ثلاثي كلورو حامض الخليك (TCA) . ثم قدر نشاط الإنزيم النسبي (relative enzyme activity , REA ) بأستعمال المعادلة التالية:

$$REA = \frac{CZD}{CD}$$

حيث أن :

CZD: clear zone diameter. قطر منطقة الهالة ( ملم )  
CD : colony diameter . قطر المستعمرة (ملم )

### 12.3 تحضير اللقاح Inoculum Preparation

حُضِر اللقاح بإضافة 10 مل من الماء المقطر الى العزلات المنشطة على وسط PDA ( Potato Dextrose Agar ) المائل Slant بعد الحضان لمدة 5 أيام عند درجة حرارة 30 م° وأجري لها تحريك بواسطة لوب معقم للحصول على المعلق البوغي ومن ثم نقله الى انبوبة معقمة فارغة (Usman *et al.*, 2021) . تم حساب عدد الابواغ بواسطة استخدام شريحة Haemocytometer (Gopalakrishnan, 2022) والتخفيف بالماء المقطر إذ احتوى العالق على (  $10^6 \times 1$  بوغ / مل ) .

### 13.3 الغريلة الثانوية Secondary screening

أجريت عملية الغريلة الثانوية وذلك من خلال استعمال دوارق حجمية سعة 250 مل وضع فيها وسط الإنتاج الإنزيمي المبين في الفقرة (2.6.3) المعقم ولقحت بمقدار 1 مل من المعلق البوغي (  $10^6 \times 1$  بوغ / مل ) والحضان عند درجة حرارة (30) م° لمدة 7 أيام ; ( Usman *et al.* , 2021 Chimbekujwo *et al.* , 2020 ) .

### 14.3 أستخلاص الانزيم Enzyme extraction

بعد انتهاء عملية التخمر ، اضيف 100 مل من الماء المقطر ( مضاف له 1 مل من Tween 80 ) لكل دورق ثم وضعت في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة 30 م° لمدة

ساعة واحدة وبسرعة دوران 150 دورة / دقيقة بعدها رشح خلال قطعة قماش من الململ ومن ثم اجريت عملية النبذ المركزي المبرد للراشح بسرعة (5000) دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق ثم رشح بواسطة ملي بورفلتر 0.45 مايكرون ، وأستعمل الراشح كمحلول أنزيمي خام ( Chimbekujwo et al. ,2020 ) .

### 15.3 تقدير فعالية الانزيم (التحليلية والتخثرية)

## Enzyme Activity Determination

### 1.15.3 تقدير الفعالية التحليلية

قدرت فعالية الإنزيم حسب الطريقة التي ذكرها ( Hsiao et al. ( 2014 ) وكما يأتي :

#### 1.1.15.3 تحضير المحاليل

#### 1- محلول دارئ الكلايسين \_ HCl 0.05 مولاري (pH=3.4) .

حُضِرَ المحلول الدارئ بإذابة 3.002 غم من الكلايسين في 700 مل من الماء المقطر ثم أُضيفت اليه 0.883 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز وبعدها اكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر.

#### 2- محلول الكازين (2%)

حُضِرَ المحلول بأذابة 2 غم من الكازين في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم الى 100 مل .

#### 3- محلول (TCA) trichloroacetic acid (10%)

حُضِرَ المحلول بأذابة 10 غم من trichloroacetic acid (TCA) في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم الى 100 مل .

### 2.1.15.3 طريقة العمل

أخذ 50 ميكرو لتر من محلول رقم (2) وأضيف اليه 190 ميكرو لتر من محلول رقم (1) و 10 ميكرو لتر من الانزيم وحضن بدرجة حرارة 35 م° لمدة 30 دقيقة وبعد ذلك أوقف التفاعل بإضافة 250 ميكرو لتر من (TCA) محلول رقم ( 3 ) ، أما عينة البلائك فحضرت بمزج جميع المكونات أعلاه مع محلول التوقف الـ (TCA) ثم أضيف الإنزيم والحضن عند درجة حرارة 35 م° لمدة 30 دقيقة ، بعدها أجريت عملية النبذ المركزي المبرد (4 م°)

بسرعة دوران (12000) دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق وقيست الامتصاصية للراشح بأستعمال جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer عند طول موجي 280 نانومتر. وعرفت الفعالية التحليلية بأنها كمية الإنزيم التي تسبب انخفاض في الامتصاصية مقدارها 0.001 عند طول موجي 280 نانومتر تحت ظروف التفاعل .

### 2.15.3 تقدير الفعالية التخثرية

قدرت الفعالية التخثرية حسب طريقة (Arima et al. (1970) الموصوفة من قبل Mamo et al. (2020) وكما يأتي :

#### 1.2.15.3 المحاليل المستعملة

1- محلول كلوريد الكالسيوم  $CaCl_2$  (0.01 عياري )

2- محلول حليب الفرز المسترجع ( 10 % )

حضر بأذابة 10 غم حليب فرز مجفف في 100 مل من محلول رقم ( 1 ) .

### 2.2.15.3 طريقة العمل

تضمنت نقل 5 مل من محلول الحليب الى أنبوبة اختبار سعة 10 مل ، وحضن في حمام مائي بدرجة 35 م° لمدة 10 دقائق ثم أضيف اليه 0.5 مل من مستخلص الإنزيم الخام ومزج جيداً لمدة 5 ثواني . اعيدت الانبوبة الى الحمام المائي مع أستمرار تحريكه بصورة دائرية وهادئة ثم حسب زمن التخثر بالثواني من لحظة إضافة الإنزيم لحين ظهور الخثرة على شكل طبقة تغطي السطح الداخلي للأنبوبة وقدرت الفعالية التخثرية على وفق المعادلة الاتية :-

$$\frac{S \times 2400}{E \times T} = \text{الفعالية التخثرية ( وحدة / مل )}$$

حيث ان :

S = حجم الحليب

E = حجم الإنزيم

T = زمن تخثر الحليب بالثواني

وعرفت وحدة الفعالية التخثرية بانها كمية الإنزيم اللازمة لتخثر 1 مل من محلول يحتوي على 0.1 غم من مسحوق الحليب و0.01 مولاري كلوريد الكالسيوم عند درجة حرارة 35 م° خلال 40 دقيقة .

### 16.3 تقدير تركيز البروتين

## Determination of protein concentration

لتقدير تركيز البروتين استعملت طريقة (Lowry *et al.* (1951)

### 1.16.3 المحاليل المستعملة

#### 1.1.16.3 محلول كاربونات الصوديوم تركيز (2 %)

حُضِرَ بإذابة 2 غم من كاربونات الصوديوم في كمية من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.1 ) مولاري  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  وأكمل الحجم الى 100 مل من نفس المحلول .

#### 2.1.16.3 محلول تترات الصوديوم تركيز 2 %

حُضِرَ هذا المحلول بأستعمال كمية من الماء المقطر لإذابة 2 غم من تترات الصوديوم  $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  في ورق زجاجي بعد ذلك أكمل الحجم الى 100 مل .

#### 3.1.16.3 محلول كبريتات النحاس تركيز 1 %

حُضِرَ هذا المحلول بأستعمال كمية من الماء المقطر لأذابة 1 غم من كبريتات النحاس  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  في ورق زجاجي بعد ذلك أكمل الحجم الى 100 مل .

#### 4.1.16.3 خلط المحلولين المبيينين في الفقرة (2.1.16.3) و (3.1.16.3) بحيث

يكون تحضيره انياً وبنسب متساوية

#### 5.1.16.3 خلط المحلولين المبيينين في الفقرة (1.1.16.3) و (4.1.16.3) بحيث

يكون تحضيره انياً وبنسبة ( 50 : 1 )

**6.1.16.3 كاشف فولن Folin reagent المجهز من شركة (BDH) البريطانية.****7.1.16.3 محلول البروتين القياسي بتركيز 125 مايكروغرام / مل .**

حُضِرَ هذا المحلول بأستعمال كمية من الماء المقطر لإذابة 0.0125 غم من Bovine Serum Albumin (BSA) في دورق حجمي وبعدها أكمل الحجم إلى 100 مل .

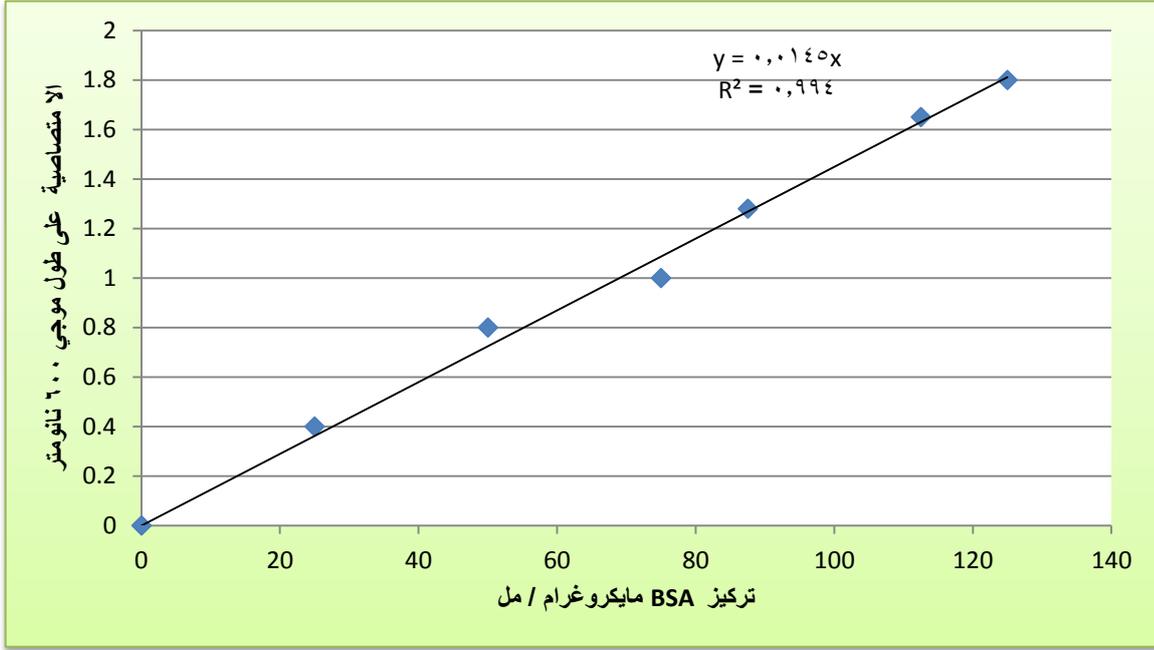
**2.16.3 المنحنى القياسي لبروتين المصل البقري Bovine Serum Albumin**

وضع في انابيب اختبار حجوم مختلفة من محلول البروتين القياسي ( BSA ) الموضح في الفقرة ( 7.1.16.3 ) ومن ثم اكمل الحجم الى 1 مل كما في الجدول ( 3-3 ) . بعدها أضيف 4 مل من محلول (5.1.14.2) لكل انبوبة بعد الرج وتركت الانابيب لمدة 10 دقائق ومن ثم نضيف 0.4 مل من محلول ( كاشف فولن ) الموضح في الفقرة (6.1.16.3) لكل انبوبة وتركت الانابيب لمدة 30 دقيقة بعدها تم قراءة الامتصاصية بواسطة جهاز الطيف الضوئي على طول موجي 600 نانومتر .

جدول ( 3-3 ) حجم وتركيز محلول Bovine Serum Albumin

تركيز BSA (مايكروغرام)	حجم الماء المقطر المضاف (مل)	حجم BSA (مل)	رقم الأنبوب
0	1	0	Blank 1
25	0.8	0.2	2
50	0.6	0.4	3
75	0.4	0.6	4
87.5	0.3	0.7	5
112.5	0.1	0.9	6
125	0	1	7

وبرسم العلاقة البيانية بين تركيز البروتين وقراءة الامتصاصية نحصل على المنحنى القياسي كما في الشكل ( 2-3 )



شكل ( 2-3 ) المنحنى القياسي لبروتين BSA

### 3.16.3 تقدير تركيز البروتين في المستخلص الأنزيمي

وضع في أنبوبة اختبار 1 مل من المستخلص الأنزيمي و4 مل من محلول (5.1.16.3) مع الرج وبعدها ترك لمدة 10 دقائق ومن ثم أضيف إليه 0.4 مل من كاشف فولن ( 6.1.16.3 ) وبعدها ترك لمدة 30 دقيقة ، أما عينة البلاك فأنها حضرت بمزج جميع مواد التفاعل بدون استخدام المستخلص الأنزيمي الذي تم تعويض حجمه بالماء المقطر وقرأت الامتصاصية بواسطة جهاز الطيف الضوئي على طول موجي 600 نانومتر ومن ثم حساب تركيز البروتين في المستخلص الأنزيمي من خلال المعادلة التي تم الحصول عليها في المنحنى القياسي لبروتين المصل البقري .

### 17.3 معاملة الأنزيم المنتج من العزلة المحلية بمثبط الـ ( Pepstatin A )

أجريت عملية غربله للعزلات المحلية من حيث قدرتها على إنتاج إنزيم الأسبارتك وذلك من خلال معاملة الأنزيم المنتج مع حجم مساوي له من محلول الببستاتين ( Pepstatin A ) ( تركيز 5 ملي مولاري ) والمحضر كما في الفقرة ( 17.5.3 ) والحضن لمدة 60 دقيقة ( Song et al. , 2020 ) بعدها قيسست الفعالية الأنزيمية كما في الفقرة ( 1.15.3 ) .

### 18.3 تشخيص نوع العزلة الأكفأ

أجريت عملية تشخيص لنوع العزلة الأكفأ في إنتاج الإنزيم والتي سبق تشخيص الجنس لها اعتماداً على المفاتيح التشخيصية الواردة في (Klich (2002) ; Pitt and Hocking (2009) وأيضاً المبينة في (Usman et al. (2021 من خلال تنمية العزلة على وسط Czapek Yeast extract Agar عند درجة حرارة 25 و 37 م° وأيضاً على وسط Malt Extract Agar عند درجة حرارة 25 م° المبينان في الفقرتين (5.6.3) و (6.6.3) على التوالي ولمدة 7 أيام وتسجيل صفاتها المظهرية التي تضمنت لون وشكل وقطر المستعمرة كذلك صفاتها المجهرية بعد إجراء عملية التصيبغ بأستعمال محلول اللاكتوفينول المحضر في فقرة (2.5.3) لدراسة حجم وشكل ولون الكونديا أيضاً شكل الحويصلة Vesicle وما تحتويه من صف واحد Unicerate او ثنائية الصفوف Bicerate .

### 19.3 الكشف عن الافلاتوكسين Detection of aflatoxin

تم الكشف عن قابلية عزلات الأعفان في إنتاج الافلاتوكسين تبعاً لطريقة (Saito and Machida (1999) وباستعمال طريقة بخار الأمونيا (Ammonia vapor) ، اذ نشطت هذه الاعفان على وسط (PDA) عند درجة حرارة (28 – 30 م°) لمدة 5 ايام ثم نقل من حافة المستعمرة المراد اختبارها وبأستعمال الثاقب الفليني جزء من مستعمرة العفن بقطر 5 ملم الى مركز طبق بتري يحتوي على وسط مستخلص جوز الهند (CEA) المبين في الفقرة (4.6.3) ومن ثم حضنت الاطباق لمدة 5 ايام وعند درجة حرارة 25 م° وبعدها وضع في غطاء الطبق ورقة ترشيح مبللة بمحلول الامونيا 25% المبين في الفقرة (3.5.3) وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 25 م° وبصورة مقلوبة ، وبعد مرور ساعة واحدة وأيضاً 24 ساعة من الحضن تم فحص الاطباق حسب تغير اللون من عدمه .

### 20.3 التشخيص الجزيئي للعزلة المحلية الاكفأ في إنتاج الأنزيم

#### 1.20.3 استخلاص الحامض النووي DNA

استعملت عدة الاستخلاص (Fungal / Bacterial / Yeast DNA MiniPrep ، ZR Catalog No. D6005) في عملية استخلاص الحامض النووي DNA من العزلات الفطرية (5 مكررات) الأكثر انتاجاً لأنزيم بروتيز الاسبارتك والتي أجريت في مختبرات وهج الدنا في محافظة بغداد وكما يأتي :-

## 1.20.3 طريقة العمل

- 1- تم تنمية العفن على الوسط الزراعي PDA وحضن على درجة حرارة 30 م° ولمدة 72 ساعة . ثم اخذ 50 – 100 ملغم من العزلة الفطرية المنشطة الى انبوبة eppendorf سعة 2 مل .
- 2- مزجت محتويات الأنبوبة ( حبيبات السليكا) مع العزلة الفطرية بواسطة vortex لمدة 5 دقائق .
- 3- اجري النبذ المركزي بسرعة  $10,000 \times g$  لمدة دقيقة واحدة .
- 4- أخذ 400 مايكرو لتر من الراشح ومرر من خلال مرشح في انبوبة eppendorf واجري النبذ المركزي بسرعة ( $8,000 \times g$ ) لمدة دقيقة واحدة وأهمل الراسب وأخذ الراشح .
- 5- أضيف 1200 مايكرو لتر من Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer الى الراشح مع مزج الخليط .
- 6- جُزء الخليط الى جزئين كل جزء يحتوي على 800 مايكرو لتر ومرر الجزء الاول خلال مرشح في انبوبة eppendorf واجري النبذ المركزي بسرعة  $10,000 \times g$  لمدة دقيقة واحدة ثم أهمل الراشح وأضيف الجزء الثاني 800 مايكرو لتر الى مرشح في انبوبة eppendorf واجري النبذ المركزي بسرعة ( $10,000 \times g$ ) لمدة دقيقة واحدة .
- 7- نُقل المرشح الى انبوبة eppendorf جديدة وأهمل الراشح .
- 8- أضيف 200 مايكرو لتر من DNA Pre-Wash Buffer الى مرشح وأجري النبذ المركزي بسرعة  $10,000 \times g$  لمدة دقيقة واحدة ثم نتخلص من الراشح .
- 9- أضيف 500 مايكرو لتر من Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer الى المرشح واجري النبذ المركزي بسرعة  $10,000 \times g$  لمدة دقيقة واحدة ثم أهمل الراشح .
- 10- أضيف 50 مايكرو لتر من DNA Elution Buffer الى مرشح في انبوبة eppendorf واجري النبذ المركزي بسرعة  $10,000 \times g$  لمدة 30 دقيقة ثم تم التخلص من الراسب وأخذ الراشح .

**2.20.3 الكشف عن DNA**

اجري الكشف عن الحامض النووي DNA عن طريق الترحيل الكهربائي electrophoresis باستخدام هلام الاكاروز 1.5% .

**1.2.20.3 تحضير هلام الاكاروز Preparation of Agarose gel**

حضر هلام الـ Agarose حسب طريقة (Sambrook et al. (1989) من خلال اذابة 1.5 غم من الاكاروز في 100 مل من داريء TBE المحضر كما في الفقرة (19.5.3) ، سخن الاكاروز الى درجة حرارة الغليان بعد ذلك ترك ليبرد الى درجة حرارة (40 – 50 م) ، تم تثبيت المشط في نهاية قالب الهلام لغرض تكوين الثقوب ثم سكب هلام الاكاروز برفق في القالب المخصص للهلام وترك لمدة 30 دقيقة حتى يبرد ومن ثم رفع المشط وملء خزان الجهاز بالمحلول الداريء (TBE) .

**2.2.20.3 طريقة العمل**

حضرت العينة بمزج 3 مايكرو لتر من محلول صبغة (بروموفينول الزرقاء) مع 5 مايكرو لتر من الحامض النووي المستخلص من العزلة الفطرية ومن ثم حقنت في ثقوب الهلام في جهاز الترحيل الكهربائي وعرضت الى تيار كهربائي بقوة (7 فولت / سم 2) لمدة (2-1) ساعة . تم الكشف عن حزم الـ DNA باستعمال مصدر للأشعة فوق البنفسجية على طول موجي 636 نانومتر وذلك بعد ان وضع هلام الاكاروز في حوض يحتوي على 500 مل من الماء المقطر و30 مايكرو لتر من محلول صبغة ( Red safe ) .

**3.20.3 تضخيم الحامض النووي DNA**

استخدمت تقنية تفاعل البوليمراز المتسلسل polymerase chain reaction (PCR) لتضخيم جين ITS باستعمال البوادئ المبينة في الجدول (3-4) والمجهز من شركة (Integrated DNA Technologies company, Canada (IDT) .

الجدول ( 3-4 ) البواديء المستخدمة في تشخيص العزلة الفطرية  
( Zarrin et al., 2016)

البواديء	تتابع القواعد النتروجينية	درجة حرارة الالتحام	محتوى قواعد GC%	الحجم الناتج
الامامي	5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'	60.3	50%	500-650
العكسي	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	57.8	40%	زوج قاعدي

تم إجراء التضخيم بحجم 25 مايكرو لتر يحتوي على 1.5 مايكرو لتر من DNA و 5 مل مايكرو لتر من مجموعة (i-Taq) Taq PCR PreMix kit (Intron) المجهز من شركة ( Intron ) الكورية جدول ( 3-5 ) و 1 مايكرو لتر (10 pmol) من كل بواديء ، الامامي ( forward primer ) والعكسي ( reverse primer ) وأكمل الحجم الى 25 مايكرو لتر بالماء المقطر جدول ( 3-6 ) .

جدول ( 3-5 ) مكونات مجموعة ( i-Taq ) Maxime PCR PreMix

المواد	الحجم
i-Taq DNA Polymerase	5U/μl
DNTPs	2.5mM
Reaction buffer (10X)	1X
Gel loading buffer	1X

جدول ( 3-6 ) المواد المضافة الى انبوية التفاعل لتضخيم جين ITS

المكونات	التركيز
Taq PCR PreMix	5μl
Forward primer	10 picomols/μl ( 1 μl )
Reverse primer	10 picomols/μl ( 1 μl )
DNA	1.5μl
Distill water	16.5 μl
Final volume	25μl

وتم اعتماد الظروف المثلى في تفاعل تضخيم جين ITS في جهاز PCR من المسخ الابتدائي Initial Denaturation والمسوخ النهائي 2- Denaturation والألتحام Annealing والاستطالة 1- Extension والاستطالة النهائية 2- Extension مع تغيير درجات الحرارة التي تعتبر من اهم العوامل المؤثرة على التحام الباديء مع قالب DNA ومن خلال اختيار الدورات الحرارية حسب ( Gene Amp, PCR system 9700; Applied Biosystem) في جهاز PCR وكما مبين في جدول (7-3)

جدول (7-3) الظروف المثلى المعتمدة في تضخيم جين ITS

ت	المرحلة	درجة الحرارة	الوقت	الدورات
1	المسخ الابتدائي Initial Denaturation	94 م°	3 دقيقة	دورة واحدة
2	المسخ النهائي Denaturation -2	94 م°	45 ثانية	35 دورة
3	الألتحام Annealing	52 م°	1 دقيقة	
4	الاستطالة الابتدائية Extension-1	72 م°	1 دقيقة	
5	الاستطالة النهائية Extension -2	72 م°	7 دقيقة	دورة واحدة
6	الحفظ	4 م°		

بعد انتهاء وقت التفاعل في جهاز PCR تم فصل الناتج بواسطة جهاز الترحيل الكهربائي electrophoresis باستخدام الاكاروز بتركيز 2 % وكما يأتي .

### 4.20.3 الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية PCR

اجري الترحيل الكهربائي حسب طريقة Sambrook et al. (1989) وكما يأتي :

#### 1.4.20.3 تحضير هلام الاكاروز Prepare of the Agarose gel

حضر هلام الـ Agarose بأذابة 2 غم من الاكاروز في 100 مل من المحلول الدارىء TBE في بيكر حجم 250 مل ، سخن الاكاروز بأستعمال فرن المايكرويف

Microwave oven لمدة دقيقة واحدة بعد ذلك ترك ليبرد الى درجة حرارة (45–50)م ، ومن ثم أضيف 3 مايكرو لتر من محلول الصبغة الحمراء ( Red safe ) . بعد ذلك تم تثبيت المشط في نهاية قالب الهلام ثم سكب هلام الاكاروز برفق في القالب المخصص للهلام وترك ليتصلب ومن ثم رُفِع المشط ومُلِئ خزان الجهاز بالمحلول الدارىء (TBE) ليغطي سطح الهلام .

### 2.4.20.3 طريقة العمل

حضرت العينة بمزج 3 مايكرو لتر من محلول صبغة التحميل Loading dye مع 5 مايكرو لتر من الحامض النووي الناتج من تقنية PCR ومن ثم حقنت في ثقب الهلام في جهاز الترحيل الكهربائي ووضع 5 مايكرو لتر من الدليل الحجمي القياسي ( 100- 1500 ) DNA ladder في الثقب المخصص له وعرضت الى تيار كهربائي ( 5 فولت / سم 2) لمدة ( 1.5 ) ساعة . تم التصوير من خلال تعريض النواتج الى مصدر للأشعة فوق البنفسجية UV ( ultra violate light ) على طول موجي ( 302 ) نانومتر وذلك بعد ان وضع هلام الاكاروز في حوض يحتوي على 500مل من الماء المقطر و30 مايكرو لتر من محلول صبغة ( Red safe ) وتم تقدير الحجم مقارنة مع الدليل القياسي للتعرف على حجم حزم الـ DNA .

ارسلت نواتج تقنية الـ PCR الى شركة macrogen الكورية لغرض تحديد التسلسل الجيني ( تسلسل القواعد النتروجينية ) ومن ثم اعتمدت هذه التسلسلات في بحث التسلسلات المتشابهة Homology search بأستخدام برنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) للتعرف على نوع العزلة المنتجة . كما تم رسم الشجرة الوراثية للعزلة المحلية ومطابقتها مع السلالات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية (NCBI) من خلال الموقع الالكتروني (www.ncbi.nlm.nih.gov) وبالأعتماد على برنامج MEGA 7 ( Tamura et al. ) ( , 2011 ) .

**21.3 دراسة الظروف المثلى لإنتاج إنزيم بروتيز الاسبارتك من العزلة المحلية**

تم دراسة الظروف المثلى لأنتاج انزيم بروتيز الاسبارتك من العزلة المحلية وكما يأتي:

**1.21.3 تحديد أفضل وسط لإنتاج الإنزيم**

درس تأثير اوساط مختلفة لأنتاج الانزيم ( نخالة الحنطة ، نخالة الشعير ، قشور الرز ، جريش الذرة ، كسبة فول الصويا ) وذلك بأخذ 10 غم من كل وسط ووضع في دورق حجمي سعة 250 مل ومن ثم اضافة الحليب الفرز ( المادة الاساس ) والمحلول الملحي (محلول الترطيب) والتعقيم بدرجة حرارة 121 م° لمدة 15 دقيقة وبعدها التبريد ومن ثم التلقيح والحضن على درجة حرارة 30 م° لمدة 7 ايام ومن ثم قياس فعالية الانزيم وتركيز البروتين لتحديد الوسط الأمثل للأنتاج .

**2.21.3 تحديد أفضل نسبة لمحلول الترطيب المستخدم لإنتاج الإنزيم**

درس تأثير نسب مختلفة من محلول الترطيب على وسط الانتاج ( 1:1 ، 2:1 ، 3:1 ، 4:1 ، 5:1 وزن / حجم ) .

**3.21.3 تحديد أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج الإنزيم**

حضر محلول الترطيب عند ارقام هيدروجينية مختلفة ( 3 ، 3.5 ، 4 ، 4.5 ، 5 ، 5.5 ، 6 ، 6.5 ، 7 ) وذلك من خلال تعديل رقمه الهيدروجيني بأستخدام محلول حامض الهيدوكلوريك تركيز 1 مولاري او استخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم تركيز 1 مولاري ومن ثم استخدامه في وسط الانتاج .

**4.21.3 تحديد أفضل محلول لاستخلاص الإنزيم**

استعملت محاليل مختلفة لاستخلاص الإنزيم ( دارئ السترات بتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 3 مولاري ، دارئ السترات بتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 4 ، و دارئ الخلات بتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 5 ، ودارئ فوسفات الصوديوم تركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 6 ، ودارئ فوسفات الصوديوم تركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 7 ، ماء مقطر والمحضرة كما في الفقرة ( 6.5.3 ) الى ( 10.5.3 ) لاختيار أفضل محلول للاستخلاص .

**5.21.3 تحديد أفضل حجم لقاح لإنتاج الإنزيم**

استعملت إحصام مختلفة من اللقاح ( 1 , 2 , 3 , 4 , 5 , 6 , 7 ) مل لغرض تلقيح وسط التخمر .

**6.21.3 تحديد أفضل مصدر نايتروجيني لإنتاج الإنزيم**

استعملت مصادر مختلفة لتدعيم وسط التخمر بالنتروجين ( حليب الفرز ، الكازين ، البيتون ، ونترات الامونيوم ، كبريتات الامونيوم ، مستخلص الخميرة ) ومن ثم تحديد الأفضل منها كمصدر للنتروجين .

**7.21.3 تحديد أفضل مدة حضن لإنتاج الإنزيم**

حضن الوسط الملقح بمدد زمنية تراوحت من 2 – 7 يوم لتحديد افضل مدة حضن لإنتاج الإنزيم

**8.21.3 تحديد أفضل درجة حرارة لإنتاج الإنزيم**

استعملت درجات حرارية مختلفة لحضن الوسط الملقح تراوحت بين 20 – 45 م° بفارق 5 درجات مئوية من درجة حرارة لأخرى .

**22.3 تنقية انزيم بروتيز الاسبارتك**

أجريت عمليات التنقية على المستخلص الانزيمي المنتج حسب الفقرة ( 14.3 ) وباستعمال الظروف المثلى (نخالة الحنطة ومحلول الاستخلاص دارىء الخلات بتركيز 0.2 مولاري ونسبة محلول الترطيب ( 3:1 ) ورقم هيدروجيني 5 وحجم لقاح 2 مل ومصدر نايتروجيني الكازين ومدة حضن 6 ايام ودرجة حرارة 30 م° ) وكان حجم المستخلص المنتج 150 مل .

**1.22.3 التركيز بكبريتات الامونيوم**

أضيفت كبريتات الامونيوم الى المستخلص الانزيمي بشكل تدريجي وبأوزان مختلفة حسب مامبين في جدول التشبع في حمام ثلجي ودرجة حرارة 4 م° مع التحريك المستمر عن

طريق استعمال المازج المغناطيسي (magnetic stirrer) للوصول الى نسبة اشباع تراوحت بين (20- 80) % ثم أجريت عملية النبذ المركزي المبرد بسرعة 12000 xg لمدة عشر دقائق وبدرجة حرارة 4 م° وفصل الراسب ثم قدرت الفعالية الانزيمية كما موضح في الفقرة ( 1.15.3) وتركيز البروتين كما موضح في الفقرة ( 3. 16 ) لكل من الراسب والراشح بعد كل مرحلة إضافة لكبريتات الامونيوم لحين الوصول الى نسبة اشباع لا تسجل فيها الفعالية الانزيمية في الراشح اي قيمة ، بعدها يهمل الراشح ويذوب الراسب في أقل كمية من الماء المقطر ( Zhang et al. ,2017 ) ، وتقدر له الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين .

### 2.22.3 التركيز بالمذيبات العضوية

استعملت طريقة Szczodrak and Wiater (1998) لتركيز الانزيم بالمذيبات العضوية باستعمال الايثانول الاسيتون وذلك بإضافة المذيبات العضوية الى المستخلص الخام كلاً على حده وبصورة تدريجية وبنسب خلط مختلفة ( 1:1 , 2 :1 , 3 :1 ، 4 :1 ) ( حجم المستخلص : حجم المذيب ) مع التحريك باستعمال المازج المغناطيسي ، ثم يترك لمدة ساعتين في الثلاجة بعدها اجريت عملية النبذ المركزي المبرد بسرعة (14000) دورة في الدقيقة ولمدة 15 دقيقة ، وذوب الراسب في كمية قليلة من الماء المقطر ثم قدرت الفعالية الانزيمية وتركيز البروتين .

### 3.22.3 الديليزة Dialysis

أستخدمت أكياس الديليزة ذات اوزان جزيئية تراوحت بين ( 12 – 14 ) كيلو دالتون بعد تنشيطها لأجراء عملية التنافذ الغشائي للأنزيم لمدة 24 ساعة مقابل الماء المقطر مع تبديل الماء كل 6 ساعات ثم سجل حجم المحلول مع تقدير تركيز البروتين والفعالية الانزيمية .

### 4.22.3 كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

#### Gel filtration chromatography

### 1.4.22.3 المحاليل المستعملة

محلول فوسفات الصوديوم الدارى بتركيز 0.2 مولاري وبرقم هيدروحيني 7

### 2.4.22.3 تحضير هلام Sephadex G-100

حضر الهلام حسب تعليمات الشركة المنتجة Pharmacia السويدية وذلك بإذابة 30 غم من حبيبات Sephadex G-100 في الماء المقطر حجم ( 750 ) مل مع الخلط بهدوء ، ثم سخن الخليط في حمام مائي لمدة 4 ساعات عند درجة حرارة 90 م لغرض انتفاخ وتشرب الحبيبات بعدها ترك الخليط ليبرد، أضيف اليه Sodium azide تركيز 0.02 % ، بعدها فرغ الهواء من الخليط (Degassing) ومن ثم عبيء خليط السيفاديكس مباشرة في العمود وترك الى اليوم الثاني لكي يرص الهلام داخل العمود وبإبعاد ( 2.5 × 80 ) سم ، بعدها استعمل محلول داريء فوسفات الصوديوم لغرض اجراء موازنة للعمود وبما يعادل ثلاثة أمثال حجم الهلام في العمود كما نظمت سرعة الجريان داخل العمود بمعدل 20 مل/ساعة .

### 3.4.22.3 طريقة العمل

مرر المستخلص الانزيمي الناتج من خطوة الديلزة (3.22.3) بعد تركيزه بأستخدام جهاز التجفيد Freeze drier على جوانب عمود السيفاديكس بهدوء وبشكل تدريجي لتوزيع المستخلص على سطح الهلام بشكل متجانس ومن ثم استعمل محلول داريء فوسفات الصوديوم لغرض اجراء عملية الاسترداد وبسرعة جريان 20 مل /ساعة وبواقع 2 مل لكل انبوبة ومن ثم تمت قراءة الامتصاصية عند طول موجي 280 نانومتر لكل الاجزاء الناتجة من عملية الترشيح الهلامي وبعد ذلك جمعت الاجزاء المفصولة الفعالة وقدرت الفعالية الانزيمية لها و تركيز البروتين .

### 5.22.3 اختبار نقاوة الإنزيم Enzyme Purity test

اختبرت نقاوة الانزيم بطريقة الترحيل الكهربائي بأستعمال هلام متعدد الأكريل أمايد بوجود العوامل الماسخة Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) تبعاً لطريقة (1970) Laemmli والمذكورة من قبل Garfin (1990) وكمياتي :-

**1.5.22.3 المحاليل والمواد المستعملة****1- محلول أكرل أمايد الخزين Acryl amide stock solution**

حضرت مادة Bisacrylamide – Acrylamide (8 :30) عن طريق إذابة 30 غم من مادة Acrylamide و 8 غم من Bisacrylamide في 100 مل من الماء المقطر. ثم رشح المحلول من خلال ورق الترشيح Whatman No.1 وتخزينه عند درجة حرارة 4 م في عبوة معتمة .

**2- المحلول الدائري لهلام الفصل تركيز 1.5 مولاري Resolving gel buffer**

حضر المحلول بإذابة 36.3 غم من Tris (hydroxymethyl) methylamine في 40 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 8.8 Tris – HCl باستعمال حامض HCl تركيزه 1 مولاري ومن ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

**3- المحلول الدائري لهلام الرص تركيز 0.5 مولاري Stacking gel buffer**

حضر المحلول بإذابة 6 غم من Tris (hydroxymethyl) methylamine في 40 مل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 6.8 باستعمال HCl تركيز 1 مولاري ومن ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

**4- محلول (Aps) Ammonium persulfate**

حضر المحلول انياً بإذابة 0.15 من Ammonium persulfate في 10 مل من الماء المقطر وبتركيز 1.5 % وزن / حجم .

**5- محلول (N,N,N,N-tetra methylethylenediamine) TEMED**

هذا المحلول جاهز للاستعمال .

**6- المحلول الدائري Reservoir buffer**

حضر هذا المحلول بإذابة 3 غم من Tris-Glycine (pH 8.3) و 14.4 غم من Glycine في كمية من الماء المقطر ومن ثم اكمل الحجم الى 1 لتر بالماء المقطر .

**7- محلول تركيز (10% وزن / حجم) Sodium dodecyl sulphate**

حضر بأذابة 10 غم من SDS في 100 مل من الماء المقطر .

**8- محلول دارىء الاقطاب Reservoir buffer SDS**

يتكون محلول دارىء الاقطاب من Tris تركيز 0.25 مولاري و Glycine تركيز 1.92 مولاري و SDS تركيز 1% ، اذ تم اذابة 30.3 غم من Tris و 144 غم من Glycine و 10 غم من SDS في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر .

**9- محلول التصبيغ Staining Solution**

حضر محلول Coomassie Brilliant Blue G-250 عن طريق إذابة 100 ملغم من Coomassie blue في 50 مل من خليط من الماء: الميثانول: حامض الخليك الثلجي (2:5:5 من حيث الحجم) مع التحريك ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر بواسطة الماء المقطر ثم رشح خلال ورق ترشيح whatman No.1 وخرن في عبوة معتمة عند درجة حرارة 4 م لحين الاستخدام.

**10- محلول التثبيت Fixing Solution**

حضر هذا المحلول بخلط 10% من ثلاثي كلورو حامض الخليك (TCA) مع 40 % ميثانول .

**11 – محلول ازالة الصبغة Destaining solution**

حضر هذا المحلول بمزج الماء : الميثانول : حامض الخليك وبنسبة خلط ( 5 : 4 : 1 ) على التوالي .

**12 – محلول صبغة البروموفينول الزرقاء Bromo phenol blue**

حضر بأذابة 0.002 غم من صبغة البروموفينول في 50 % كليسرول .

**13 – محلول الحفظ Preserving solution**

حضر من 5% حامض الخليك .

## 2.5.22.3 تحضير هلام متعدد الاكريل أمايد

## Polyacrylamide Gel Preparation

تم تحضير هلام متعدد الاكريل أمايد كما مبين في الجدول ( 3 – 8 ) .

جدول ( 3-8 ) مكونات متعدد الاكريل أمايد

ت	المحاليل	هلام الرص	هلام الفصل	محلول دارئ الأقطاب
1	أكريل أمايد – بز أكريل أمايد ( 8 : 30 )	2.5 مل	10 مل	
2	محلول هلام الرص الدارئ	5 مل		
3	محلول هلام الفصل الدارئ		3.7 مل	
4	محلول دارئ الأقطاب SDS			100 مل
5	بيرسلفات الامونيوم	1 مل	1.5 مل	
6	ماء مقطر	11.3 مل	14.45 مل	900 مل
7	التمد	0.015 مل	0.015 مل	
8	SDS 10 %	0.2 مل	0.3 مل	

## 3.5.22.3 تحضير النموذج

حضر النموذج بخلط 6 احجام من الانزيم المنقى مع حجم واحد من صبغة البروموفينول الزرقاء ( BPD ) تركيز 0.002 % مع 225 مايكرو لتر من محلول هلام الفصل الدارئ، وأضافة 5 قطرات من الكليسرول لرفع كثافة محلول النموذج مع أضافة 0.3 مل من SDS 10% (وزن/حجم) و 0.5 من 2-مركبتوايثانول ، ثم وضع المحلول في

حمام مائي مغلي لمدة 3 دقائق. وبعدها برد إلى درجة حرارة الغرفة 25 م° واجري النبد المركزي عند 10000 x g لمدة 5 دقائق .

### 4.5.22.3 طريقة العمل

وضع هلام الفصل في الانابيب المخصصة لها وازيلت فقاعات الهواء من هلام الفصل مع تغطية هلام الفصل بالماء المقطر وترك الهلام لمدة 30 – 45 دقيقة لكي يتصلب ومن ثم أزيل الماء المقطر وأضيف هلام الرص فوق هلام الفصل مع تغطية هلام الرص بالماء المقطر وترك الهلام لمدة 30 – 45 دقيقة لكي يتصلب ومن ثم أزيل الماء المقطر ، وبعد ذلك وضعت في جهاز الترحيل الكهربائي electrophoresis ، ومن ثم أضيف محلول دارىء الاقطاب الـ SDS في حوض جهاز الترحيل الكهربائي بحث يغطي الانابيب ، وبعد ذلك تم تحميل العينة بعناية على سطح الهلام باستخدام حقنة صغيرة أو ماصة دقيقة ومرر تيار كهربائي مقداره 100 فولت لمدة 2 ساعة ، ثم أخرج الهلام من الانابيب وأغمر في محلول التثبيت الموضح في الفقرة 10 لمدة 60 دقيقة ، وبعدها نقل الهلام الى محلول التصبيغ الموضح في الفقرة 9 وترك الى اليوم التالي ، وبعدها ازيلت الصبغة من الهلام بغمرة في محلول ازالة الصبغة الموضح في الفقرة 11 ، ومن ثم حفظ الهلام في محلول الحفظ الموضح في الفقرة 13 ( Chang et al. ,1991 ) .

### 23.3 توصيف أنزيم بروتيز الاسبارتك

تم دراسة توصيف الانزيم حسب ماذكره Song et al. ( 2020), Fairouz et al. ( 2021) مع اجراء بعض التحويلات .

### 1.23.3 تقدير الوزن الجزيئي

استعملت طريقة الترحيل الكهربائي لتقدير الوزن الجزيئي للأنزيم المنقى بأستعمال متعدد الاكريل أمايد Polyacrylamide وبوجود المواد الماسخة Sodium electrophoresis (SDS- dodecyl sulphate polyacrylamide gel PAGE) حسب طريقة Laemmli (1970) والمذكورة من قبل Garfin (1990) وكما يأتي :-

### 1.1.23.3 المواد والمحاليل المستعملة

استعملت المواد والمحاليل المذكورة في الفقرة ( 1.5.22.3 ) مع إضافة المحلول الآتي :

### 2.1.23.3 محلول البروتينات القياسية

استعمل Marker جاهز منشأه كوريا الجنوبية من شركة BIONEER ، ذو اوزان جزيئية معلومة تتراوح من ( 11 – 240 ) كيلودالتون وكما مبين بالشكل ( 3 – 3 ) .



الشكل ( 3 – 3 ) البروتينات القياسية المعلومة الاوزان الجزيئية

### 3.1.23.3 طريقة العمل

أجريت عملية الترحيل الكهربائي Electrophoresis تبعاً للطريقة المذكورة في الفقرة (5.22.3) ، بعد ظهور الحزم تم تحديد الوزن الجزيئي وذلك من خلال استخراج الحركة النسبية (Rm) Relative Mobilit بقياس المسافة التي قطعها الحزم البروتينية بعد التصبغ وقياس المسافة التي قطعها الصبغة بعد التصبغ وحسب المعادلة التالية .

$$\text{الحركة النسبية} = \frac{\text{المسافة التي قطعها الحزم البروتينية (سم)}}{\text{المسافة التي قطعها الصبغة (سم)}}$$

وعن طريق رسم العلاقة بين لوغاريتم الاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية وبين الحركة النسبية لها في الهلام استخراج الوزن الجزيئي .

### 2.23.3 الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم

تم تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل للأنزيم المنقى كلياً والإنزيم المنقى جزئياً من خلال تحضير المحاليل القياسية بأرقام هيدروجينية مختلفة (3, 4, 5, 6, 7, 8) حسب ماتضمنته الفقرات ( 11.5.3 – 16.5.3 ) على التوالي ، إذ خلط كل محلول من هذه المحاليل مع الأنزيم بنسبة ( 1 : 1 ) (حجم : حجم ) وبعدها تم قياس الفعالية الإنزيمية كما مبين في الفقرة ( 1.15.3 ) وقياس تركيز البروتين كما هو مبين في الفقرة ( 16.3 ) ومن ثم رسم العلاقة بين فعالية الإنزيم النوعية وبين قيم الأرقام الهيدروجينية لتعيين الرقم الهيدروجيني الأمثل .

### 3.23.3 الرقم الهيدروجيني لثبات الأنزيم

تم تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الأنزيم المنقى كلياً والإنزيم المنقى جزئياً من خلال تحضير المحاليل القياسية بأرقام هيدروجينية مختلفة (3, 4, 5, 6, 7, 8) حسب ماتضمنته الفقرة ( 11.5.3 – 16.5.3 ) على التوالي ، إذ خلط كل محلول من هذه المحاليل مع الأنزيم بنسبة ( 1 : 1 ) (حجم : حجم ) وحضن في حمام مائي على درجة حرارة 35 م° ولمدة نصف ساعة ثم نقل الى حمام ثلجي وبعدها تم قياس الفعالية الإنزيمية كما مبين في الفقرة ( 1.15.3 ) وقياس تركيز البروتين كما هو مبين في الفقرة ( 16.3 ) ومن ثم قدرت الفعالية المتبقية .

### 4.23.3 درجة الحرارة المثلى للأنزيم

قيست الفعالية الإنزيمية للأنزيم المنقى كلياً والإنزيم المنقى جزئياً كما مبين في الفقرة ( 1.15.3 ) بعد ان حضنت على مدى من درجات الحرارة تراوح ( 15 - 85 ) م° وبفارق 10 درجات لمدة نصف ساعة وبالأرقام الهيدروجيني الأمثل ومن ثم رسمت العلاقة بين الفعالية ودرجات الحرارة لتعيين درجة الحرارة المثلى للأنزيم .

### 5.23.3 درجة الحرارة لثبات الإنزيم

حضن حجم معين من الأنزيم المنقى كلياً والإنزيم المنقى جزئياً على مدى من درجات الحرارة تراوح ( 15 - 85 ) م° وبفارق 10 درجات لمدة نصف ساعة ثم نقل الى حمام

تلجى وبعدها تم قياس الفعالية الإنزيمية كما مبين في الفقرة ( 1.15.3 ) وقياس تركيز البروتين كما هو مبين في الفقرة ( 16.3 ) ومن ثم قدرت الفعالية المتبقية .

### 6.23.3 تقدير طاقة تنشيط الأنزيم

تم تقدير طاقة التنشيط للأنزيم لتحويل المادة الخاضعة الى الناتج Transformation energy (Ea) وطاقة مسخ الإنزيم وذلك عن طريق قياس ثابت سرعة التفاعل باستعمال مدى من درجات الحرارة تراوحت ( 15 – 85 ) م° وبفارق 10 درجات ورسمت العلاقة بين لوغاريتم ثابت سرعة التفاعل **Log Ko** ومقلوب درجات الحرارة المطلقة ومن ثم تم قياس الفعالية الإنزيمية كما مبين في الفقرة ( 1.13.3 ) وبعدها تم حساب طاقة التنشيط بأستخراج الميل Slope وفقاً لمعادلة ارينيوس ( Segel , 1976 ) وكما يأتي :

$$\text{Log Ko} = \frac{- Ea}{2.3R}$$

Ko : ثابت سرعة التفاعل Reaction rate constant

- Ea : طاقة التنشيط Activation energy

R : ثابت الغاز Gas constant 1.98 كيلو سرعة / مول / درجة حرارة مطلقة

### 7.23.3 تعيين الثوابت الحركية للأنزيم

حضرت تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة (0.5, 1.75, 1.25, 2, 2.5, 3 , 3.5%) و قدرت السرعة القصوى Vmax وقيم ثابت ميكالس Km من رسم العلاقة بين مقلوب تراكيز المادة الخاضعة [ s ] ومقلوب السرعة الاولية V وحسب طريقة Lineweaver – Burk reciprocal plot التي ذكرها ( Segel (1976) .

### 8.23.3 تأثير المنشطات والمثبطات على فعالية الانزيم

#### 1.8.23.3 طريقة العمل

حضرت الاملاح والمواد المثبطة بتراكيز ( 1 ، 5 ) ملي مولاري منها البيستاتين Pepstatin الذي يعد من المثبطات المتخصصة في تثبيط فعالية أنزيم بروتينز الاسبارتك ( Hsiao et al. , 2014 ) الشكل (3-4) ، اذ تم مزج محلول الانزيم مع حجم مساوي من الاملاح والمواد المثبطة وحضنت في حمام مائي بدرجة الحرارة المثلى (55) م° ولمدة نصف ساعة ثم قدرت الفعالية المتبقية .



الشكل ( 3-4 ) البيستاتين Pepstatin مثبط أنزيم بروتينز الاسبارتك

### 24.3 أستعمال الانزيم المنقى جزئياً في تطرية اللحوم

#### 1.24.3 تحضير لحم البقر

أخذت 2 كغم من عضلة لحم البقر وبعمر 5 سنوات واجري لها عملية الغسل السطحي ثم أزيلت منها الاجزاء الدهنية .

#### 2.24.3 تحضير المحلول الانزيمي تركيز 0.5 %

حضر المحلول بأذابة 0.5 غم من الانزيم المنقى جزئياً ( بعد التركيز بكبريتات الامونيوم وأجراء عملية الديلزة وبفعالية نوعية 1107.4 وحدة / ملغم ) في كمية من الماء المقطر وأكمل الحجم الى 100 مل ( Alyounis et al. ,2023 ).

### 3.24.3 طريقة العمل

قطعت عينات اللحم الى شرائح بوزن 100 غم وبسمك 1.5 سم بعد ذلك غمرت الشرائح في المحلول الانزيمي الموضح في الفقرة (2.24.3) ولفترات غمر (30 , 60 , 90 , 120) دقيقة وبدرجة حرارة 55 م° ، اما عينات المقارنة غير المعاملة غمرت في الماء المقطر فقط ، بعدها رفعت العينات لغرض اجراء الاختبارات النوعية عليها ( *et al.*,2023) .Alyounis

### 4.24.3 الاختبارات النوعية

#### 1.4.24.3 نسبة الرطوبة

قدرت نسبة الرطوبة في عينات اللحم وفق الطريقة التي ذكرت في (A.O.A.C. (1975) ، أذ وزنت العينة قبل التجفيف ثم جففت بدرجة حرارة 105 م° لمدة 6 ساعات وبعدها وزنت العينة بعد التجفيف ثم اعيدت لحين ثبات الوزن بعدها حسبت نسبة الرطوبة كما يلي :

$$\text{نسبة الرطوبة \%} = \frac{\text{الوزن قبل التجفيف} - \text{الوزن بعد التجفيف}}{\text{الوزن قبل التجفيف}} \times 100$$

#### 2.4.24.3 الرقم الهيدروجيني

قيس الرقم الهيدروجيني حسب الطريقة التي اشار اليها ( Aitaken *et al.* ( 1962 ) والمذكورة من قبل التميمي ، (2014) ، اذ مزج 5 غم من اللحم المفروم مع 100 مل من الماء المقطر بواسطة جهاز المازج المغناطيسي وتركته لمدة 5 دقائق بعد ذلك قيس الرقم الهيدروجيني بأستعمال جهاز الـ pH - Meter .

**3.4.24.3 حجم المستخلص المتحرر****Volume of Released Extract****1.3.4.24.3 المحاليل المستعملة****1- محلول فوسفات البوتاسيوم  $KH_2PO_4$  (0.2) مولاري**

حضر المحلول بأذابة 27.218 غم من فوسفات البوتاسيوم في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى لتر .

**2- محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.2) مولاري**

حضر المحلول بأذابة 8 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى لتر .

**3- كاشف الاستخلاص**

حضر الكاشف بمزج 50 مل من المحلول رقم (1) مع 3.72 مل من المحلول رقم (2) ومن ثم أكمل الحجم الى 60 مل بالماء المقطر .

**2.3.4.24.3 طريقة العمل**

قيس حجم المستخلص المتحرر حسب الطريقة المذكورة من قبل ( Egan et al. 1988) وذلك بمزج 15 غم من اللحم المفروم مع 60 مل من كاشف الاستخلاص المبين في الفقرة رقم ( 3 ) وعدل الرقم الهيدروجيني الى ( 5.8 ) بواسطة محلول حامض الهيدروكلوريك او محلول هيدروكسيد الصوديوم ومن ثم رج المحلول بصورة جيدة لمدة دقيقتان وبعد ذلك رشح المحلول باستعمال ورق الترشيح Whatman No. 1 وقيس حجم الراشح للمستخلص المتحرر .

**4.4.24.3 قابلية حمل الماء Water Holding Capacity**

قيست قابلية حمل الماء حسب الطريقة التي ذكرها Dolatowski and Stasiak (1999) وذلك بمزج 50 غم من اللحم المعامل المبين في الفقرة ( 3.24.3 ) مع 50 مل

من الماء المقطر ثم اجري النبذ المركزي المبرد بسرعة  $5000 \times g$  لمدة 10 دقائق وبعد ذلك حسبت قابلية حمل الماء ( W. H. C. ) كما يأتي :

$$100 \times \frac{\text{وزن الماء المضاف للحم} - \text{وزن الماء بعد النبذ المركزي}}{\text{وزن النموذج}} = (\%) \text{ قابلية حمل الماء}$$

### 5.4.24.3 نسبة فقد الوزن أثناء الطبخ Cooking Loss

وزن 5 غم من شرائح اللحم المعامل المبين في الفقرة ( 3.21.3 ) ووضعها في أكياس من البولي أثلين وغلقت هذه الاكياس بأحكام ووضعت في حمام مائي لمدة 90 دقيقة وبدرجة حرارة 70 م° بعد ذلك فرغت الاكياس من السائل ووضعت لمدة 24 ساعة في الثلاجة وبعدها فرغت الاكياس من السائل الموجود على سطح العينات ووزنت ومن ثم حسبت نسبة الفقد بالوزن أثناء الطبخ من المعادلة الآتية (Ortuño et al., 2021) :

$$100 \times \frac{\text{وزن النموذج قبل الطبخ} - \text{وزن النموذج بعد الطبخ}}{\text{وزن النموذج قبل الطبخ}} = (\%) \text{ الفقد بالوزن}$$

### 6.4.24.3 معامل التايروسين / التربتوفان الكلي

استخدمت الطريقة التي ذكرها (Jioe et al. (2023) في تقدير معامل التايروسين / التربتوفان الكلي وذلك بأضافة 50 مل من الماء المقطر الى 10 غم من اللحم المعامل المبين في الفقرة ( 3.24.3 ) مع المزج الجيد ومن ثم ترشيح المزيج بورق الترشيح Whatman No. 1 ويخفف الراشح بالماء المقطر 4 مرات بقدر حجمه وبعد ذلك سجلت الامتصاصية بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجي 280 نانومتر .

**7.4.24.3 معامل التايروسين / التربتوفان البروتيني ومعامل التايروسين /****التربتوفان غير البروتيني****1.7.4.24.3 محلول ثلاثي كلورو حامض الخليك تركيز 15 % ( TCA )**

حضر المحلول بأذابة 15 غم من TCA في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم 100 مل

**2.7.4.24.3 طريقة العمل**

أضيف الى الراشح الناتج الذي تم الحصول عليه في الفقرة ( 5.4.24.3 ) حجم من (TCA) المبين في الفقرة ( 1.7.4.24.3 ) بنسبة 1:1 مع المزج الجيد ومن ثم الترشيح بأستعمال ورق الترشيح Whatman No. 1 وبعد ذلك قدر معامل التايروسين / التربتوفان غير البروتيني بقياس الامتصاصية للراشح بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجي 280 نانومتر .

اما قياس معامل التايروسين / التربتوفان البروتيني فيتم عن طريق الاتي :

معامل التايروسين / التربتوفان البروتيني = معامل التايروسين / التربتوفان الكلي - معامل التايروسين / التربتوفان غير البروتيني

**8.4.24.3 تقدير النتروجين الكلي**

تم تقدير النتروجين الكلي وفقاً لما ذكره ( Joslyn ( 1970 )

**1.8.4.24.3 المواد المستعملة**

1- حامض البوريك

2- حامض الكبريتيك تركيز 0.02 مولاري

3- حامض الكبريتيك المركز

4- أقراص العامل المساعد تحتوي على كبريتات الصوديوم والزنك .

5- هيدروكسيد الصوديوم تركيز 40 %

### 2.8.4.24.3 طريقة العمل

أخذ 2 غم من اللحم وهضم مع 5 مل من من حامض الكبريتيك مع إضافة نصف قرص من أقراص العامل المساعد وبعد ذلك اجريت عملية التقطير باستعمال هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 40% لتحويل الامونيوم الى امونيا وأستقبال الامونيا بـ 5 مل من حامض البوريك والتسحيح مع حامض الكبريتيك بتركيز 0.02 مولاري ومن ثم حسبت النتائج على أساس الوزن الجاف .

### 9.4.24.3 تقدير النتروجين الكلي الذائب

قُدر النتروجين الكلي الذائب للحم المعامل وفقاً لطريقة ( Kline and Stewart ( 1948 )

### 1.9.4.24.3 تحضير محلول كلوريد البوتاسيوم تركيز 0.5 مولاري

حضر بأذابة 37.3 غم من KCl في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم الى لتر .

### 2.9.4.24.3 طريقة العمل

جنس 1 غم من عينات اللحم المبينه في الفقرة ( 3.24.3 ) مع كمية كافية من محلول KCl في ورق حجمي سعة 100 مل ثم أكمل الحجم الى 100 مل بمحلول كلوريد البوتاسيوم وترك الخليط مدة 30 دقيقة مع الرج وبعدها نبذ بواسطة جهاز النبذ المركزي المبرد بسرعة 3500 xg ولمدة 15 دقيقة ، وبعد ذلك أخذ الراشح وقدر النتروجين الكلي الذائب فيه بأستعمال طريقة مايكروكلدال وحسبت النتائج على أساس الوزن الجاف .

### 10.4.24.3 تقدير النتروجين البروتيني الذائب و النتروجين غير البروتيني

#### الذائب

قدر النتروجين البروتيني الذائب والنتروجين غير البروتيني الذائب وفقاً لما ذكره

.Kline and Steward ( 1948 )

**1.10.4.24.3 تحضير محلول ثلاثي كلوروحامض الخليك 30 % TCA**

حضر المحلول بأذابة 30 غم من TCA في كمية من الماء المقطر ومن ثم أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .

**2.10.4.24.3 طريقة العمل**

أستعمل الراشح الناتج في الفقرة (2.9.4.24.3) في تقدير النتروجين غير البروتيني الذائب ، أذ أُضيف 10 مل من محلول TCA الموضح في الفقرة ( 1.10.4.24.3 ) الى 50 مل من الراشح مع المزج الجيد ومن ثم ترك لمدة 15 دقيقة ونبذ بواسطة جهاز النبذ المركزي المبرد بسرعة 3500 xg ولمدة 15 دقيقة ، اما النتروجين البروتيني الذائب تم حسابه كما يأتي :

النتروجين البروتيني الذائب = النتروجين الكلي الذائب – النتروجين غير البروتيني الذائب

**5.24.3 التقييم الحسي**

أجري التقييم الحسي لشرائح اللحم المطبوخة والمعاملة بالأنزيم كما مبين في الفقرة ( 3.24.3 ) من قبل الأساتذة المختصين في جامعة البصرة / كلية الزراعة / قسم علوم الاغذية وفقاً لأستمارة التقييم المذكورة في (Tahir. (1979) وكما موضح في الجدول ( 3 – 9 ) .

جدول ( 3 – 9 ) أستمارة التقييم الحسي لشرائح اللحم المعاملة بأنزيم بروتينز الاسبارتك

القبول العام Acceptability	الطراوة Tenderness	العصيرية Juiciness	النكهة Flavor	اللون Color	الدرجة
مقبول جداً	طري جداً	عصيري جداً	نكهة قوية	مقبول جداً	7
مقبول	طري	عصيري	نكهة متوسطة	مقبول	6
مقبول قليلاً	طري قليلاً	قليل العصيرية	نكهة مقبولة	مقبول قليلاً	5
وسط	وسط	وسط	عديمة النكهة	وسط	4
غير مقبول قليلاً	طراوة غير مقبولة قليلاً	قليل الجفاف	نكهة غير مقبولة قليلاً	غير مقبول قليلاً	3
غير مقبول	طراوة غير مقبولة متوسطاً	جاف	نكهة غير مقبولة متوسطاً	غير مقبول	2
غير مقبولة جداً	طراوة غير مقبولة جداً	جاف جداً	نكهة غير مقبولة جداً	غير مقبول جداً	1

### 25.3 التحليل الإحصائي

استخدم برنامج SPSS إصدار 2021 وبرنامج Genstat إصدار 2012 في تحليل البيانات باستخدام اقل فرق معنوي L.S.D عند مستوى احتمالية 0.05 .

## 4- النتائج والمناقشة

## 1.4 العزل

ان عملية انتخاب وعزل الكائن المجهري تعتبر من العمليات المهمة في هذا النوع من الدراسات لما له من اهمية في تحديد المفاصل الاخرى من الدراسة حيث تم عزل وتنقية 40 عزلة محلية من الاعفان وبأستخدام وسط PDA ، أذ شكل جنس *Aspergillus* أعلى نسبة تردد والتي بلغت (37.5% ) يليه جنس *Penicillium* بنسبة(20 %) كما مبين في الجدول ( 4 – 1 ) ، وتوزعت العزلات كما مبين في الجدول (4-2) حسب مصادر العزل ، وذلك بالأعتماد على مصادر متعددة مثل الحبوب منها ( الرز والحنطة والشعير والذرة ) وكذلك التربة التي أخذت من مناطق مختلفة من محافظة البصرة ، اذ تمثل التربة المخزن الطبيعي للأحياء المجهرية ، ( Saccá et al. , 2017 ; Chantavorakit et al. , 2021) ، كما ان الحبوب تكون عرضة لنمو الفطريات، والتي يمكن أن تؤدي إلى تخليق المنتجات الثانوية المتنوعة طوال مراحل نموها وحصادها وتخزينها كما أن الفطريات التي تنقلها البذور تلعب دوراً مهماً في نمو النباتات فهي تؤثر على إنبات البذور وقوة الشتلات ونمو النبات بشكل عام ( Abdel-Nasser et al., 2022 Shade et al., 2017 ; Tebele et al., ) (2020) .

تطابقت هذه الدراسة مع الكثير من الدراسات التي أكدت على استخدام التربة كمصدر رئيسي لعزل انواع *Aspergillus* وهذا ما جاء في دراسة (Chimbekujwo et al. 2020), الذي عزل *Aspergillus brasiliensis* BCW2 من التربة وكذلك (Maitig et al. , 2018) ، الذي استخدم التربة كمصدر لعزل *Aspergillus* sp. . كما توافقت الدراسة مع ( Roy et al. (2023) الذي عزل مجموعة من الفطريات من حبوب الرز من بينها *Aspergillus* و *Penicillium* .وتطابقت مع(Lumi Abe et al. (2015) الذي عزل مجموعة من الفطريات من حبوب الذرة (*Zea mays* L) وأستعملها في أنتاج الانزيمات .

جدول (1-4) النسبة المئوية لتردد العزلات

ت	جنس العزلة	عدد العزلات	نسبتها من المجموع الكلي للعزلات
1	<i>Aspergillus</i>	15	% 37.5
2	<i>Penicillium</i>	8	% 20
3	<i>Mucor</i>	7	% 17.5
4	<i>Fusarium</i>	5	% 12.5
5	<i>Rhizopus</i>	3	%7.5
6	<i>Alternaria</i>	2	%5
	المجموع	40	% 100

الجدول (2-4) مصادر العزل للأعفان المعزولة محلياً

ت	رمز العزلة	المصدر	الجنس	ت	رمز العزلة	المصدر	الجنس
1	A3	P <sub>1</sub>	<i>Aspergillus</i>	21	D23	P <sub>10</sub>	<i>Mucor</i>
2	A4	P <sub>2</sub>	<i>Rhizopus</i>	22	D22	P <sub>8</sub>	<i>Aspergillus</i>
3	A42	P <sub>3</sub>	<i>Rhizopus</i>	23	D23	P <sub>12</sub>	<i>Aspergillus</i>
4	B23	P <sub>4</sub>	<i>Mucor</i>	24	D53	P <sub>4</sub>	<i>Fusarium</i>
5	B22	P <sub>5</sub>	<i>Penicillium</i>	25	E52	P <sub>7</sub>	<i>Alternaria</i>
6	B33	P <sub>6</sub>	<i>Aspergillus</i>	26	E53	P <sub>3</sub>	<i>Penicillium</i>
7	B42	P <sub>7</sub>	<i>Rhizopus</i>	27	F13	P <sub>10</sub>	<i>Aspergillus</i>
8	B63	P <sub>4</sub>	<i>Aspergillus</i>	28	F14	P <sub>6</sub>	<i>Aspergillus</i>
9	B83	P <sub>8</sub>	<i>Aspergillus</i>	29	F23	P <sub>6</sub>	<i>Aspergillus</i>
10	C14	P <sub>9</sub>	<i>Mucor</i>	30	F24	P <sub>14</sub>	<i>Penicillium</i>
11	C43	P <sub>10</sub>	<i>Penicillium</i>	31	F83	P <sub>9</sub>	<i>Mucor</i>
12	C94	P <sub>4</sub>	<i>Aspergillus</i>	32	F84	P <sub>14</sub>	<i>Mucor</i>
13	C93	P <sub>11</sub>	<i>Alternaria</i>	33	F93	P <sub>4</sub>	<i>Penicillium</i>
14	C113	P <sub>12</sub>	<i>Mucor</i>	34	G12	P <sub>1</sub>	<i>Fusarium</i>
15	C114	P <sub>5</sub>	<i>Fusarium</i>	35	G13	P <sub>9</sub>	<i>Mucor</i>
16	C123	P <sub>8</sub>	<i>Aspergillus</i>	36	G34	P <sub>7</sub>	<i>Fusarium</i>

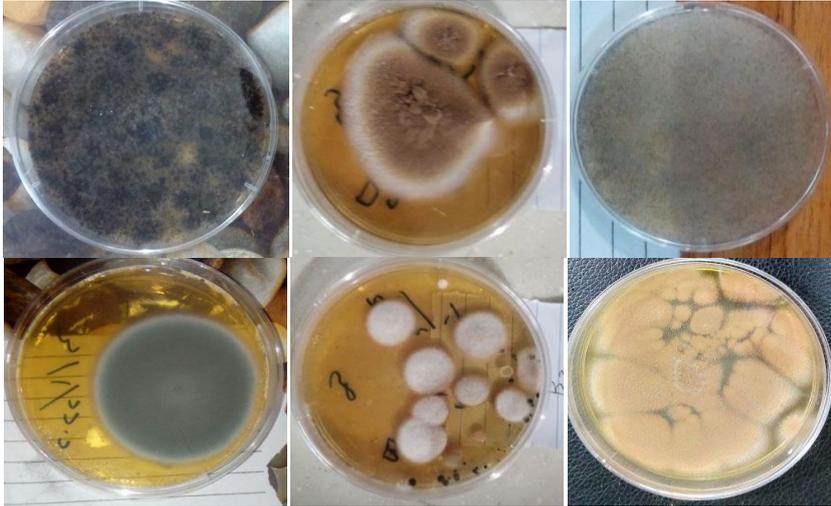
<i>Fusarium</i>	P <sub>8</sub>	G54	37	<i>Aspergillus</i>	P <sub>13</sub>	C124	17
<i>Aspergillus</i>	P <sub>12</sub>	G93	38	<i>Penicillium</i>	P <sub>4</sub>	D12	18
<i>Aspergillus</i>	P <sub>11</sub>	G94	39	<i>Aspergillus</i>	P <sub>6</sub>	D14	19
<i>Penicillium</i>	P <sub>13</sub>	M14	40	<i>Penicillium</i>	P <sub>12</sub>	D13	20

الرز: P<sub>1</sub> ، الحنطة : P<sub>2</sub> ، الشعير: P<sub>3</sub> ، تربة محطة أبحاث الهارثة : P<sub>4</sub> ، الذرة : P<sub>5</sub> ، تربة ابو الخصيب : P<sub>6</sub> ، تربة حدائق كلية الزراعة : P<sub>7</sub> ، تربة حدائق كلية العلوم : P<sub>8</sub> ، تربة كرمة علي: P<sub>9</sub> ، تربة الزبير: P<sub>10</sub> ، تربة شارع الالبان في العشار : P<sub>11</sub> ، تربة حدائق كلية التربية: P<sub>12</sub> ، تربة الدير: P<sub>13</sub> ، تربة القرنة: P<sub>14</sub> .

## 2.4 تشخيص جنس العزلات

أجريت عملية تشخيص لمستعمرات الاعفان المعزولة محلياً على مستوى الجنس وبالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهريّة لكل عزلة ، اذ اظهرت النتائج ان اكثر الاجناس السائدة هو جنس *Aspergillus* والذي تم التعرف عليه من خلال المستعمرات التي تتميز بنموات خيطية كثيفة ومستعمرات ذات ألوان مختلفة مثل الاسود والبني المصفر الى البني الداكن والاخضر الى الرمادي ، وأظهرت مستعمرات *Penicillium* نموات خيطية ملونة باللون الازرق او الاخضر المزرق ، اما عزلات جنس *Rhizopus* التي أظهرت مستعمراتها نموات خيطية ناعمة وذات لون اسود اما مستعمرات *Mucor* اظهرت نموات من اللون الاحمر والبني الى اللون البني الداكن ، كما ان مستعمرات جنس *Fusarium* نمت باللون الابيض ومستعمرات *Alternaria* أظهرت نموات بلون أصفر بني باهت وكما مبين في الشكل (4 - 1) .

اتفقت هذه الدراسة مع العديد من الدراسات حول الصفات المظهرية للفطريات الخيطية (*et al.,2020 ; Alternaria ,2020 ; Wagner Darvishnia et al.,2023 ;* )  
( Balajee, 2009 ; Dania *et al.,2021*; ) .



الشكل (1-4) عزلات بأشكال وألوان مختلفة

### 3.4 الغريلة الاولية

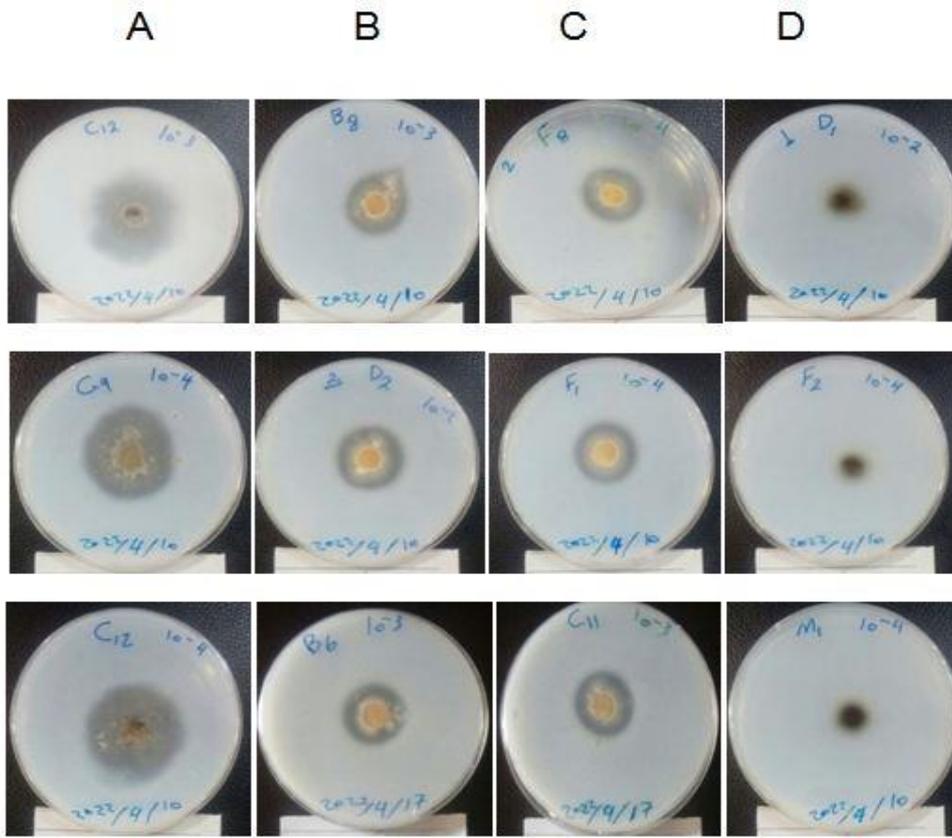
يبين الجدول ( 3-4 ) العزلات واجناسها ومصادرها التي تم غربلتها، أذ أجريت عملية الغريلة الاولية لـ ( 40 ) عزلة فطرية على وسط Skim Milk Agar وبمدة حضن 48 ساعة وبدرجة حرارة 30 م° ، أظهرت منها (32) عزلة (اي بنسبة 80%) تحللاً واضحاً على الوسط ، كما ان من بين هذه العزلات أظهرت العزلات ( C124 , C123 , B33 , F13 , F23 , G94 ) اعلى نشاط للبروتيز مقارنة بالعزلات الاخرى اذ كانت لها قابلية هضم اكبر للبروتينات الموجودة في الحليب الفرز Skim Milk ، بينما لم تظهر العزلات ( A4 , A42 , B22 , E52 , M14 , F83 ) أي نشاط مقارنة بالعزلات الاخرى وكما هو مبين في الشكل ( 4 -2) وبناءً على ذلك تم أستبعاد العزلات التي لم تظهر أي نشاط أنزيمي من الفحوصات اللاحقة ، أن الهالات المتكونة حول المستعمرات يأتي نتيجة لقدرة العزلات على إفراز أنزيم البروتيز والذي بدوره يقوم بتحلل البروتينات الموجودة في الوسط ( Kazhkenovna *et al.* , 2020 ) .

جاءت هذه النتائج مطابقة لما وجدته ( Maitig *et al.* (2018) اذ اشار الى ان من بين كل العزلات اظهر عفن *Aspergillus sp.* المعزول من سطح التربة أعلى نشاط للبروتيز وذلك من خلال حجم الهالة المحيطة بالمستعمرات، كما تطابقت هذه الدراسة مع الكثير من الدراسات ، اذ وجد كلاً من ( Tharwat *et al.* (2014) و ( Dubey *et al.* ( 2010) بأن أعلى نشاط لأنزيم البروتيز كان في عفن *Aspergillus fumigates* و

*Aspergillus flavus* اللذان أظهرتا هالات واضحة حول مستعمراتها ، كذلك مع نتائج *awamori* 16 Kazhkenovna et al. (2020) والتي لاحظ فيها ان عفن Skim Milk *Aspergillus awamori* 22 و *Aspergillus* Agar عند درجة حرارة 30 م ، أظهرت أعلى نشاط للبروتيز ناتجة عن قدرته في تحلل الكازين والتي كانت واضحة من خلال الهالات المحيطة بالمستعمرات التي كان اقطارها 22.8 ملم و 20.1 ملم على التوالي .

جدول (3-4) العزلات واجناسها ومصادرها وقدرتها على انتاج بروتيز الاسبارتك في وسط Skim Milk Agar

ت	رمز العزلة	المصدر	الجنس	حجم الهالة (ملم)	ت	رمز العزلة	المصدر	الجنس	حجم الهالة (ملم)
1	A3	P <sub>1</sub>	<i>Aspergillus</i>	12	21	D21	P <sub>10</sub>	<i>Mucor</i>	11
2	A4	P <sub>2</sub>	<i>Rhizopus</i>	-	22	D22	P <sub>8</sub>	<i>Aspergillus</i>	24
3	A42	P <sub>3</sub>	<i>Rhizopus</i>	-	23	D23	P <sub>12</sub>	<i>Aspergillus</i>	23
4	B23	P <sub>4</sub>	<i>Mucor</i>	12	24	D53	P <sub>4</sub>	<i>Fusarium</i>	17
5	B22	P <sub>5</sub>	<i>Penicillium</i>	-	25	E52	P <sub>7</sub>	<i>Aiternaria</i>	-
6	B33	P <sub>6</sub>	<i>Aspergillus</i>	26	26	E53	P <sub>3</sub>	<i>Penicillium</i>	14
7	B42	P <sub>7</sub>	<i>Rhizopus</i>	15	27	F13	P <sub>10</sub>	<i>Aspergillus</i>	25
8	B63	P <sub>4</sub>	<i>Aspergillus</i>	24	28	F14	P <sub>6</sub>	<i>Aspergillus</i>	13
9	B83	P <sub>8</sub>	<i>Aspergillus</i>	23	29	F23	P <sub>6</sub>	<i>Aspergillus</i>	25
10	C14	P <sub>9</sub>	<i>Mucor</i>	11	30	F24	P <sub>14</sub>	<i>Penicillium</i>	-
11	C43	P <sub>10</sub>	<i>Penicillium</i>	18	31	F83	P <sub>9</sub>	<i>Mucor</i>	12
12	C94	P <sub>4</sub>	<i>Aspergillus</i>	22	32	F84	P <sub>14</sub>	<i>Mucor</i>	12
13	C93	P <sub>11</sub>	<i>Alternaria</i>	13	33	F93	P <sub>4</sub>	<i>Penicillium</i>	19
14	C113	P <sub>12</sub>	<i>Mucor</i>	12	34	G12	P <sub>1</sub>	<i>Fusarium</i>	12
15	C114	P <sub>5</sub>	<i>Fusarium</i>	16	35	G13	P <sub>9</sub>	<i>Mucor</i>	12
16	C123	P <sub>8</sub>	<i>Aspergillus</i>	28	36	G34	P <sub>7</sub>	<i>Fusarium</i>	11
17	C124	P <sub>13</sub>	<i>Aspergillus</i>	29	37	G54	P <sub>8</sub>	<i>Fusarium</i>	12
18	D12	P <sub>4</sub>	<i>Penicillium</i>	-	38	G93	P <sub>12</sub>	<i>Aspergillus</i>	11
19	D14	P <sub>6</sub>	<i>Aspergillus</i>	20	39	G94	P <sub>11</sub>	<i>Aspergillus</i>	30
20	D13	P <sub>12</sub>	<i>Penicillium</i>	20	40	M14	P <sub>13</sub>	<i>Penicillium</i>	-



الشكل (2-4) العزلات المكونة للهالات حول المستعمرات اثناء اجراء عملية الغربلية الاولية

A : جيد B : متوسط C : ضعيف D : لا يوجد

#### 4.4 الغربلية الثانوية Secondary Screening

أظهرت نتائج تنمية العزلات الفطرية المحلية في محتوى مائي منخفض وبأستعمال وسط الانتاج الانزيمي المبين في الفقرة (2.6.3) من أجل اختيار العزلة الأكثر في إنتاج الأنزيم تفوق معظم العزلات التابعة لجنس *Aspergillus* والتي تحمل الرمز (C124 ، G94) ، B33 ، F13 ، C123 ، F23 ، B63 ، D22 ، B83 ، D23) من حيث الفعالية التخثرية والفعالية الانزيمية (وحدة / مل) والفعالية النوعية (وحدة / ملغم) وكما مبين في الجدول (4-4) ، استعملت تقنية تخمرات الحالة الصلبة في إنتاج انزيم بروتيز الاسبارتك من العزلات الفطرية المعزولة محلياً كونها تتميز بقلّة التكلفة وقلّة استهلاك الطاقة وامكانية الاستفادة من المخلفات الصناعية والزراعية كمادة خاضعة وتُعد هذه التخمرات من التقنيات

المفضلة للفطريات في إنتاج الانزيمات ومنها انزيم بروتيناز الاسبارتك وبعكس الكائنات الحية الأخرى التي تحتاج الى نشاط مائي مرتفع (Kuila and Sharma , 2018 ; Ruslan *et al.* , 2023) وقد كانت هذه الدراسة متطابقة مع الكثير من الدراسات التي اكدت استعمال تخمرات الحالة الصلبة في إنتاج انزيم البروتيناز من الاعفان ، أذ جاءت هذه النتائج مشابهة لما وجدته Vishwanatha (2009) عند أجرائه لعملية غربلة لـ 24 عزلة من الاعفان لدراسة قدرتها على أنتاج البروتيناز الحامضي بطريقة تخمرات الحالة الصلبة وبأستعمال نخالة الحنطة ، أذ لاحظ أن أعلى أنتاجية للأنزيم كانت من العفن *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 ، كما تطابقت هذه النتائج مع ( Mamo *et al.* ( 2020 ) الذي أنتج انزيم البروتيناز من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة ، و توافقت مع (Osmolovskiy *et al.* (2021) الذي استعمل تخمرات الحالة الصلبة في إنتاج انزيم البروتيناز من انواع تابعة لعفن *Aspergillus spp.* .

جدول ( 4 - 4 ) الغرلة الثانوية لعزلات الاعفان المحلية المنتجة لأنزيم بروتيناز الاسبارتك بأستعمال

تخمرات الحالة الصلبة على وسط نخالة الحنطة

ت	رمز العزلة	الجنس	الفعالية التخثرية وحدة / مل	الفعالية الإنزيمية وحدة / مل	الفعالية النوعية وحدة / ملغم
1	A3	<i>Aspergillus</i>	68.5	178	139.06
2	B23	<i>Mucor</i>	66.6	176	137.9
3	B33	<i>Aspergillus</i>	72	230	214.9
4	B42	<i>Rhizopus</i>	70.7	193,3	159.7
5	B63	<i>Aspergillus</i>	76.1	242,6	212.8
6	B83	<i>Aspergillus</i>	75	240,6	211.05
7	C14	<i>Mucor</i>	62.1	94,6	66.6
8	C43	<i>Fusarium</i>	72.07	206,6	170.7
9	C94	<i>Aspergillus</i>	73.3	213.3	176.2
10	C93	<i>Rhizopus</i>	69.1	181,3	149.8
11	C113	<i>Mucor</i>	68.9	180	148.7
12	C114	<i>Fusarium</i>	71.4	206,6	170.7
13	C123	<i>Aspergillus</i>	78.6	248	231.7

233,6	250	79.4	<i>Aspergillus</i>	C124	14
140.04	179,3	68.7	<i>Aspergillus</i>	D14	15
165.2	200	72.9	<i>Fusarium</i>	D13	16
66.1	94	62.01	<i>Mucor</i>	D21	17
213.4	243,3	75.7	<i>Aspergillus</i>	D22	18
197.7	239,3	73.8	<i>Aspergillus</i>	D23	19
176.2	213,3	71.6	<i>Fusarium</i>	D53	20
154.2	186,6	70.5	<i>Penicillium</i>	E53	21
216.3	246,6	77.4	<i>Aspergillus</i>	F13	22
151.4	183,3	69.5	<i>Aspergillus</i>	F14	23
215.7	246	76.9	<i>Aspergillus</i>	F23	24
137.5	176	68.1	<i>Mucor</i>	F84	25
159.7	193.3	72.2	<i>Fusarium</i>	F93	26
97.2	131,3	65.04	<i>Fusarium</i>	G12	27
95.2	128,6	63.6	<i>Mucor</i>	G13	28
60.98	86.6	60.1	<i>Fusarium</i>	G34	29
83.4	112,6	62.9	<i>Fusarium</i>	G54	30
62.3	88,6	58.3	<i>Aspergillus</i>	G93	31
272.2	258.6	80	<i>Aspergillus</i>	G94	32

ان تفوق العزلات المبينة في الجدول (4-5) ادى الى اختيارها واعادة تنميتها على نفس الوسط وفي نفس الظروف للتأكد من ثبات العزلة المحلية وراثياً من حيث قدرتها على انتاج الانزيم وكان من بين هذه العزلات هي العزلة ذات الرمز ( G94 ) التي أظهرت ثباتاً واضحاً في انتاج الانزيم بفعالية انزيمية 258.6 وحدة / مل وفعالية نوعية 272.2 وحدة / ملغم ، وفعالية تخثرية 80 وحدة / مل ، في حين لوحظ ان بقية العزلات تفاوتت وتباينت في كمية الانزيم المنتج عند تقدير الفعالية الانزيمية .

جدول (4-5) العزلة الثانوية لأفضل 10 عزلات محلية منتجة لأنزيم بروتينز الاسبارتك بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة على وسط نخالة الحنطة

ت	رمز العزلة	الجنس	الفعالية التخثرية وحدة /مل	الفعالية الإنزيمية وحدة /مل	الفعالية النوعية
1	B33	<i>Aspergillus</i>	72	230	214.9
2	B63	<i>Aspergillus</i>	69	221.3	194.1
3	B83	<i>Aspergillus</i>	71	218.6	191.7
4	C123	<i>Aspergillus</i>	73	223.3	184.5
5	C124	<i>Aspergillus</i>	79.4	248	231.7
6	D22	<i>Aspergillus</i>	81.52	226.6	198.7
7	D23	<i>Aspergillus</i>	75.61	225.3	186.1
8	F13	<i>Aspergillus</i>	60.15	186.6	163.6
9	F23	<i>Aspergillus</i>	76	236.6	207.5
10	G94	<i>Aspergillus</i>	80	258.6	272.2

ومن ثم تم اختبار العزلات كما في الجدول (4-6) من ناحية التثبيط بالمثبط (Pepstatin A) كون هذا المثبط متخصص بتثبيط أنزيم بروتينز الاسبارتك ، وقد تبين أن الانزيم المنتج من العزلة المحلية (G94) *Aspergillus* قد ثبت تقريباً بشكل تام وبفعالية متبقية (0.12 %) في حين لم تتأثر العزلات (B63 ، C123 ، D22 ، D23 ، F13) بالمثبط وبفعالية متبقية (98.5 % ، 100 % ، 100 % ، 87.7 % ، 100 % ) على التوالي، أن تثبيط بروتينز الاسبارتك بفعل المثبط (Pepstatin) يعود الى مجاميع الهيدروكسيل الموجودة في المثبط والتي تعمل على الارتباط بالمواقع الفعالة ( Asp32 ، Asp214) الموجودة في أنزيم بروتينز الاسبارتك (Vishwanatha, 2009) .

جاءت هذه النتائج متوافقة مع Song et al. (2020) عند أستعماله مركب Pepstatin A في تثبيط أنزيم بروتينز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus niger* F0215، أذ ثبت الانزيم بشكل كامل وبفعالية متبقية 0% . كما تطابقت النتائج مع (Xue et al. (2024 عند أستعماله مركب Pepstatin A في تثبيط أنزيم بروتينز الاسبارتك المنتج

من عفن *Trichoderma asperellum* ، أذ تثبط الانزيم بشكل كامل وبفعالية متبقية 0% ، وعلى هذا الاساس ونتيجة لأرتفاع قيم الفعالية التحليلية مقارنة مع الفعالية التخثرية فضلاً عن حصول أعلى تثبيط عند المعاملة مع Pepstatin A تم اختيار العزلة ( G94 ) *Aspergillus* لأكمال الدراسة الحالية .

جدول (4-6) غريزة العزلات المنتجة لأنزيم بروتيز الاسبارتك على اساس معاملتها بمثبط

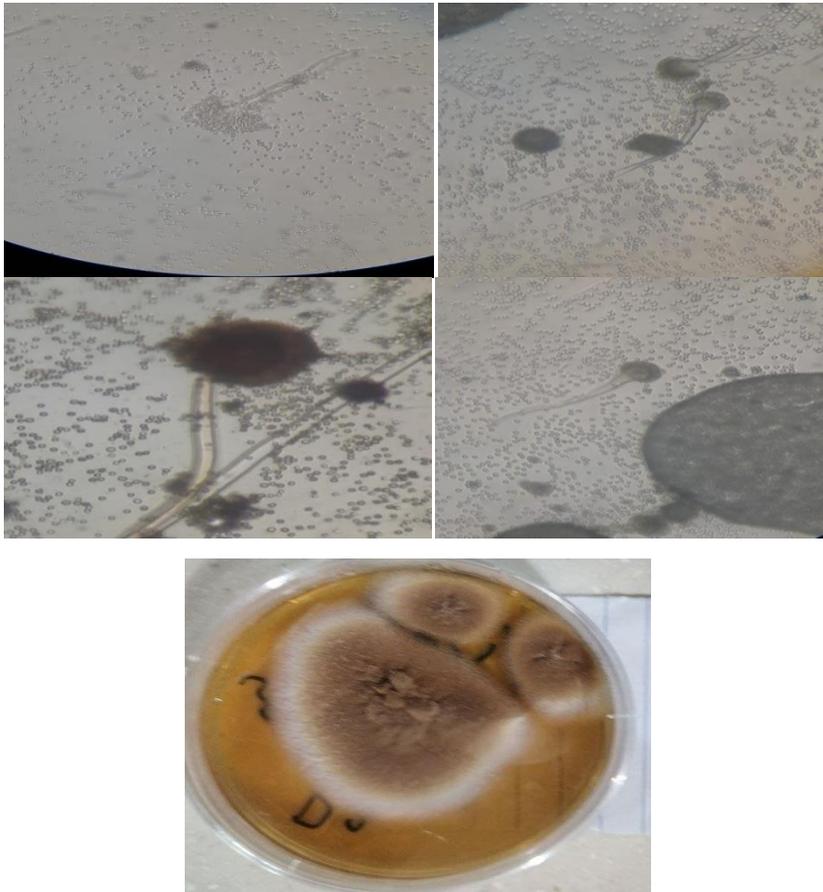
الـ ( Pepstatin A )

ت	رمز العزلة	الجنس	الفعالية الانزيمية باستخدام مثبط الـ Pepstatin A	الفعالية المتبقية %
1	B33	<i>Aspergillus</i>	37.61	16.35
2	B63	<i>Aspergillus</i>	218	98.5
3	B83	<i>Aspergillus</i>	22.31	10.06
4	C123	<i>Aspergillus</i>	223.3	100
5	C124	<i>Aspergillus</i>	12.48	5.03
6	D22	<i>Aspergillus</i>	226.6	100
7	D23	<i>Aspergillus</i>	197.7	87.7
8	F13	<i>Aspergillus</i>	186.6	100
9	F23	<i>Aspergillus</i>	22.9	9.6
10	G94	<i>Aspergillus</i>	0.32	0.12

#### 5.4 تشخيص نوع العزلة الأكفا *Aspergillus* G94 في أنتاج الانزيم

فحصت العزلة ( G94 ) فحصاً مجهرياً لتحديد نوع العزلة والتي شخصت مظهرياً وتم اختيارها كونها الاكثر انتاجاً لأنزيم البروتيز والتي مر ذكرها سابقاً الشكل (4-4) ، اذ وجد ان معدل أقطار مستعمرات هذه العزلة على وسط Czapek Yeast Agar هي 44 ملم و 66 ملم عند درجة حرارة 25 و 37 م على التوالي ، كذلك بلغ معدل قطرها 53 ملم عند نموها على وسط Malt Extract Agar عند درجة حرارة 25 م ، أما لون المستعمرات فكانت بنية مائلة الى اللون الذهبي ،، وهذه النتائج متوافقة مع المفاتيح التصنيفية المبينة في Klich (2002) والذي أشار الى أن معدل قطر المستعمرات لعفن *Aspergillus*

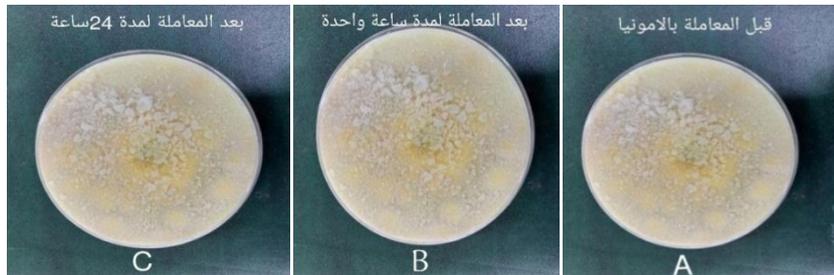
*terreus* يتراوح بين 40 – 60 ملم و 65 – 70 ملم على وسط CYA عند درجة حرارة 25 و 37 م° على التوالي ، و 40 – 70 ملم عند نموها على وسط MEA عند درجة حرارة 25 م° . كذلك لوحظ ان غزلها الفطري ( Mycellium ) ذو لون أبيض أما الكونيديا (Conidia) فقد ظهرت بشكل كروي ، ملساء وذات لون بني مائل الى البرتقالي أما الحويصلة (Vesicle) فكانت كروية الشكل (Spherical) محاطة بالذئبيات (Sterigmata) أو (ويطلق عليها metulaphialides) والتي ظهرت بشكل صفين Biseriate كما ان مستعمرات هذه العزلة تتكون من حوامل كونيدية طويلة ذات لون بني فاتح وتكون كروية الى بيضوية كما في الشكل ( 3 – 4 ) ، اذ وجد ان العزلة هي *Aspergillus terreus* ، ولقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع ما ذكره ( Balajee 2009) الى ان مستعمرات *Aspergillus terreus* تتكون من حوامل كونيدية طويلة تتراوح بين ( 1.5 – 2.5 ) مايكرومتر وتكون كروية الى بيضوية . وهذا يتطابق مع المراجع التشخيصية ( Klich ,2002 ; Pitt and Hocking ,2009 ) .



شكل ( 3 – 4 ) تشخيص نوع العزلة *Aspergillus G94* الأكفاً في انتاج الانزيم

#### 6.4 الكشف عن الافلاتوكسين في العزلة المنتقاة *Aspergillus terreus*

لوحظ من شكل ( 4-4 ) ان العزلة المحلية لانتج الافلاتوكسين عند تنميتها على وسط جوز الهند بعد مرور ساعة واحدة من الحضانة ودرجة حرارة 30 م° وكذلك لوحظ هذا بعد مرور 24 ساعة من الحضانة وبنفس درجة الحرارة ، أذ يعد عن *Aspergillus terreus* من الاحياء المجهرية الامنة (GRAS (Generally Regarded As Safe)، والتي تلعب دوراً مهماً في العديد من المجالات مثل الطب والغذاء والصناعات الكيمائية وإنتاج الإنزيمات (deLima et al. ,2021;Huang et al. ,2021). تطابقت هذه الدراسة مع (Saito and Machida(1999) الذي أشار إلى إن لون المستعمرات الفطرية المنتجة للأفلاتوكسين يتغير إلى اللون الوردي عند التعرض لبخار الامونيا بينما المستعمرات التي تنتج الافلاتوكسين لا يتغير لونها عند التعرض لبخار الامونيا .



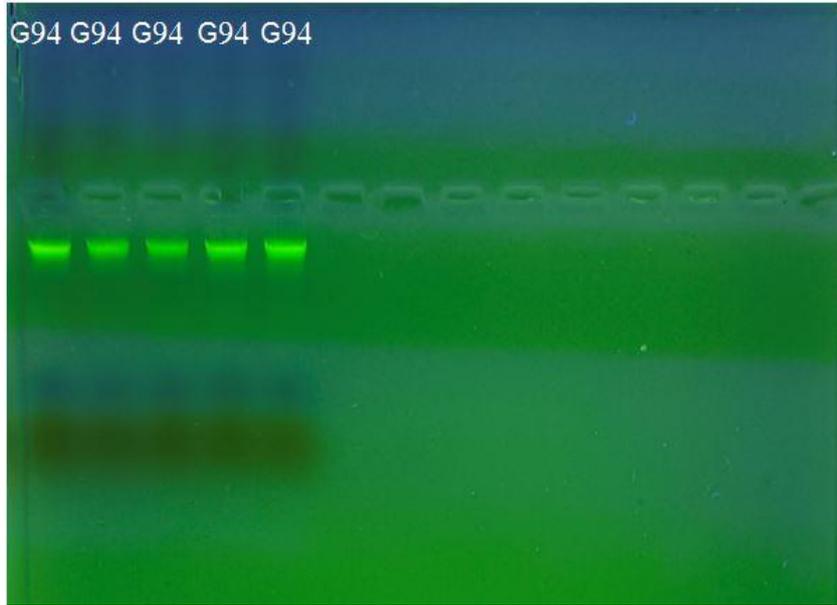
الشكل (4-4) اختبار بخار الامونيا للكشف عن الافلاتوكسين في الطبق الحاروي على مستعمرات العزلة *Aspergillus terreus* المنماة على وسط جوز الهند وعدم تغير اللون .

#### 7.4 التشخيص الجيني للعزلة المحلية الأكفا في أنتاج الإنزيم

##### 1.7.4 استخلاص الحامض النووي DNA

استخلص الحامض النووي DNA من العزلة الفطرية المعزولة محلياً ( G94 ) وبخمس مكررات ، وقد أكدت نقاوة الاستخلاص عن طريق نتائج الترحيل الكهربائي Electrophoresis بأستعمال هلام الاكاروز ، إذ اظهر شكل ( 4 – 5 ) خمس حزم واضحة للحامض النووي DNA مكررة .

أن عملية أستخلاص الحامض النووي DNA تعتمد على مبدأ الارتباط للحامض النووي ذي الشحنة السالبة مع سطح السيليكا المغطى بالأيونات الموجبة الشحنة، وتعد عملية أستخلاص الحامض النووي بواسطة السلكا طريقة بسيطة وسريعة الأداء وقليلة التكلفة وتنتج DNA عالي الجودة (Dairawan & Shetty, 2020) .

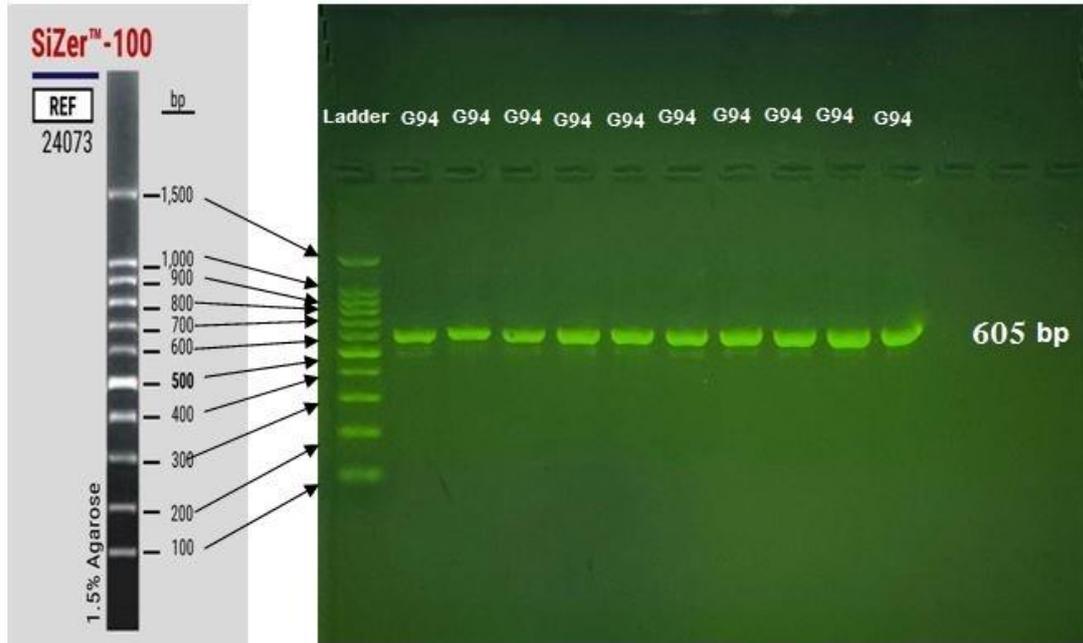


شكل ( 4 – 5 ) الترحيل الكهربائي للحامض النووي DNA المستخلص من العزلة المحلية *Aspergillus G94*

#### 2.7.4 تضخيم الحامض النووي DNA

استعملت تقنية تفاعل سلسلة البوليمريز ( PCR ) Polymerase Chain Reaction بأستعمال اختبار 18S rRNA وأجري التضخيم بأستعمال البوادىء الامامي ITS1 ( forward) و العكسي ITS4 ( reverse) المبينة في الفقرة ( 3.20.3 ) ، أذ ظهر من خلال نتائج الترحيل الكهربائي 10 حزم خضراء واضحة بحجم 605 زوج قاعدي كما في الشكل ( 4 – 6 ) ، وهذا يعني ان البوادىء ارتبطت بالجين المستهدف ITS من الحامض النووي DNA المستخلص من عزلة العفن *Aspergillus G94* ، وتشابهت نتائج هذه الدراسة مع ( Basha et al., 2023 ) الذي شخص العزلة الفطرية على أنها

*Aspergillus terreus* (OQ085169) استنادًا إلى الحامض النووي DNA الفطري المستخلص الذي تم تضخيمه بواسطة PCR بأستعمال البواديء (ITS1 , ITS4) .

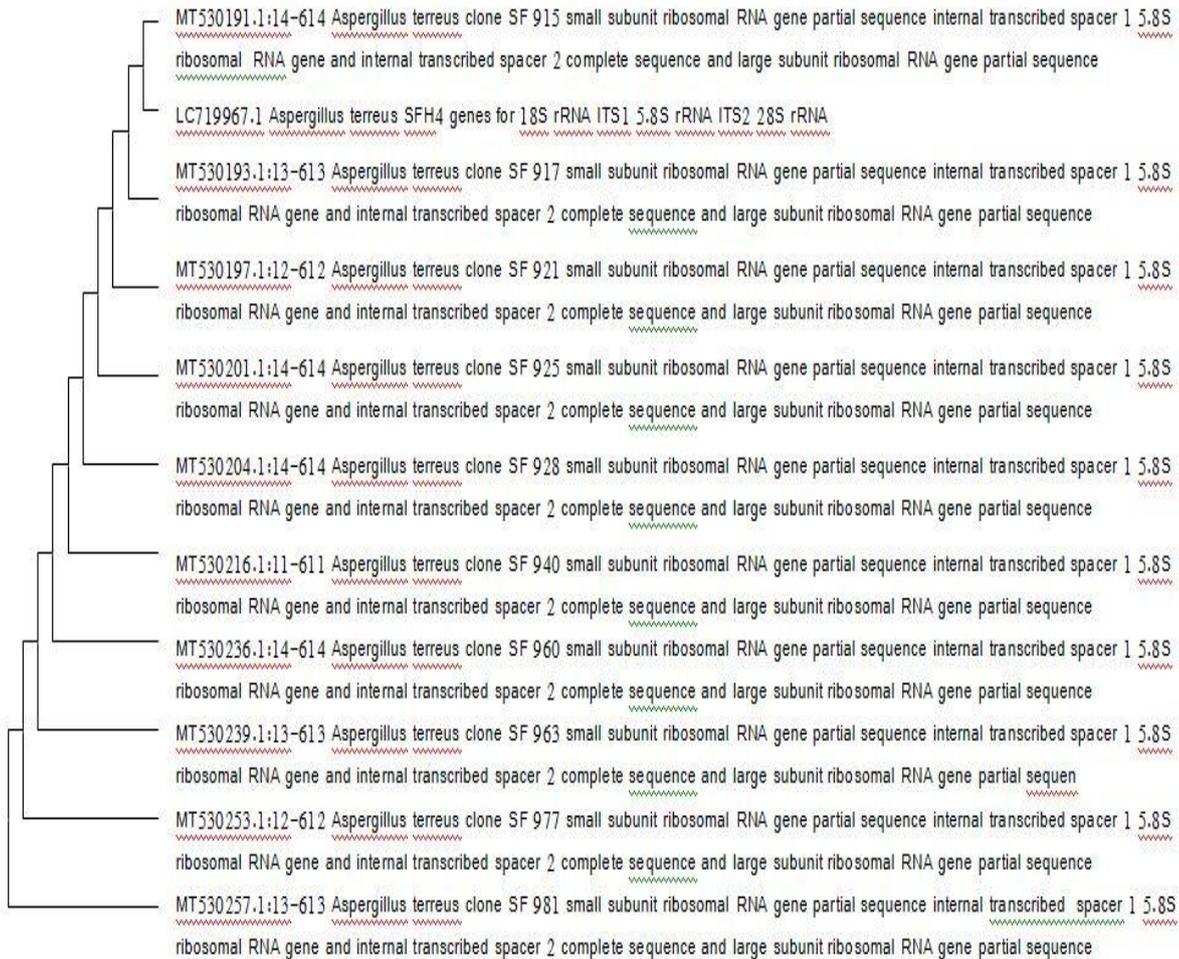


الشكل (4-6) الترحيل الكهربائي لنواتج تفاعل PCR ظهور حزم بحجم 605 زوج قاعدي

### 3.7.4 تحليل تتابع نواتج التضخيم

ارسلت البواديء ونواتج الجين المضخم الى شركة Macrogen الكورية لتحديد تسلسل القواعد النروجينية للعزلة الفطرية قيد الدراسة ملحق (1) ، واعتمدت تلك التسلسلات مع ما متوفر من معلومات حول هذا الجين في موقع NCBI في برنامج BLAST Nucleotide للتعرف على نوع و جنس العزلة الفطرية المنتخبة ، أذ بينت النتائج ان نسبة التطابق كانت 99.55 % بين سلالة ([MT530236.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LC719967)) *Aspergillus terreus* المسجلة في بنك الجينات وبين العزلة المحلية لذلك عدت هذه العزلة بأنها تابعة لهذا العفن وسجلت في بنك الجينات بأسم *Aspergillus terreus* SFH4 وبالأعتماد على تتابعات جين ITS رسمت الشجرة الوراثية لمعرفة العلاقة بين العزلات بأستعمال برنامج MEAG 7 وكما في الشكل (4 - 7) . تعد منطقة ITS هي الطريقة الأكثر فعالية لتحديد الأنواع الفطرية، لأنها تكشف عن اختلافات التسلسل بين الأنواع (El-Bondkly , 2012) .

تطابقت هذه الدراسة مع Basha et al., (2023) و Wardah et al. (2024) اللذين شخصوا جنس ونوع العزلة باستخدام تتابعات جين ITS rRNA على أنها *Aspergillus terreus* كما أستعملنا هذه التتابعات لرسم الشجرة الوراثية .



شكل (4- 7) الشجرة الوراثية لعزلة العفن *Aspergillus terreus* SFH4 وعلاقتها

مع الفطريات نفسها في بنك الجينات NCBI

## 8.4 دراسة الظروف المثلى لإنتاج بروتينز الاسبارتك من عن

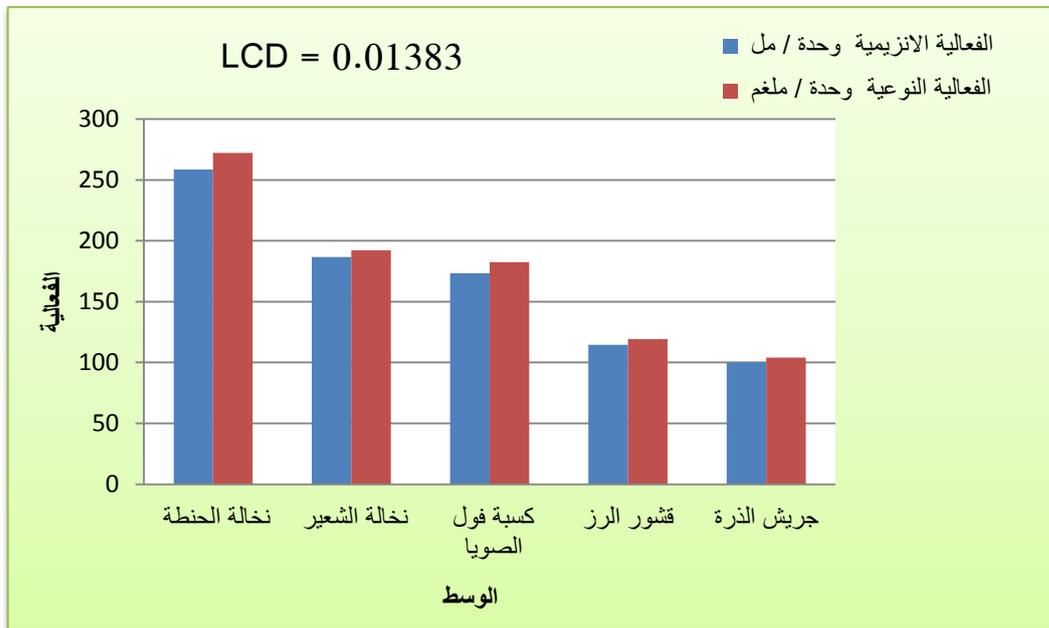
*Aspergillus terreus* SFH4

### 1.8.4 تحديد أفضل وسط لإنتاج الإنزيم :

أستعملت عدة أوساط زرعية في تنمية عن *Aspergillus terreus* SFH4 بطريقة تخمرات الحالة الصلبة لأختيار أفضلها في أنتاج أنزيم بروتينز الاسبارتك والتي تضمنت ( نخالة الحنطة ، نخالة الشعير ، قشور الرز ، جريش الذرة ، كسبة فول الصويا ) أذ لوحظ وجود فروق معنوية بين الأوساط المختلفة عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  والتي تميزت نخالة الحنطة بأعلى فعالية أنزيمية بلغت 258.6 وحدة / مل وبفعالية نوعية 272.2 وحدة /ملغم في حين كان وسط جريش الذرة اقل الأوساط الزرعية فعالية في إنتاج الإنزيم بفعالية أنزيمية 100 وحدة / مل وبفعالية نوعية 104.1 وحدة /ملغم كما موضح في الشكل ( 4 - 8 )، ويعزى سبب انخفاض الفعالية الأنزيمية في الأوساط ( نخالة الشعير ، سبوس الرز ، جريش الذرة ، كسبة فول الصويا) وبشكل تدريجي الى أختلاف مكونات هذه الأوساط وبالتالي الاختلاف في إمكانية الوصول الى المادة الخاضعة ( *Chimbekujwo et al.,2020* ) كما لوحظ انفصال محلول الترطيب عن بعض دقائق الوسط مما أدى الى انخفاض قابليته على امتصاص الماء وهذا يؤثر على نمو الاعفان وإنتاج الإنزيم على العكس من نخالة الحنطة التي تمتاز باحتفاظها بالماء وتركيبها فضلاً عن حجم الدقائق الذي يكون ملائم لدخول الهواء والتي تعتبر من أكثر الأوساط شيوعاً لإنتاج الإنزيمات (Viniegra- González et al.,2003).

ومن الدراسات المطابقة لهذه الدراسة والتي استخدمت نخالة الحنطة في إنتاج إنزيم البروتينز من انواع تابعة لعفن *Aspergillus* ، الدراسة التي أجراها Vishwanatha(2009) من خلال تنمية عن *Aspergillus oryzae* على مجموعة من المخلفات ( نخالة الحنطة ، نخالة الرز ، نخالة الراجي Raji ) بطريقة تخمرات الحالة الصلبة لإنتاج أنزيم البروتينز الحامضي ، وجد أن أعلى إنتاجية للإنزيم كانت عند أستعمال نخالة الحنطة ، وأعزى هذا التفوق الى المحتوى البروتيني في نخالة الحنطة والذي بلغ 14 - 16 % في حين كان 7 - 8 % في نخالة الرز و 5 - 6 % في نخالة الراجي ، كما تطابقت النتائج مع (Novelli et al. , 2016) ، الذي أستعمل عدة أوساط زرعية لإنتاج إنزيم البروتينز بأستعمال تخمرات الحالة الصلبة ، أذ كانت نخالة الحنطة هي أفضل الأوساط

المستعملة في إنتاج الأنزيم ، وايضاً توافقت النتائج مع ( 2016 ) ، da Silva et al. الذي وجد أن أفضل وسط لإنتاج إنزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus tamaris* URM4634 هو وسط نخالة الحنطة وبفعالية انزيمية 340 وحدة / مل ، كما توافقت النتائج مع (2023) Anwar الذي أنتج مجموعة من الانزيمات من عفن *Rhizopus Oryzae* منها أنزيم بروتيز الاسبارتك بطريقة تخمرات الحالة الصلبة ، أذ وجد ان أعلى إنتاجية للأنزيم كانت بأستعمال نخالة الحنطة مقارنة مع بقية المخلفات . كما اختلفت النتائج مع (2020) Chimbekujwo et al. الذي استخدم مجموعة من المخلفات ( نخالة الارز ، قشر الارز ، الذرة الرفيعة ، كوز الذرة ، ، قشر البرتقال ، نخالة الحنطة ) في إنتاج إنزيم البروتيز من عفن *Aspergillus brasiliensis* BCW2 أذ كان قشر البرتقال هو أفضل الاوساط المستعملة في إنتاج الأنزيم

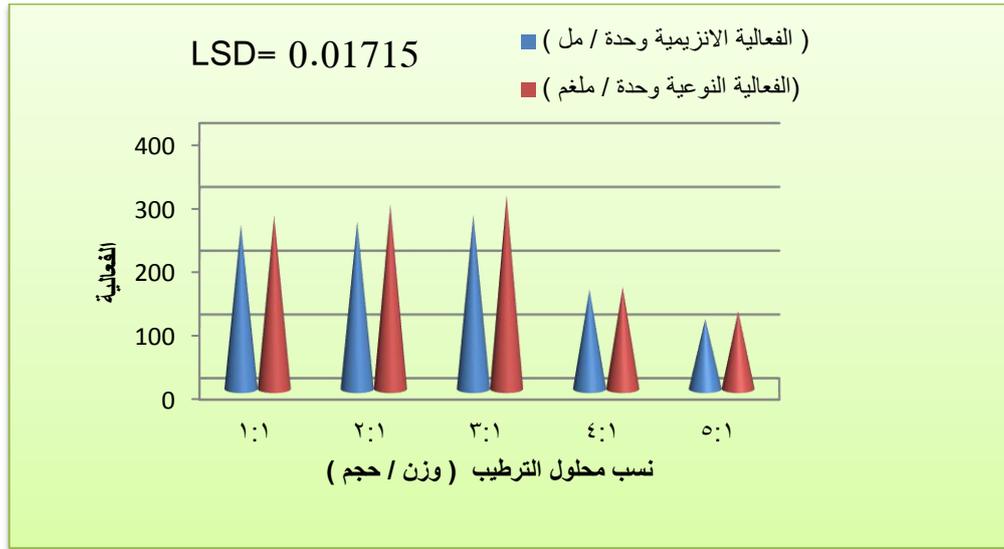


شكل ( 4 - 8 ) تحديد أفضل وسط لإنتاج بروتيز الاسبارتك من عفن

*Aspergillus terreus* SFH4

#### 2.8.4 تحديد أفضل نسبة لمحلول الترطيب المستخدم لإنتاج الإنزيم

لوحظ من الشكل (4 - 9) وجود فروقات معنوية بين نسب محلول الترطيب عند  $p \leq 0.05$  حيث ارتفعت الفعالية الانزيمية بشكل تدريجي الى ان وصلت الى اعلى مستوى لها عند نسبة الترطيب (3:1 وزن / حجم) أي استخدام 30 مل من المحلول الملحي مع 10 غم من وسط الانتاج ( نخالة الحنطة ) ، أذ بلغت الفعالية الانزيمية 273.3 وحدة / مل وبفعالية نوعية 303.6 وحدة / ملغم ، ثم بدأت الفعالية الانزيمية بالانخفاض تدريجياً الى ان وصلت الى أدنى مستوى لها عند نسبة الترطيب (5:1 وزن/ حجم) أذ وصلت الفعالية الانزيمية 110 وحدة / مل وبفعالية نوعية 122.1 وحدة / ملغم . أن التأثير الناتج من عملية الترطيب في تخمرات الحالة الصلبة يعزى الى عمليات نمو وأيض الاحياء المجهرية ، أذ قد يؤدي ارتفاع أو انخفاض نسبة الترطيب عن المستوى الامثل الى أعاقه نمو وأيض الاحياء المجهرية وبالتالي الى قلة أنتاج الإنزيم (Wang et al., 2013) ويمكن ان يكون لأختيار الاملاح المعدنية تأثير ملحوظ وفقاً للكائن المجهرية فضلاً عن دورهما المهم في عمليات التمثيل الغذائي والفعاليات الحيوية ، فهي تدخل في تركيب أغلب المكونات الخلوية كالحوامض النووية ومركبات الطاقة ATP و GTP والدهون الفوسفاتية ، أيضاً لها دور في المحافظة على الرقم الهيدروجيني للوسط وهذا ينعكس أيجاباً على نمو العفن وأنتاج الإنزيم (Bensmail et al., 2015) ويكون الاختلاف في نشاط البروتيز نتيجة للأختلافات في التركيب الكيماوي وحجم الجسيمات التي ترتبط بالمسامية Usman et al. (2021) ، حيث يزداد الشد السطحي عند انخفاض نسبة الترطيب وهذا بدوره يسبب قلة إذابة المغذيات وتوفر بيئة غير ملائمة لنمو الاعفان بينما ارتفاع نسبة الترطيب يؤدي الى انخفاض نسبة الاوكسجين وتحديد أنتقاله في الوسط لقلّة الفراغات البينية وزيادة التصاق وتكتل جزيئات نخالة الحنطة فضلاً عن محدودية الحيز المتاح لتغلغل خيوط العفن أثناء نموه وبالتالي انخفاض في انتاجية الإنزيم (Wang et al. 2014 ; Luti and Younis (2013) ، أختلفت نتائج هذه الدراسة عن نتائج الباحثين الاخرين ، أذ اختلفت النتائج عما توصل اليه (Othman and Sebo . (2021) بأن أفضل نسبة لمحلول الترطيب في أنتاج البروتيز الحامضي من عفن *Aspergillus niger* هي نسبة ( 1 : 0.75 وزن / حجم ) .



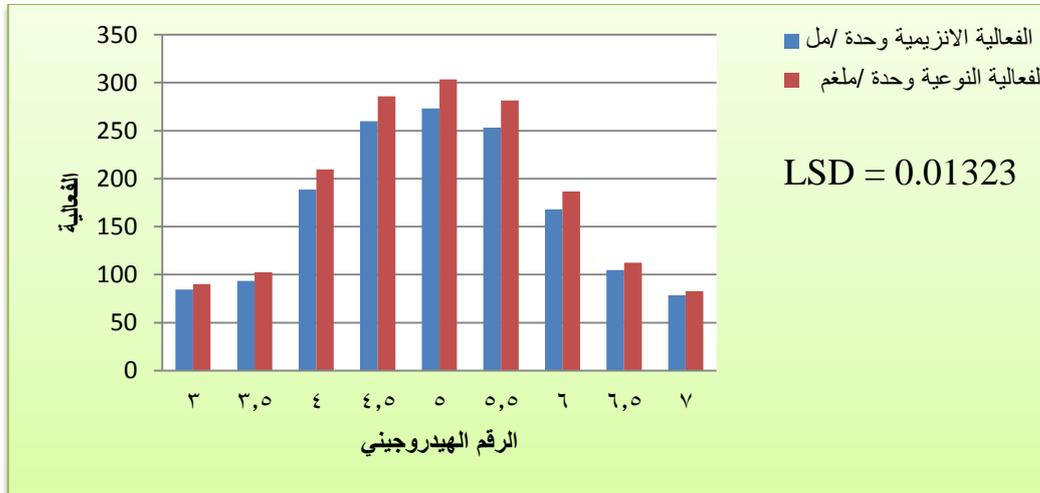
شكل (4 - 9) تحديد أفضل نسبة محلول ترطيب لإنتاج بروتين الاسبارتك من عفن

*Aspergillus terreus* SFH4

### 3.8.4 تحديد أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج الإنزيم

يبين شكل (4 - 10) تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج إنزيم بروتين الاسبارتك من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي وجد أن هناك فروقات معنوية بين الأرقام الهيدروجينية المختلفة عند  $p \leq 0.05$ ، لوحظ إن إنتاجية الإنزيم تزداد بشكل تدريجي بين الأرقام الهيدروجينية الحامضية التي تتراوح من 3 - 5 إلى أن وصلت إلى أعلى إنتاجية عند الرقم الهيدروجيني 5 هو الرقم الأمثل لإنتاج الإنزيم إذ بلغت الفعالية الانزيمية (273.3) وحدة / مل وفعالية نوعية (303.6) وحدة / ملغم ثم تعود لتتخفف بعد ذلك إلى أن تصل إلى أقل مستوى عند الرقم الهيدروجيني 7 بفعالية انزيمية وفعالية نوعية (78.6) وحدة/ مل و (82.7) وحدة /ملغم على التوالي، وقد يعود تأثير الدالة الحامضية على إنتاج الإنزيم من خلال التأثير على صفات الوسط مثل ذائبية مكونات وسط التخمر وانتقالها وتأمين المركبات الحيوية إذ تتغير الحالة الأيونية للمادة الخاضعة وتشكل جسيمات مشحونة قد لا تتطابق مع المواقع الأيونية الفعالة للإنزيم وبالتالي لن يتمكن العفن من الوصول إلى المادة الخاضعة (Othman and Sebo, 2023)، وهذه النتائج تتطابق مع ما توصل إليه Vishwanatha (2009) بأن أعلى إنتاج للإنزيم الحامضي من عفن *Aspergillus oryzae* كانت عند رقم هيدروجيني 5، كذلك مع (Mamo et al. 2020) الذي أنتج إنزيم البروتين الحامضي من عفن

ووجدته (Bensmail et al. 2015) الذي أنتج انزيم البروتيز من عفن *Aspergillus niger* FFB1 عند رقم هيدروجيني 4 .  
عند الرقم الهيدروجيني 5. وأيضا مقارنة لما



شكل ( 4 - 10 ) تحديد أفضل رقم هيدروجيني لإنتاج بروتيز الاسبارتك من عفن

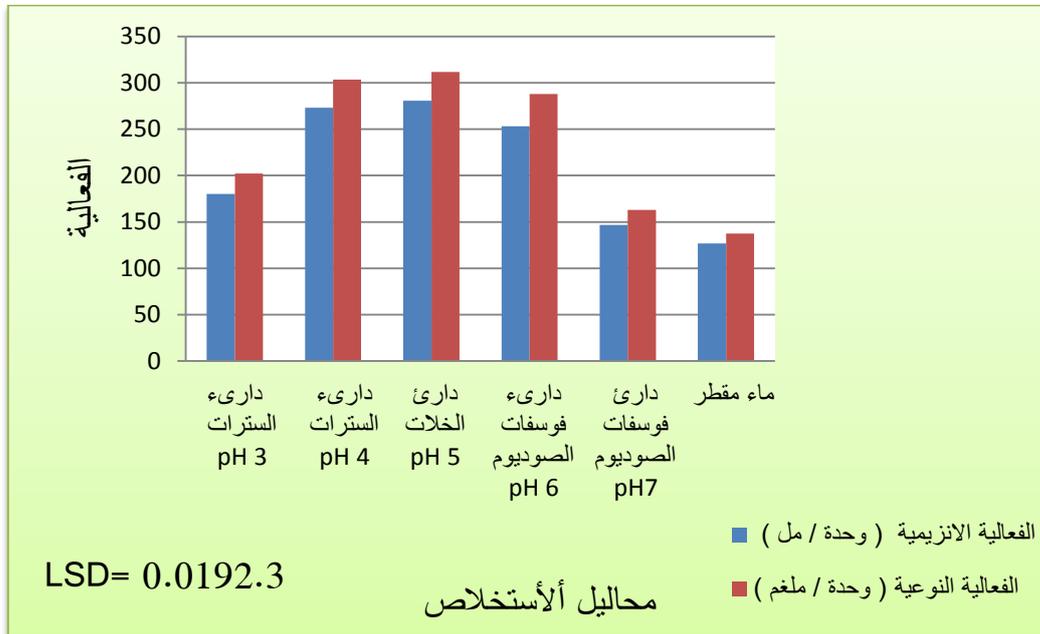
*Aspergillus terreus* SFH4

#### 4.8.4 تحديد أفضل محلول لاستخلاص الإنزيم

درس افضل محلول لأستخلاص انزيم البروتيز من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي لوحظ وجود فروقات معنوية بين محاليل استخلاص الانزيم عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  وتبين ان افضل محلول من بين المحاليل المستخدمة لأستخلاص هو دارىء الخلات اذ بلغت فعالية الانزيمية 280.6 وحدة / مل وبفعالية نوعية 311.7 وحدة / ملغم في حين كانت ادنى فعالية عند استخدام الماء عند اذ بلغت الفعالية الإنزيمية 126.6 وحدة / مل وبفعالية نوعية 137.6 وحدة / ملغم وكما هو موضح في الشكل ( 4 - 11 ) .

ان اختيار محلول الاستخلاص المناسب له أهمية في المحافظة على فعالية الإنزيم وعدم التداخل في طريقة تقديره وذلك من خلال المحافظة على الرقم الهيدروجيني وان اختلاف المحاليل الدارئة في قابليتها على استخلاص الإنزيم يعود إلى القوة الأيونية التي تتميز بها تلك المحاليل وكذلك اختلاف خواص الإنزيمات كنقطة التعادل الكهربائي او الثبات تجاه الارقام الهيدروجينية (Wong et al. , 1974) . لقد اختلفت هذه النتائج مع العديد من الباحثين

ومنهم (Mamo et al., 2020 ; Chimbekujwo et al., 2020) إذ استعملوا الماء المقطر بنسبة (10:1) لاستخلاص إنزيم البروتيز من العزلات DRDFS13 *Aspergillus brasiliensis* BCW2 و *Aspergillus oryzae* على التوالي .



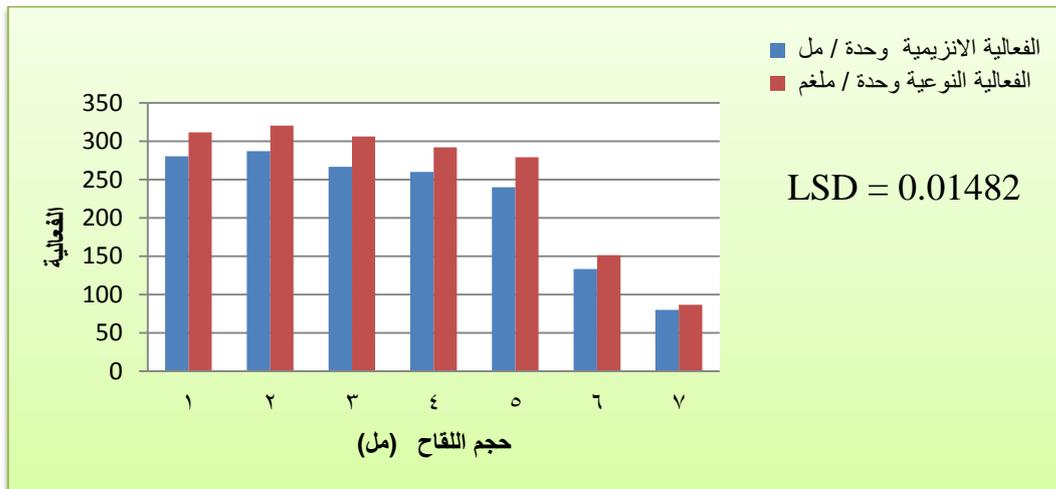
شكل ( 4 - 11 ) تحديد أفضل محلول استخلاص لإنتاج بروتيز الاسبارتك من عفن

*Aspergillus terreus* SFH4

#### 5.8.4 تحديد أفضل حجم لقاح لإنتاج الإنزيم

لوحظ من نتائج التحليل الاحصائي بأن هناك فروقات معنوية بين احجام اللقاح المختلفة عند  $p \leq 0.05$  حيث بين الشكل ( 4 - 12 ) نتائج تلقيح وسط نخالة الحنطة بمستويات مختلفة من حجم اللقاح إذ وصل أقصى إنتاج لإنزيم البروتيز من عفن *Aspergillus terreus* SFH4 عند استخدام حجم لقاح مقداره 2 مل (  $10^6 \times 1$  بوغ / 10 غرام مادة صلبة ) بفعالية إنزيمية ( 287.21 ) وحدة / مل وفعالية نوعية ( 320.54 ) وحدة / ملغم بينما انخفضت إنتاجية الإنزيم الى اقل مستوياته عند استعمال حجم اللقاح مقداره 7 مل إذ بلغت الفعالية الإنزيمية 80 وحدة / مل وفعالية نوعية 86.9 وحدة / ملغم ، إذ إن قلة حجم

اللقاح في الوسط يؤدي إلى قلة إنتاجية الإنزيم بسبب عدم الاستغلال الأمثل لمكونات الوسط مما ينعكس سلباً على فعالية المواد الأيضية ومن ضمنها الإنزيمات ، وعندما تزداد كمية اللقاح يزداد عدد الخلايا التي تفرز أنزيمات محللة للمادة الأساس لغرض الاستفادة من نواتج التحلل لتزويدها بمتطلباتها الحياتية وبذلك تزداد أنتاجية الإنزيم في حين أن زيادة حجم اللقاح عن الحجم الأمثل فإنه يؤدي إلى زيادة المواد الأيضية السامة وانخفاض الأوكسجين المذاب وزيادة المنافسة على العناصر الغذائية وتكتل الخلايا وبالتالي قلة إنتاج الإنزيم ( Palsaniya et al., 2012 ). جاءت هذه النتائج مقارنة لما ذكره (Chimbekujwo et al., 2020). إذ استعمل حجم لقاح 1 مل لأنتاج انزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus brasiliensis* . وايضاً قريبة لما ذكره (Palsaniya et al. (2012) إذ استخدم حجم لقاح 1 مل لأنتاج البروتيز من العزلات المايكروبية .



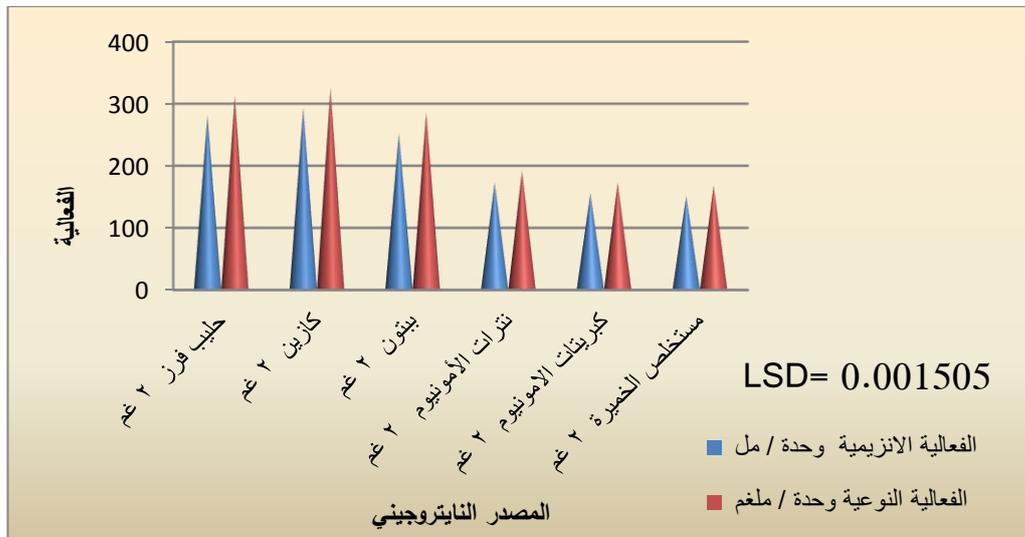
شكل ( 4 - 12 ) تحديد أفضل حجم لقاح لإنتاج بروتيز الاسبارتك من عفن

*Aspergillus terreus* SFH4

#### 6.8.4 تحديد أفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج الإنزيم

درس تأثير تدعيم نخالة الحنطة بالمصادر النتروجينية العضوية وغير العضوية في إنتاج إنزيم بروتيز الاسبارتك من عفن *Aspergillus terreus* SFH4 وكما مبين في شكل ( 4 - 13 ) ومن خلال نتائج التحليل الاحصائي وجد أن هناك فروقات معنوية بين المصادر النتروجينية عند  $p \leq 0.05$  إذ لوحظ إن المصدر النتروجيني العضوي المتمثل بالكازين اعطى اعلى إنتاجية انزيمية والتي بلغت 293.59 وحدة / مل وفعالية نوعية 328.90 وحدة / ملغم في المقابل أنخفضت الإنتاجية وبشكل متفاوت عند استعمال الببتون ونترات الصوديوم وكبريتات الامونيوم ومستخلص الخميرة وفعالية انزيمية (253.3 ,

(168.8 , 173.3 , 192.5 , 287.8 ) وحدة / مل وفعالية نوعية ( 152 , 156 , 173.3 ) وحدة / ملغم وعلى التوالي ، أن وجود المركبات النتروجينية المعقدة في الوسط تعمل على تحفيز إنتاج البروتينات مقارنة مع المصادر النتروجينية البسيطة فهي تعد عاملاً حيوياً لنمو الكائنات الحية وتكوين الانزيمات (Othman and Sebo , 2023) فضلاً عن ذلك فإن ارتفاع إنتاج انزيم البروتيز بأستعمال المصدر النتروجيني العضوي ( الكازين ) يعود الى طبيعة الاحماض الامينية والبيتيدات الناتجة عن عملية تحلل البروتين ( , Medina et al. , 2020). توافقت النتائج مع ما توصل اليه ( Asha et al. (2018 الذي اشار الى ان الكازين هو افضل مصدر نايتروجيني لإنتاج انزيم البروتيز من العزلة البكتيرية *Bacillus cereus* FT من بين المصادر النتروجينية العضوية وغير العضوية وبفعالية انزيمية تصل الى 151 وحدة / مل ، كما وجد ( Othman and Sebo ( 2023 بأن افضل مصدر نايتروجيني لإنتاج انزيم البروتيز من عفن *Aspergillus niger* هو الكازين . في حين اختلفت النتائج مع ما وجدته (Vishwanatha (2009 عند تدعيمه لنخالة الحنطة بمصادر نتروجينية مختلفة شملت طحين الصويا والسهم الخالي من الدهن والكازين والبيتون وبنسب مختلفه تراوحت بين 2 – 10 % ( وزن / وزن ) ، أذ لاحظ أن أعلى إنتاجية للبروتيز الحامضي من عفن *Aspergillus oryzae* كانت عند أستعمال طحين فول الصويا وبنسبة 2 % .

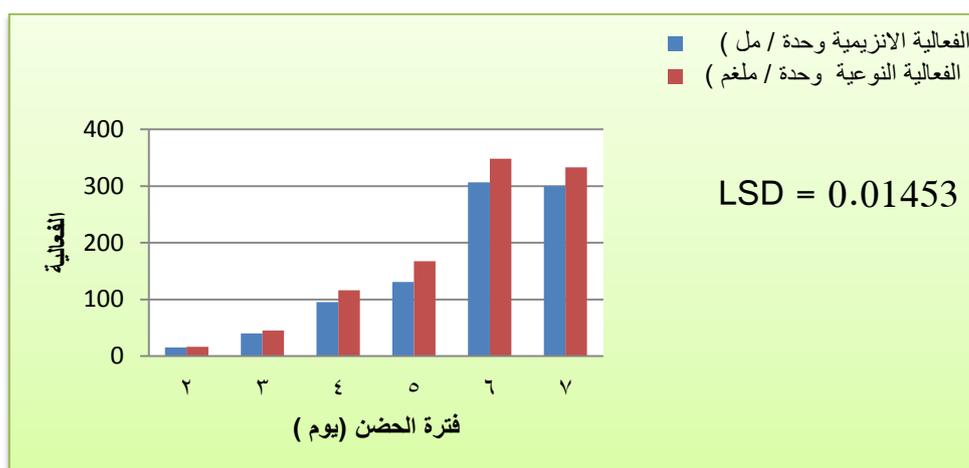


شكل ( 4 – 13 ) تحديد أفضل مصدر نايتروجيني لإنتاج بروتيز الاسبارتك من عفن

*Aspergillus terreus* SFH4

### 7.8.4 تحديد أفضل فترة حضانة لإنتاج الإنزيم

لوحظ من شكل ( 4 - 14 ) ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي ان هناك فروق معنوية بين مدد الحضانة المختلفة عند  $p \leq 0.05$  كما أن أفضل مدة حضانة لإنتاج إنزيم بروتينز الاسبارتك من عزلة *Aspergillus terreus* SFH4 هي 6 ايام اذ بلغت الفعالية الانزيمية 300 وحدة / مل وفعالية نوعية 333.3 وحدة / ملغم كما ان إنتاج الإنزيم بدأ بالارتفاع منذ اليوم الثاني وبشكل تدريجي وفعالية انزيمية حتى وصل أقصاه عند اليوم السادس ثم انخفض في اليوم السابع من الحضانة ، ان سبب هذا الانخفاض قد يعود إلى زيادة نواتج الايض وكذلك نفاذ العناصر الغذائية في الوسط مما يؤدي إلى قلة نمو الاعفان أو قد يحصل الانخفاض نتيجة لحدوث تحلل ذاتي لخيوط العفن والمصحوب بأطلاق أنزيمات داخلية ومواد مختلفة أخرى ربما يكون لها تأثير سلبي على إنتاج الإنزيم أو تحلله وبالتالي انخفاض افراز الإنزيم خارج الخلية (Vishwanatha 2009; Muazu , 2015). جاءت هذه النتائج مقارنة لما ذكره Usman *etal.* (2021) إذ أشار إلى إن أفضل مدة حضانة لإنتاج إنزيم البروتينز ألامضي من الفطريات الخيطية كانت 5 أيام ( 120 ساعة ) وأيضا كانت مقارنة لما اشار اليه Shivakumar ( 2012) من إن أفضل فترة حضانة كانت 5 أيام (120 ساعة) وفعالية إنزيمية 181 وحدة / مل .



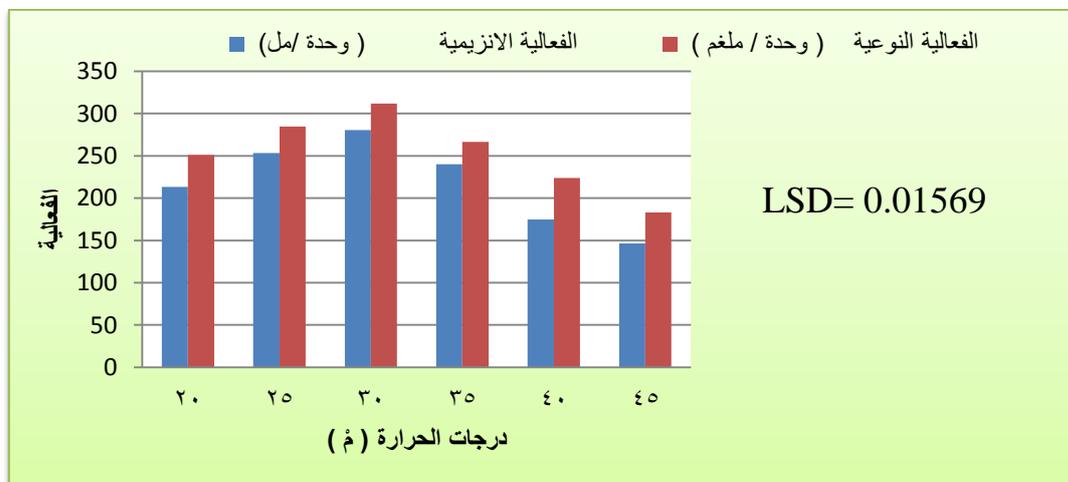
شكل ( 4 - 14 ) تحديد أفضل فترة حضانة لإنتاج بروتينز الاسبارتك من عفن

*Aspergillus terreus* SFH4

### 8.8.4 تحديد أفضل درجة حرارة لإنتاج الإنزيم

يبين الشكل ( 4 - 15 ) تأثير درجات الحرارة المختلفة على إنتاج إنزيم بروتينز الاسبارتك من عفن *Aspergillus terreus* SFH4 ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي

وجد ان هناك فروق معنوية بين درجات الحرارة المختلفة عند  $p \leq 0.05$  إذ ارتفعت الفعالية الانزيمية بشكل تدريجي الى ان وصلت الى درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم (30 م) والتي بلغت عندها الفعالية الإنزيمية 300 وحدة / مل وفعاليتها نوعية 333.3 وحدة /ملغم ومن ثم بدأت الفعالية الأنزيمية بالانخفاض تدريجياً الى ان وصلت الى (146.6) وحدة / مل عند درجات الحرارة (45 م) وفعاليتها نوعية (183.25) وحدة / ملغم على التوالي . ان لدرجات الحرارة تأثير كبير في تحديد نشاط ونمو الفطريات فهي تعد احدى العوامل الضرورية لعمليات الهدم والبناء الحيوي وخاصة في الصناعات التخمرية ، الا ان زيادة درجة الحرارة عن الدرجة الحرارية المثلى يؤدي الى انخفاض إنتاجية الإنزيمات من الإحياء المجهرية وهذا يعود الى ارتفاع حرارة الكتلة المخمرة وجفافها وانخفاض نشاطها المائي *Water activity* مما يقيد التهوية ويقلل العناصر الغذائية وبالتالي قلة نمو الفطريات لعدم ملائمة هذه الدرجة فضلاً عن إن الحرارة العالية قد تسبب تمسخاً للبروتينات وتثبيط الانزيم الناتج (Othman and Sebo , 2023) ، جاءت هذه النتائج مطابقة لما اشار Shivakumar (2012) الى ان درجة الحرارة المثلى لأنتاج انزيم البروتيز الحامضي من *Aspergillus sp.* بلغت 30 م . كما توافقت مع Usman et al. (2021) الذي وجد ان درجة الحرارة المثلى لأنتاج انزيم البروتيز الحامضي المنتج من عفن *Aspergillus spp.* هي 30 م . وكذلك تطابقت مع ما ذكره Bensmail et al. (2015) بأن درجة الحرارة المثلى لأنتاج انزيم البروتيز من عزلة *Aspergillus niger* FFB1 كانت 30 م .



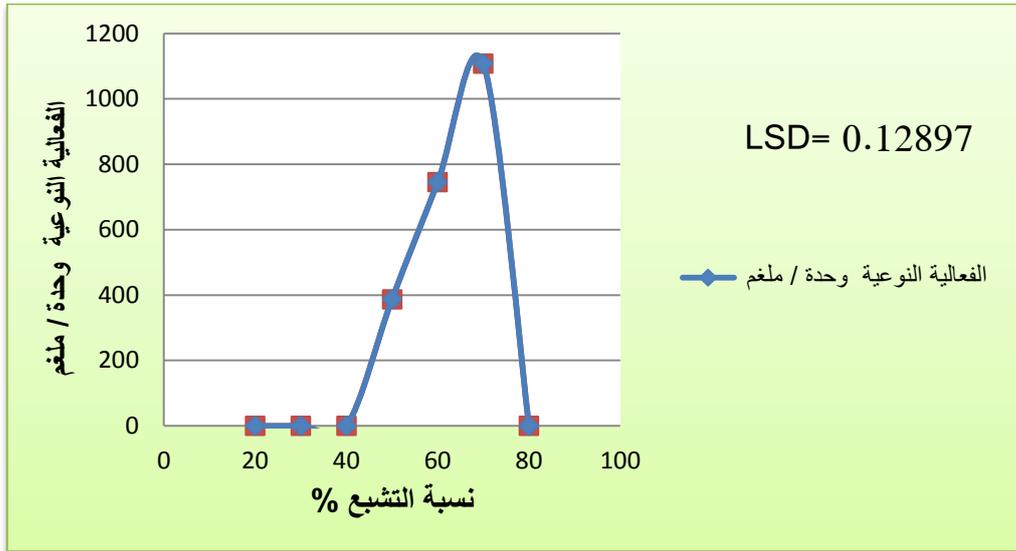
شكل (4 - 15) تحديد أفضل درجة حرارة لإنتاج بروتيز الاسبارتك من عفن

*Aspergillus terreus* SFH4

## 9.4 تنقية أنزيم بروتيز الاسبارتك

### 1.9.4 التركيز بكبريتات الامونيوم

لوحظ في الشكل (4 - 16) ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية بين نسب الاشباع عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  ، إذ أن افضل نسبة اشباع لتركيز المستخلص الخام للأنزيم من 50-70% ، كما لوحظ أنخفاض الفعالية الأنزيمية للمستخلص الأنزيمي في الراشح وارتفاعها في الراسب الناتج إلى إن وصلت أقصى فعالية أنزيمية للأنزيم في الراسب عند نسبة إشباع 70% ، إذ كانت الفعالية الأنزيمية للأنزيم بعد عملية الدبلزة (598) وحدة / مل وفعالية نوعية (1107.7) وحدة / ملغم وأعطت هذه الخطوة حصيلة أنزيمية مقدارها 49.1% وبتنقية جزئية للأنزيم بلغت 3.32 مرة وكما موضح في الجدول (4 - 7) ، أن إضافة أملاح كبريتات الامونيوم الى المستخلص الأنزيمي يؤدي الى التأثير على طبقة الماء المحيطة بجزيئات البروتينات وكذلك معادلة الشحنات الموجودة على سطحها مما يقلل من ذائبية البروتينات ومن ثم تكتلها وبالتالي ترسبها وأن سبب أستعمالها يعود الى المميزات التي تمتلكها منها ذائبيتها العالية وتوفرهما وعدم أضرارهما بالأنزيم White et al., 1973) ، اتفقت هذه الدراسة مع (AO et al. 2018) الذي أستعمل كبريتات الامونيوم لترسيب انزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* وبنسبة اشباع 70% و حصل على فعالية نوعية مقدارها 823.4 وحدة / ملغم وبحصيلة أنزيمية مقدارها 72% وبتنقية جزئية بلغت 3.6 مرة . كما أقتربت من (Purushothaman et al. 2019) عند أستعمال كبريتات الامونيوم لترسيب انزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus niger* وبنسبة اشباع 60% وفعالية نوعية مقدارها 803.2 وحدة / ملغم ، كما تقاربت النتائج مع (Ja'afaru et al. 2020) الذي أستعمل كبريتات الامونيوم لترسيب انزيم البروتيز المنتج من عفن *Fusarium oxysporum* وبنسبة اشباع 30-80% و حصل على فعالية أنزيمية مقدارها 486 وحدة / مل وبحصيلة أنزيمية مقدارها 27% وبتنقية جزئية بلغت 1.9 مرة . كما كانت النتائج متقاربة مع (Tarek et al. 2023) بترسيب انزيم البروتيز المنتج من *Bacillus siamensis* بأستعمال كبريتات الامونيوم (40 - 80%) وفعالية نوعية مقدارها 185.42 وحدة / ملغم .



شكل (4 - 16) تأثير نسب التشبع بكبريتات الامونيوم في تركيز انزيم البروتيز الحامضي المنتج من عفن

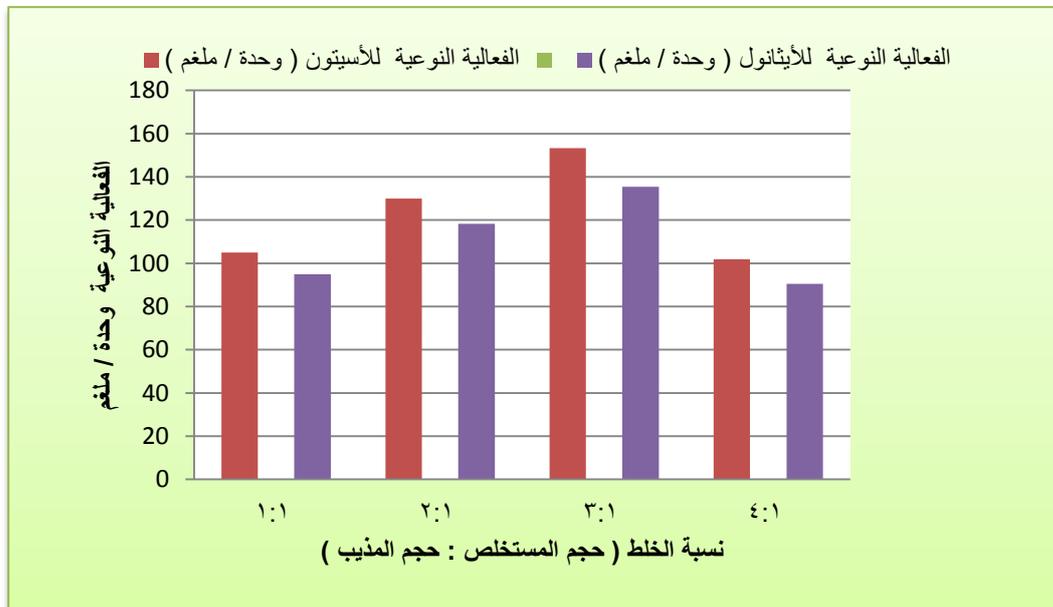
*Aspergillus terreus* SFH4

#### 2.9.4 التركيز بالمذيبات العضوية

يبين الشكل (4 - 17) ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  بأستعمال الايثانول الاسيتون كلاً على حدة وبنسب خلط مختلفة (1:1، 2:1، 3:1، 4:1) ( حجم المستخلص : حجم المذيب ) لترسيب أنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus terreus* SFH4 المعزول محلياً ، أذ لوحظ أن استعمال الاسيتون بنسبة خلط ( 3:1 ) ( حجم المستخلص : حجم المذيب ) أعطى أعلى فعالية أنزيمية بلغت ( 94 ) وحدة / مل وفعاليتها نوعية (153.3) وحدة / ملغم بينما كانت اعلى فعالية أنزيمية عند استعمال الايثانول بنسبة خلط ( 3:1 ) هي ( 84 ) وحدة / مل وفعاليتها نوعية ( 135.4 ) وحدة / ملغم . أن التركيز بالمذيبات العضوية يؤدي الى خفض ثابت العزل الكهربائي للماء مما يؤدي الى زيادة قوة الجذب بين جزيئات البروتين وتكتلها وبالتالي ترسيبها ( Whitake,1972 ) ، وجاءت هذه النتائج متقاربة مع المعيني، ( 2005 ) الذي ركز البروتينات في المستخلص الانزيمي بأستعمال كحول الاسيتون وكانت أفضل نسبة أشباع 66% بفعالية أنزيمية 90 وحدة / مل وفعاليتها نوعية 128.5 وحدة / ملغم . كما اختلفت النتائج مع ( Rocha et al. (2021) الذي أستعمل الاسيتون لترسيب البروتيز الناتج من عفن *Aspergillus sydowii* URM5774 بنسبة اشباع 70% و حصل على فعالية نوعية مقدارها 125 وحدة / ملغم وبخصيلة أنزيمية مقدارها 93 % وبتنقية جزئية بلغت 211 مرة . وكذلك اختلفت مع ( Thakur et al. (2018) عند أستخدام

الايثانول لتركيز انزيم البروتيز الناتج من جنس *Bacillus sp.* بنسبة اشباع 70% و بفعالية نوعية مقدارها 3651.5 وحدة / ملغم وحصيلة أنزيمية مقدارها 17 % وبتنقية جزئية بلغت 4.3 مرة .

تبين مما تقدم ان الفعالية الانزيمية عند التركيز بأستعمال الكحول تكون منخفضة جداً مقارنةً بالفعالية الانزيمية عند التركيز باستعمال كبريتات الامونيوم والتي بلغت (1107.7) وحدة / ملغم وحصيلة أنزيمية مقدارها 49.1 % وبتنقية جزئية للأنزيم بلغت 3.32 مرة . لذلك اعتمد التركيز بكبريتات الامونيوم كأول خطوة من خطوات تنقية انزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus terreus* SFH4 لما يتميز به هذا الملح من مميزات مهمة منها عدم الاضرار بالأنزيم المنقى وكذلك الذائبية العالية له في الماء . (Volesky et al. ,1984)

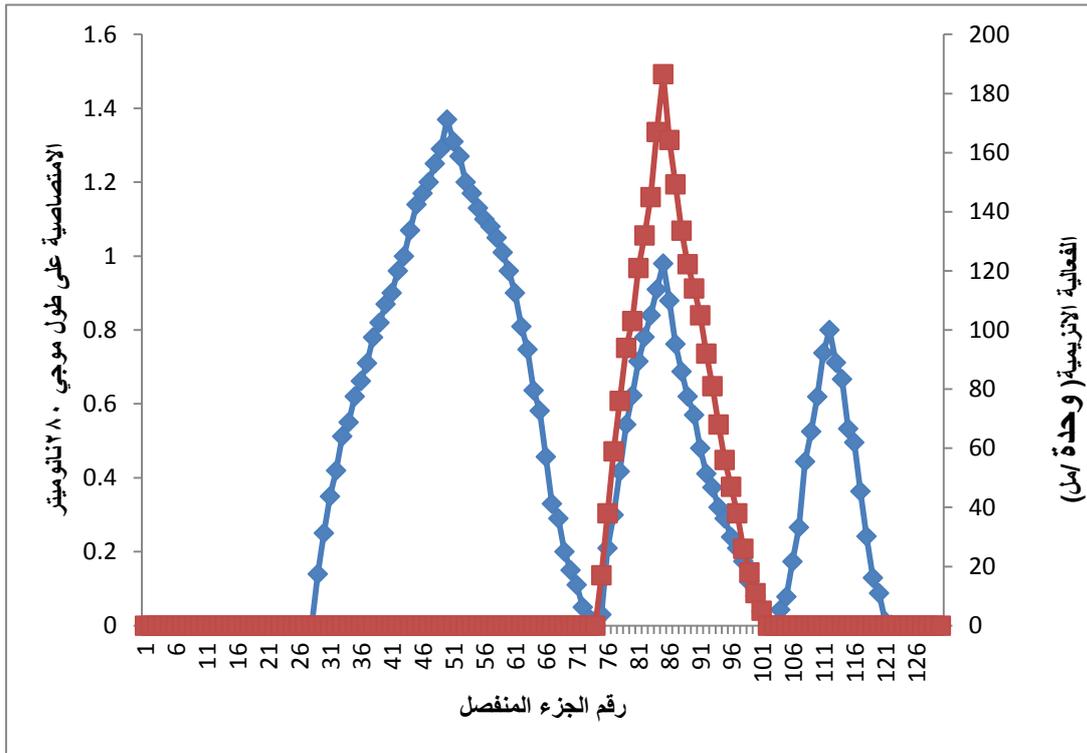


شكل ( 4 - 17 ) تأثير انواع ونسب المذيبات العضوية في تركيز انزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus terreus* SFH4

#### 3.9.4 تنقية الأنزيم بأستعمال كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

بعد عملية التركيز بكبريتات الامونيوم وعملية التنافذ الغشائي ( الديليزة ) ولغرض الحصول على مستخلص أنزيمي نقي ، أجريت خطوة الترشيح الهلامي على عمود

Sephadex G-100 ، أذ أظهرت النتائج المبينة في شكل ( 4 – 18 ) ومن خلال قياس الامتصاصية على طول موجي 280 نانومتر ان اجزاء الاسترداد تضمنت ثلاث قمم بروتينية للمستخلص الإنزيمي ، وبعد قياس الفعالية الإنزيمية للقمم الثلاث ظهرت فعالية أنزيم بروتين الاسبارتك في القمة الثانية بمقدار 186.6 وحدة / مل وبحاصل أنزيمي بلغ (21.56 % ) وبعدد مرات تنقية (13.99) مرة في حين لم تظهر أي فعالية أنزيمية في القمم الأخرى ( الأولى والثالثة) لذلك أختيرت القمة الثانية لإكمال خطوات الدراسة اللاحقة .



شكل ( 4 – 18 ) كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي لمستخلص أنزيم بروتين الاسبارتك المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 بأستعمال عمود Sephadex G-100 بأبعاد ( 2.5 × 86 ) الموازن بمحلول دارئ فوسفات الصوديوم بتركيز 0.2 مولاري وبرقم هيدروجيني 7 وبمعدل جريان 20 مل / ساعة

أنفقت نتائج هذه الدراسة مع Li et al. (2014) بأستعمال خطوة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-75 لتنقية أنزيم البروتين المنتج من عفن *Aspergillus niger* و *Aspergillus oryzae* بفعالية نوعية مقدارها 4015 وحدة / ملغم وبحصيلة أنزيمية مقدارها 33.56 % وبعدد مرات تنقية بلغت 17.09 مرة ،

ومشابهة لما قام به ( Ja'afaru et al. (2020 عند استخدامه لكبريتات الامونيوم لترسيب انزيم البروتيز المنتج من عفن *Fusarium oxysporum* ومن ثم اجري عملية الديلزة وبعدها أستعمل خطوة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-200 ليحصل على بروتيز منقى بفعالية أنزيمية مقدارها 432 وحدة / مل وبحصيلة أنزيمية مقدارها 24 % وبتنقية جزئية بلغت 5.1 مرة ، أيضاً مع ( Rocha et al. (2021 بأستعمال خطوة الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G-75 لتنقية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus sydowii* URM5774 بفعالية نوعية مقدارها 352 وحدة / ملغم وبحصيلة أنزيمية مقدارها 51 % وبتنقية جزئية بلغت 5.94 مرة .

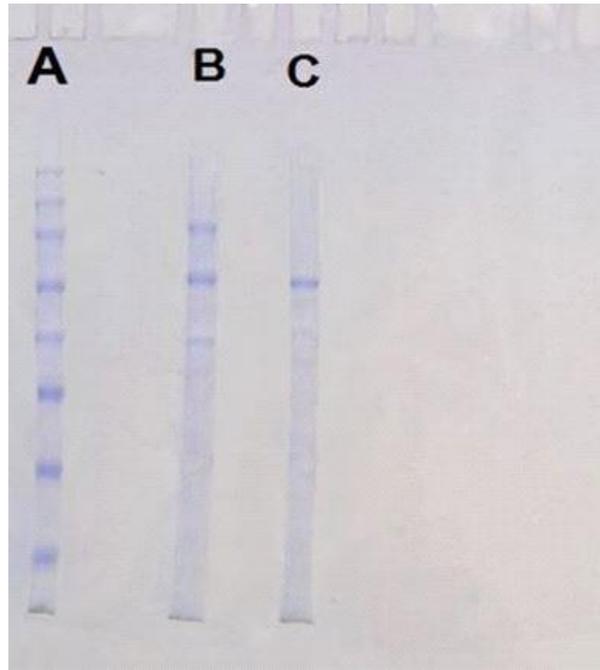
الجدول ( 4 - 7 ) خطوات تنقية الأنزيم المنتج من عفن *Aspergillus terreus* SFH4

خطوة التنقية	الحجم ( مل )	الفعالية الانزيمية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم)	الفعالية الكلية	عدد مرات التنقية	الحصيلة %
المستخلص الخام	150	300	0.90	333.3	45000	1	100
التركيز بكبريتات الامونيوم بنسبة اشباع 50- 70 % والتنافذ الغشائي	37	598	0.54	1107.4	22126	3.32	49.1
الترشيح الهلامي G-100	52	186.6	0.04	4665	9703.2	13.99	21.56

#### 10.4 تعيين نقاوة الإنزيم

بعد أكمل خطوات التنقية وقبل الدخول في خطوات توصيف الإنزيم يجب التأكد من نقاوة الإنزيم باستعمال طريقة الترحيل الكهربائي electrophoresis كما في الشكل ( 4 - 19 ) الذي يبين الحزم البروتينية الخاصة بالأنزيم المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 في هلام متعدد الاكريل أمايد ، أذ يمثل الهلام ( A ) حركة المستخلص الانزيمي الخام الذي ظهرت فيه 8 حزم بروتينية ، أما الهلام ( B ) فإنه يمثل حركة الانزيم

المنقى جزئياً والذي ظهرت فيه ثلاثة حزم بروتينية ، في حين أن الهلام ( C ) ظهر بشكل حزمة بروتينية واحدة والذي يمثل الانزيم المنقى بعد عملية الترشيح الهلامي بأستعمال عمود Sephadex G-100 وهذا ما يؤكد على التخلص من كل البروتينات المرافقة للإنزيم في المستخلص الأنزيمي والحصول على الإنزيم بشكل مفرد ونقي ، ان وجود البروتينات في المستخلص الأنزيمي يعطي نتائج غير دقيقة عند توصيف الإنزيم لذلك فإن ظهور الحزمة البروتينية الواحدة يكون مؤشراً على نقاوة الإنزيم ( Segal , 1976 ) .



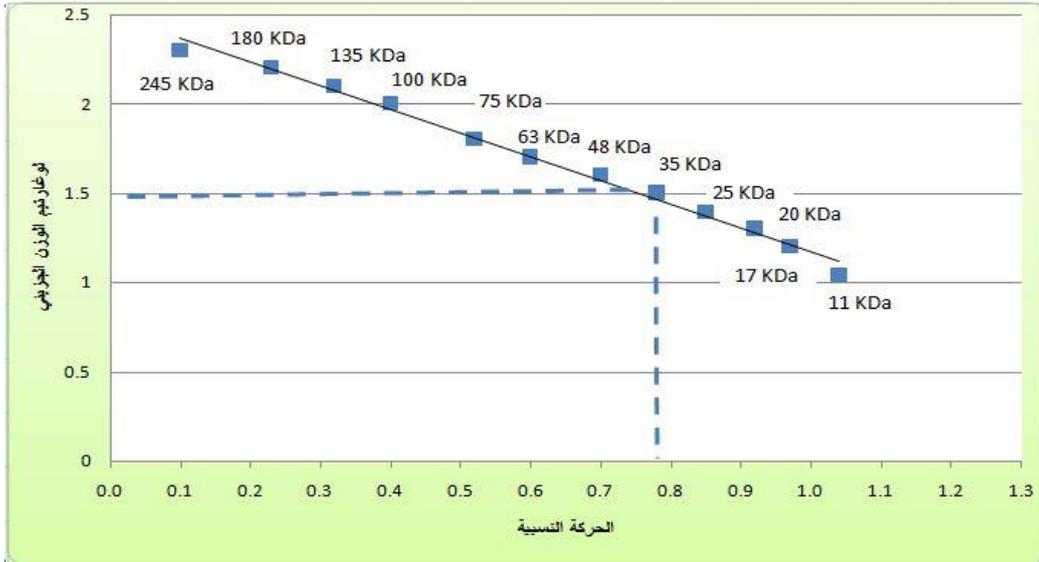
الشكل (4-19) الترحيل الكهربائي للإنزيم المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 تمثل A : المستخلص الأنزيمي الخام ، B : الأنزيم المنقى جزئياً بعد عملية الترسيب والديليزة ، C : الأنزيم المنقى بعد عملية الترشيح الهلامي

## 11.4 توصيف أنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus terreus* SFH4

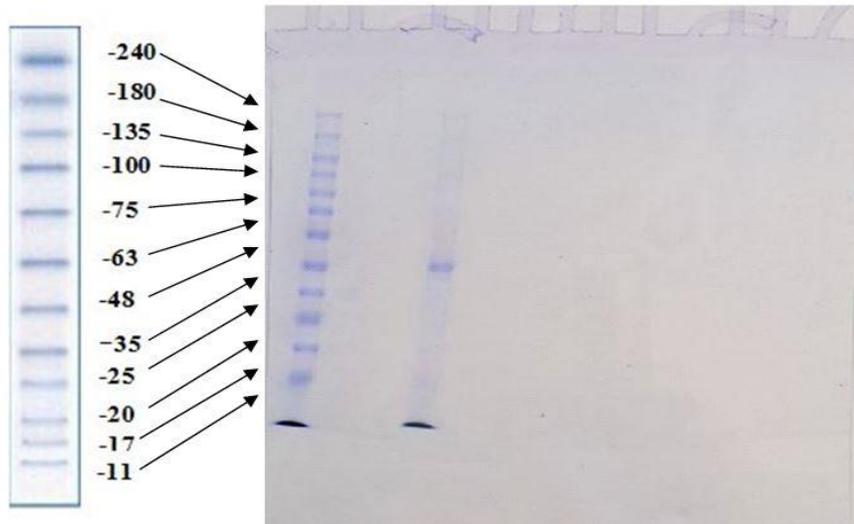
### 1.11.4 تقدير الوزن الجزيئي

استعملت طريقة الترحيل الكهربائي Electrophoresis لتقدير الوزن الجزيئي للإنزيم المنقى بأستعمال متعدد الاكريل أمايد Polyacrylamide وبوجود المواد الماسخة Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) وذلك

باستعمال Marker جاهز يتكون من بروتينات قياسية ذات اوزان جزيئية معلومة . يوضح الشكل (4- 20) العلاقة بين الحركة النسبية للبروتينات القياسية وبين لوغاريتم الوزن الجزيئي لغرض حساب الوزن الجزيئي ، أذ لوحظ ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 هو (35) كيلودالتون كما موضح في الشكل (4- 21) ، وهو يقع ضمن مدى الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك الذي يتراوح من 30 – 45 كيلو دالتون ( Mamo and Assefa , 2018) . وقد جاءت هذه الدراسة مقارنة مع ما ذكره (Kumar et al., 2005) ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* هو 34 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis ، كما تطابقت النتائج مع (Yadav 2011) ان الوزن الجزيئي للبروتين المستخلص من نبات *Euphorbia neriifolia* Linn 35.24 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis وبوجود المادة الماسخة SDS – PAGE . وكانت النتائج مقارنة أيضاً مع ما اشار (Hsiao et al. 2014) الى ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* يساوي (39) كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis وبوجود المادة الماسخة SDS – PAGE . وأختلفت مع (Ao et al. 2018) من ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* Y1 هو 45 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis . كما كانت النتائج مقارنة مع ما ذكره (da Silva et al. 2020) ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Rhizopus microspores* يساوي (36) كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis وبوجود المادة الماسخة SDS – PAGE . ووجد (Mamo et al. 2020) ان الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 يساوي (40) كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis وبوجود المادة الماسخة SDS ، وبين (Karray et al. 2021) الى ان الوزن الجزيئي للبروتين المنتج من بكتريا *Bacillus stearothermophilus* هو 28 كيلودالتون بأستعمال تقنية الترحيل الكهربائي Electrophoresis . كما أشار (Xue et al. 2024) أن الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Trichoderma asperellum* يساوي 36 كيلو دالتون .



شكل ( 20-4 ) المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4



شكل ( 21-4 ) تقدير الوزن الجزيئي لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4

#### 2.11.4 الرقم الهيدروجيني الأمثل لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً

درس تأثير الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 وبمدى من الأرقام الهيدروجينية تراوحت بين (3 - 8) ، ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي لوحظ وجود فروق معنوية بين الأرقام الهيدروجينية للأنزيم عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  ، إذ أظهرت النتائج من خلال الأشكال (4 - 22) و (4 - 23) ان الفعالية الانزيمية ارتفعت كلما ازدادت قيمة الرقم الهيدروجيني في وسط التفاعل من (3 - 5) وبلغت أعلى فعالية أنزيمية عند الرقم الهيدروجيني (5) والذي يمثل الرقم الهيدروجيني الأمثل لأنزيم بروتيز الاسبارتك ، إذ وصلت الفعالية الانزيمية (298) وحدة / مل للأنزيم المنقى كلياً وبلغت (608) وحدة / مل للأنزيم المنقى جزئياً . ويعود سبب ارتفاع الفعالية الانزيمية عند الرقم الهيدروجيني الأمثل هو أن الحالة الايونية لمكونات وسط التفاعل بما فيها الاحماض الامينية الموجودة في الموقع الفعال تكون أفضل مايمكن لتكوين معقد الانزيم والمادة الاساس (Nielsen et al., 2001) ، كما لوحظ أن الفعالية الانزيمية أخذت بالانخفاض كلما أبعدت قيمة الرقم الهيدروجيني عن الرقم الهيدروجيني الأمثل سواءً بالاتجاه القاعدي أو الحامضي ويعود سبب هذا الانخفاض الى حدوث تغير في الحالة الايونية لمعقد الانزيم والمادة الاساس أو معقد الانزيم ونواتج التفاعل او حدوث تغير للمجاميع القابلة للتأين في الموقع الفعال او حدوث تغير في المادة الخاضعة (Whitake, 1972) .

جاءت النتائج مطابقة لما ذكره Correia et al. (2023) ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus sp.* كان 5 ، هذه النتائج تطابقت مع Mamo et al. (2020) الذي أشار الى ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 كان 5 . وكذلك مع Ja'afaru et al. (2020) من أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Fusarium oxysporum* كان 5 ، وكانت النتائج متقاربة مع ما ذكره da Silva et al. (2020) ان الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Rhizopus microsporus* كان 5.5 ، كما اختلفت النتائج مع ذكره (Hsiao et

al. (2014) الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Rhizopus oryzae* كان (3.4) ، وكذلك مع Purushothaman et al. (2019) الذي أشار الى ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus niger* كان 4 ، وكذلك أختلفت النتائج الى ما اشار اليه ( Wei et al. ( 2023 ) من ان الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus niger* كان 3 .



شكل ( 22-4 ) الرقم الهيدروجيني الامثل لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى كلياً المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4

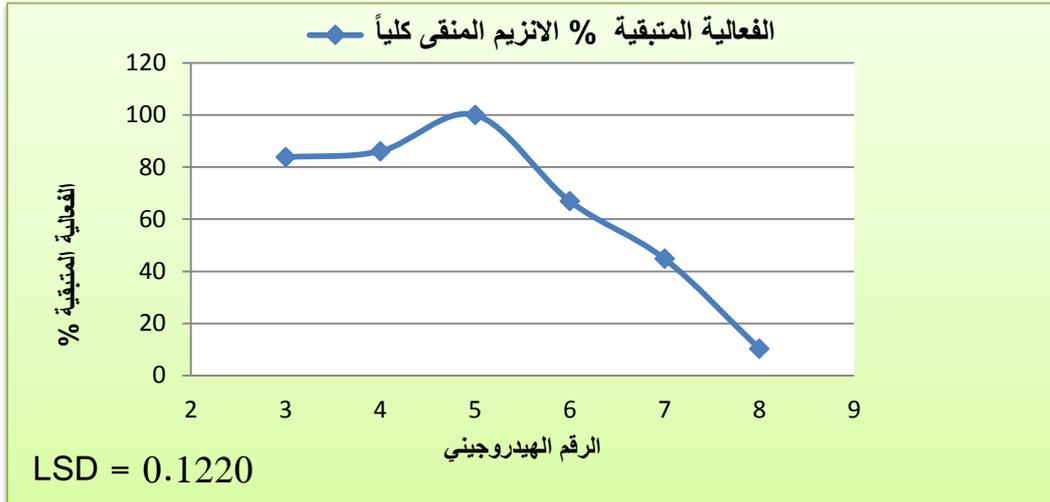


شكل ( 23-4 ) الرقم الهيدروجيني الامثل لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4

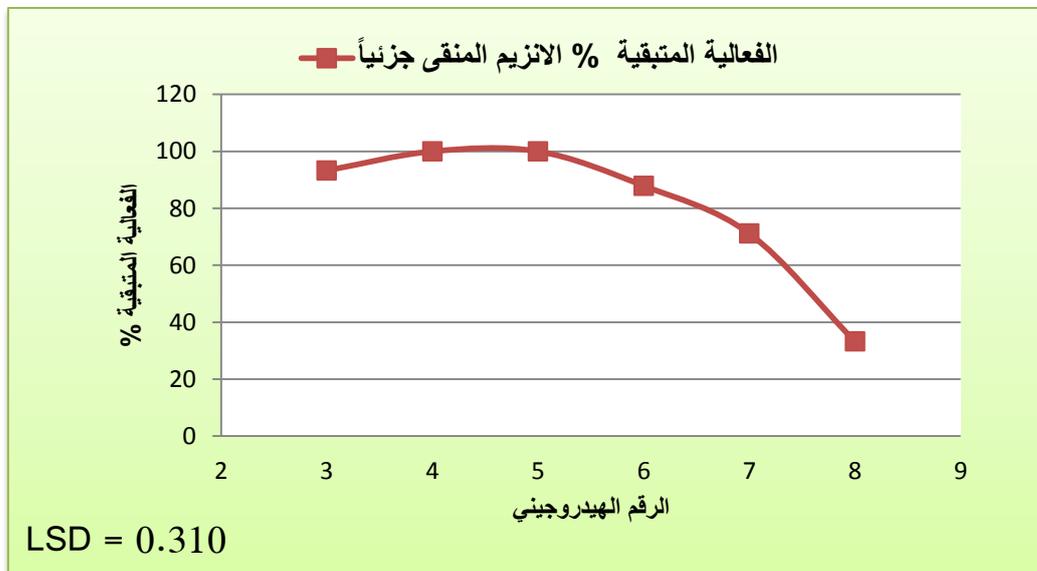
### 3.11.4 الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات أنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً

بينت النتائج في شكل ( 4- 24 ) وشكل ( 4- 25 ) ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين الارقام الهيدروجينية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  ، إذ أن أنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 أظهر ثباتاً عند الرقم الهيدروجيني (4-5) للأنزيم المنقى جزئياً وعند الرقم الهيدروجيني (5) للأنزيم المنقى كلياً لأحتفاضها بفعاليتها بنسبة 100 % عند حضانها بدرجة حرارة 35 م° ولمدة 30 دقيقة بينما أحتفظ الأنزيم المنقى كلياً من فعاليته بنسبة ( 83.8 , 86.1 , 66.9 , 44.8 , 10.3 )% عند الارقام الهيدروجينية ( 3 , 4 , 6 , 7 , 8 ) ، على التوالي بينما أحتفظ الأنزيم المنقى جزئياً من فعاليته بنسبة ( 93.3 , 87.9 , 71.1 , 33.18 )% عند الارقام الهيدروجينية ( 3 , 6 , 7 , 8 ) على التوالي . أن سبب انخفاض ثباتية الأنزيم قد يكون بسبب مسخ جزيئة الأنزيم نتيجة لتغير الشحنات في السلاسل الجانبية للأنزيم وبالتالي تغير في تركيب الأنزيم الثلاثي مما يؤدي الى تغير في الموقع الفعال وأنخفاض الفعالية الانزيمية ( Segal, 1976 ) .

كانت النتائج متقاربة مع ما ذكره ( Wei et al. ( 2023 ) ان ثباتية فعالية انزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus niger* في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 2- 5 ) ، كذلك مع ما أشار اليه ( Guo et al. ( 2021 ) ان ثباتية إنزيم البروتيز المنتج من عزلة *Penicillium sp. XT7* كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 3-6 ) ، كما كانت متقاربة أيضاً مع ما ذكره ( Chimbekujwo et al. ( 2020 ) من ان ثباتية إنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2 كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 4- 6 ) ، وكذلك أيضاً مع ما أشار اليه ( Mamo et al. ( 2020 ) من ان ثبات فعالية الأنزيم المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 كانت في رقم هيدروجيني يتراوح بين ( 4.5- 6.5 ) .



شكل ( 4-24 ) الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات أنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى كلياً المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH



شكل ( 4-25 ) الرقم الهيدروجيني الامثل لثبات أنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4

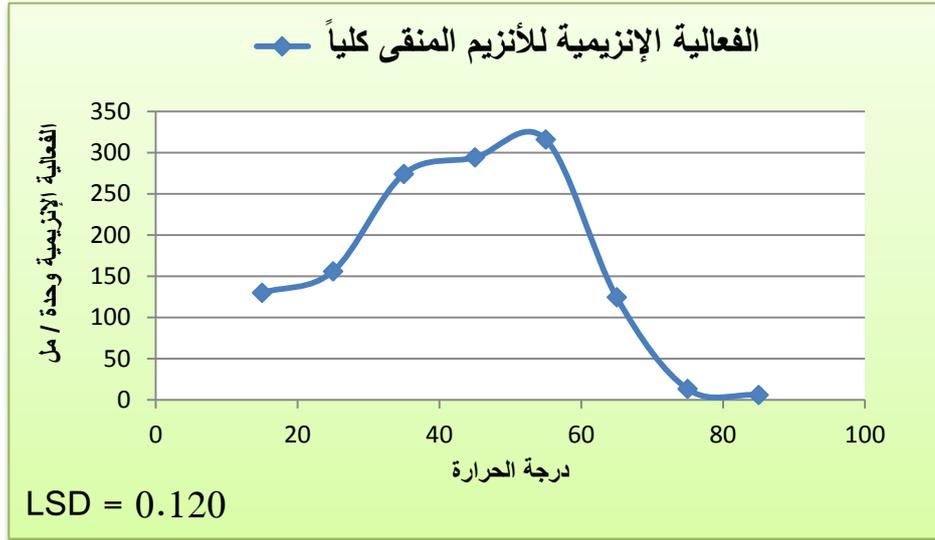
#### 4.11.4 تعيين درجة الحرارة المثلى لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً

درس تأثير درجات الحرارة في فعالية أنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 وبمدى من درجات

الحرارة تراوحت بين ( 15-85 ) م° وعند رقم هيدروجيني ( 5 ) ، ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي لوحظ وجود فروقات معنوية بين درجات الحرارة المختلفة للأنزيم عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  ، إذ لوحظ أزيد الفعالية الانزيمية مع ارتفاع درجات الحرارة حتى وصلت أقصاها عند درجة حرارة ( 55 ) م° والتي بلغت عندها الفعالية الانزيمية ( 316 ) وحدة / مل للأنزيم المنقى كلياً كما في الشكل ( 4-26 ) وبلغت ( 624 ) وحدة / مل للأنزيم المنقى جزئياً كما في الشكل ( 4-27 ) وهذه تمثل درجة الحرارة المثلى للأنزيم المنقى كلياً والمنقى جزئياً ، ثم أخذت الفعالية الانزيمية بالانخفاض كلما ارتفعت درجة الحرارة وأبتعدت عن درجة الحرارة المثلى إذ وصلت الفعالية الانزيمية الى ( 10، 22.6 ) وحدة / مل عند درجة حرارة ( 85 ) م° للأنزيم المنقى كلياً والمنقى جزئياً على التوالي .

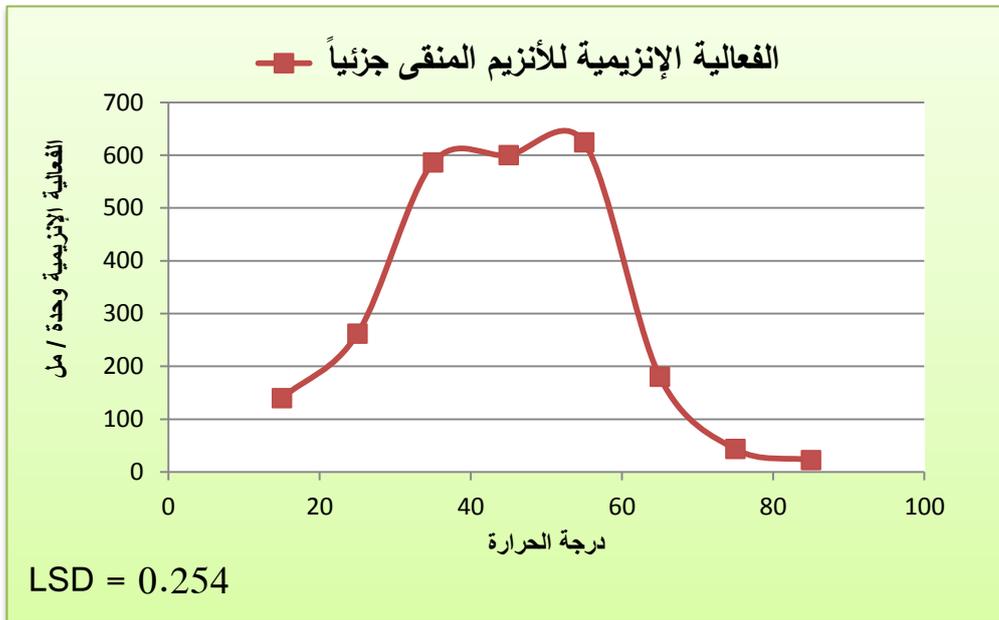
أن ارتفاع درجات الحرارة يؤدي الى حصول تغير في مكونات التفاعل التي تتكون من المادة الاساس والانزيم بسبب زيادة التصادم بين جزيئات المواد المتفاعلة نتيجة لزيادة الطاقة الحركية بفعل تأثير درجات الحرارة وبالتالي ارتفاع الفعالية الانزيمية ، ولكن مع ارتفاع درجات الحرارة عن درجة الحرارة المثلى سوف يفقد الانزيم قدرته بالأحتفاظ بفعاليتها الانزيمية نتيجة لكسر الاواصر الهيدروجينية مما يؤدي الى تحطيم التركيب الثلاثي للأنزيم وفقدانه لخواصه الطبيعية ( Segal, 1976 ) .

جاءت هذه الدراسة متطابقة مع ما ذكره ( Sampaio et al. (2011) عند دراسته تأثير درجة الحرارة على الأنزيم البروتيني الحامضي المنقى والمنتج من عفن *Aspergillus clavatus* عند مدى واسع من درجات الحرارة تراوحت بين ( 20-65 ) م° ان درجة الحرارة المثلى للأنزيم البروتيني هو ( 55 ) م° . كما توافقت مع ما وجدته ( Souza et al. (2017 عند توصيف البروتين الحامضي المنتج من عفن *Aspergillus foetidus* ان درجة الحرارة المثلى للأنزيم البروتيني هو ( 55 ) م° ، وتطابقت النتائج مع ( Ao et al. (2019) من أن درجة الحرارة المثلى للأنزيم بروتيني الاسبارتك المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* كانت 55 م° ، وتشابهت النتائج مع ( Tarek et al. ( 2023 ) الذي اوضح بأن درجة الحرارة المثلى للأنزيم البروتيني المنتج من بكتريا *Bacillus siamensis* كانت 55 م° .



شكل ( 4-26 ) درجة الحرارة المثلى لأنزيم بروتينز الاسبارتيك المنقى كلياً المنتج من العزلة المحلية لعفن

*Aspergillus terreus* SFH4



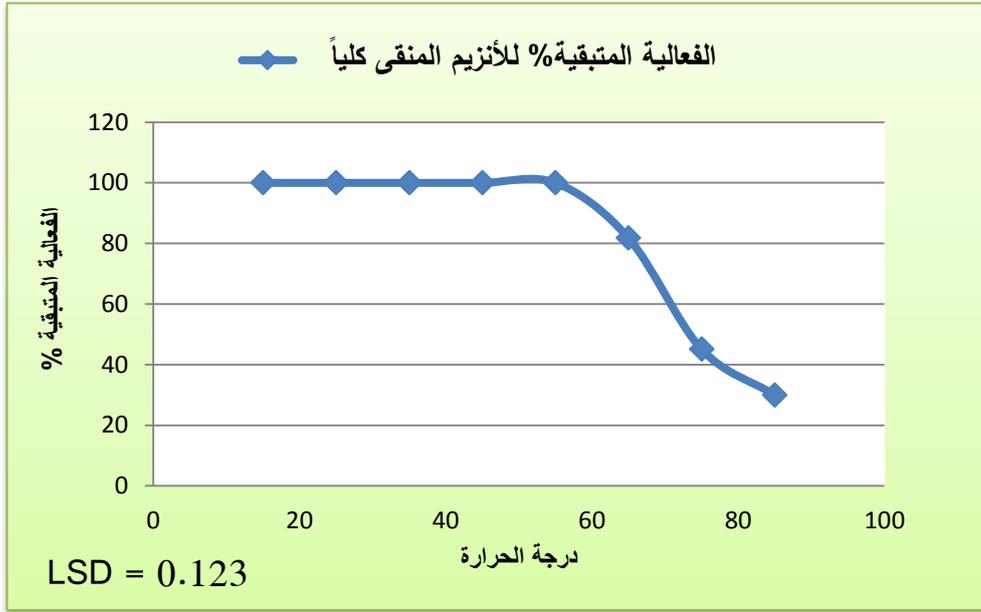
شكل ( 4-27 ) درجة الحرارة المثلى لأنزيم بروتينز الاسبارتيك المنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن

*Aspergillus terreus* SFH4

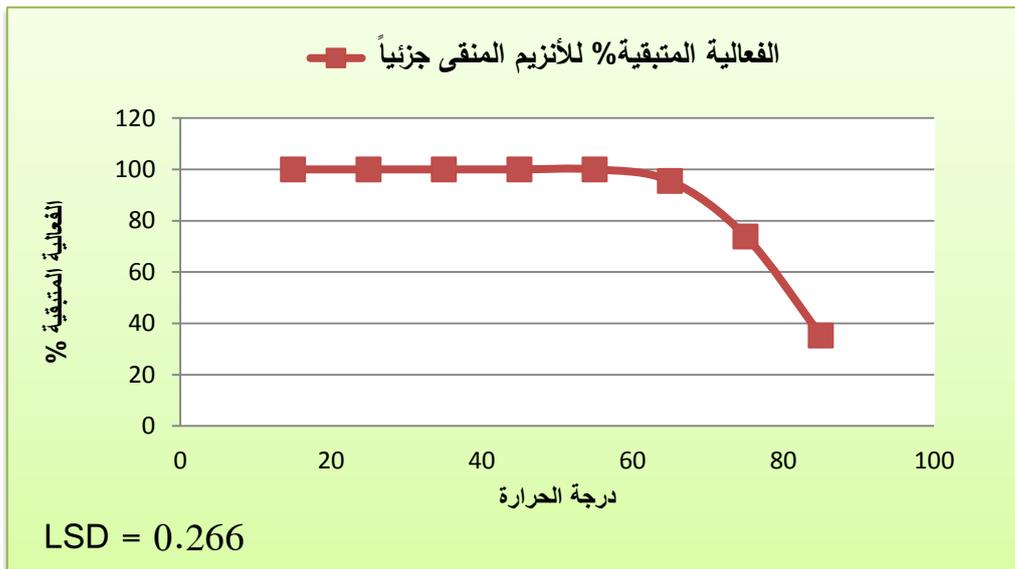
#### 5.11.4 تعيين الثبات الحراري لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والمنقى جزئياً

أظهرت نتائج حضن أنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى كلياً والانزيم المنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 عند درجات حرارية تراوحت بين ( 15 – 85 ) م° ولمدة 30 دقيقة ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية بين درجات حرارة حضن الانزيم عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  ، أذ احتفظ الانزيم بكامل فعاليته عند درجات حرارة تراوحت بين ( 15 – 55 ) م° ومن ثم أنخفضت الفعالية الانزيمية تدريجياً وفقد الانزيم المنقى كلياً من فعاليته ( 18 ، 55 ، 70 ) % عند درجات الحرارة ( 65 ، 75 ، 85 ) م° على التوالي بينما فقد الانزيم المنقى جزئياً من فعاليته ( 5 ، 29 ، 67 ) % عند درجات الحرارة ( 65 ، 75 ، 85 ) م° على التوالي كما في الشكل ( 4- 28 ) والشكل ( 4- 29 ) . أن لدرجات الحرارة العالية تأثير على التركيب الثلاثي للأنزيم أذ تعمل على تكسير الاواصر الهيدروجينية مما يؤدي الى أنفتاح السلاسل متعددة الببتيد وفقدان فعالية الانزيم (Whitaker,1972) كما ان الانزيم المنقى جزئياً يكون اكثر ثباتاً ومقاومة لأرتفاع درجات الحرارة من الانزيم المنقى كلياً بسبب حمايته بالمواد الاخرى الموجودة معه (Segal, 1976).

جاءت النتائج مقارنة لما ذكره (Sampaio et al. (2011) عند دراسته لتأثير درجة الحرارة على الأنزيم الحامضي المنقى والمنتج من عفن *Aspergillus clavatus* عند مدى واسع من درجات الحرارة تراوحت بين (20-65) م° بان ثباتية الانزيم كانت عند مدى واسع من درجات الحرارة تتراوح بين (30-60) م° ، كذلك لاحظ ( Souza et al. (2017 عند توصيفه البروتيز الحامضي المنتج من عفن *Aspergillus foetidus* ان الانزيم أظهر ثباتاً واضحاً عند مدى من درجات الحرارة تراوحت بين (30-60) م° ، كما كانت مشابهة لما ذكره ( Wei et al. ( 2023 ) من ان أنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus niger* احتفظ بنسبة 81% من فعاليته عند درجة حرارة 60 م° ، بالمقابل لم يظهر اي نشاطاً عند درجة حرارة 65 م° في حين أن الانزيم كان ثابتاً عند درجة حرارة 30- 50 م° لمدة 3 ساعات، بينما انخفض نشاطه بشكل ملحوظ عند تجاوز درجة الحرارة 50 م° ، حتى توقف تماماً بعد مرور 10 دقائق من الحضن بدرجة 60 م° .



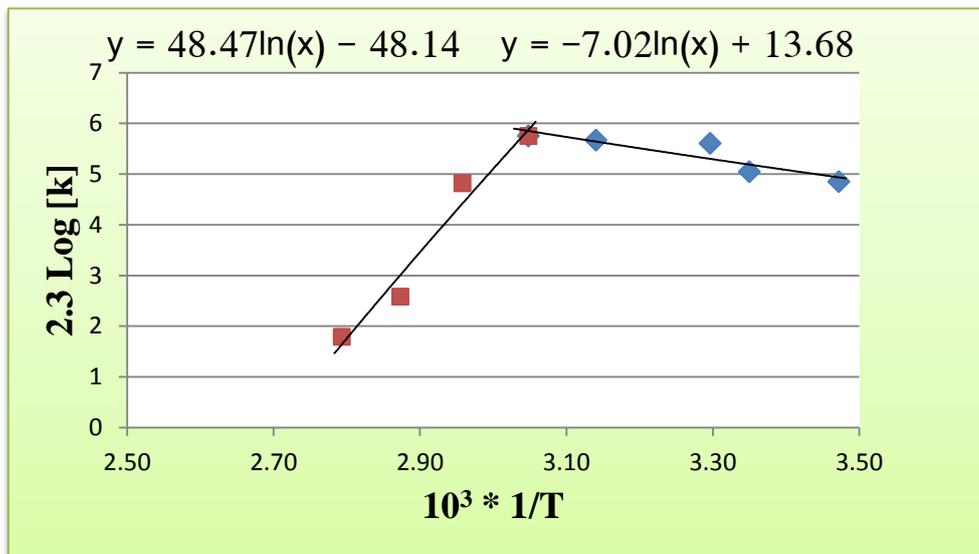
شكل ( 4- 28 ) الثبات الحراري لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى كلياً المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4



شكل ( 4- 29 ) الثبات الحراري لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى جزئياً المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4

## 6.11.4 طاقة التنشيط

بين شكل (4 - 30) العلاقة بين مقلوب درجات الحرارة المطلقة وسرعة تفاعل أنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 وفقاً لمعادلة أرينوس ( Arrhinose Equation ) ، أذ وصلت طاقة التنشيط اللازمة لتحويل المادة الاساس الى نواتج ( 13.89 ) كيلو سرعة / مول ، وهذه القيمة تقع ضمن المدى المعروف لقيم طاقة التنشيط ( Ea ) والتي تتراوح بين ( 6 – 15 ) كيلو سرعة / مول ، أما قيمة مسخ أنزيم بروتيز الاسبارتك كانت ( 95.97 ) كيلو سرعة / مول وهذه القيمة تدل على ثبات الانزيم تجاه الحرارة ، فكلما أرتفعت قيمة طاقة مسخ الانزيم كلما كان الانزيم ثابتاً تجاه درجات الحرارة العالية أذ أن قيمة طاقة مسخ الانزيم تتراوح بين ( 40 – 150 ) كيلو سرعة / مول ( Whitaker, 1972 ) ، كانت النتائج مخالفة لما ذكره ( Yin et al ( 2013 ) من أن طاقة التنشيط للبروتيز الحامضي المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* BCRC بلغت 8.12 كيلو سرعة / مول وأن قيمة طاقة مسخ الانزيم بلغت 37.5 كيلو سرعة / مول . كما اختلفت النتائج مع ما وجدته ( Li et al. ( 2014 ) من أن طاقة التنشيط للبروتيز الحامضي المنتج من الاعفان *Aspergillus oryzae* و *Aspergillus niger* بلغت ( 64.11 , 64.61 ) كيلو سرعة / مول على التوالي .

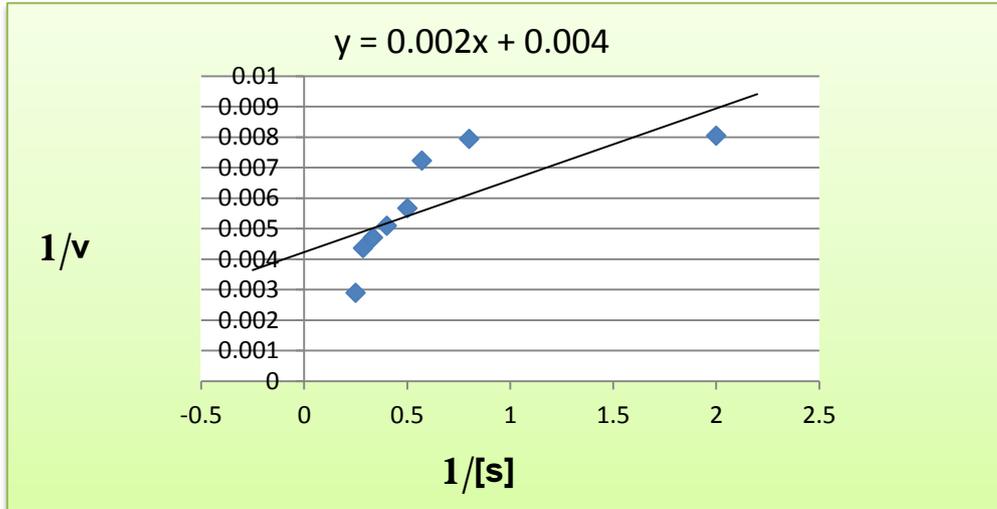


شكل ( 4 – 30 ) منحنى أرينوس لتقدير طاقة التنشيط لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4

#### 7.11.4 الثوابت الحركية لأنزيم بروتيز الاسبارتك

درست الثوابت الحركية لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى من خلال أستعمال تراكيز مختلفة من الكازين كمادة أساس Substrate ومن ثم رسمت العلاقة بين السرعة القصوى وتراكيز المادة الأساس لغرض تعيين قيم السرعة القصوى  $V_{max}$  وثابت ميكالس  $K_m$  وكما موضح في الشكل (4-31)، ومن خلال أستعمال طريقة Lineweaver- Burk Reciprocal Plot ، أذ بلغ معدل  $K_m$  ( 0.5 ) ملغم / مل و  $V_{max}$  ( 250 ) وحدة / مل . أن التباين في قيم الثوابت الحركية يعود ألى أختلاف الظروف المستعملة في تقدير هذه القيم مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والمحلول الدارىء أو يعزى الى تباين مصادر أنتاج الانزيم ( Zhang et al. , 2012 ) ، أختلفت النتائج مع ما ذكره Ahmadi et al. (2021) في دراسته للثوابت الحركية لأنزيم بروتيز الاسبارتك من أن قيم الثوابت الحركية  $K_m$  و  $V_{max}$  للأنزيم عند استعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة ( الكازين ) كانت 1.017 ملغم / مل و 128 وحدة / مل على التوالي ، كما أختلفت النتائج عما ذكره Mamo et al. (2020) بأن قيم الثوابت الحركية  $K_m$  و  $V_{max}$  لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* DRDFS13 عند استعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة ( الكازين ) تراوحت بين ( 0 – 20 ) ملغم / مل كانت 17.5 ملي مولاري و 1369 وحدة / مل على التوالي . وكذلك مع ما وجدته Song et al. (2020) بأن قيم الثوابت الحركية  $K_m$  و  $V_{max}$  لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى والمنتج من عفن *Aspergillus niger* F0215 عند استعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة ( الكازين ) كانت 3.6 ملغم / مل و 504.8 غرام / مل في الدقيقة على التوالي ، كما تطابقت النتائج مع (Ao et al. (2018) عند استعماله تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة ( الكازين ) تراوحت بين ( 0.5 - 3 ) غرام وباستخدام طريقة Lineweaver- Burk ، ان قيم الثوابت الحركية  $K_m$  و  $V_{max}$  لأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* Y1 كانت 20.0769 ملغم / مل و 256.4103 غرام / مل في الدقيقة على التوالي ، وجاءت النتائج مختلفه عما ذكره Souza et al. (2017) ان قيم الثوابت الحركية  $K_m$  و  $V_{max}$  لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى المنتج من عفن *Aspergillus foetidus* عند استعمال تراكيز مختلفة من المادة الخاضعة (الكازين) كانت 0.81 ملي مولاري و90 وحدة/مل على التوالي، كذلك مع ما وجدته ( 2015 )

Niyonzima *et al.* من أن قيمة الثوابت الحركية ( $K_m$ ) و ( $V_{max}$ ) لأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Aspergillus terreus* gr كانت 5.4 ملغم /مل و 12.8 وحدة / مل .



الشكل ( 4 - 31 ) منحنى Lineweaver- Burk لتقدير  $K_m$  و  $V_{max}$  لأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنتج عفن *Aspergillus terreus* SFH4

#### 8.11.4 تأثير المنشطات والمثبطات على فعالية أنزيم بروتيز الاسبارتك

يوضح جدول ( 4- 6 ) ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية بين المنشطات والمثبطات لفعالية الانزيم عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  ، إذ أثر عدد من أيونات المعادن وبعض المثبطات في فعالية أنزيم بروتيز الأسبارتك المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 والتي شملت كلاً من  $CaCl_2$  ،  $MgCl_2$  ،  $SDS$  ،  $CuCl_2$  ،  $FeCl_3$  ،  $KCl$  ،  $CuCl_2$  ،  $FeCl_2$  ،  $ZnCl_2$  ،  $NaCl$  ،  $CoCl_2$  ،  $MnCl_2$  ،  $EDTA$  ،  $Pepstatin A$  ) عند تركيز ( 1 ، 5 ) ملي مولاري ، إذ لوحظ أيونات (  $CaCl_2$  ،  $KCl$  ،  $MgCl_2$  ) كان لها دور في تنشيط فعالية أنزيم بروتيز الاسبارتك إذ بلغت الفعالية المتبقية ( 107 ، 101.9 ، 100.2 ) % على التوالي عند تركيز ( 5 ) ملي مولاري وبلغت ( 108.7 ، 103.6 ، 101.9 ) % على التوالي عند تركيز ( 1 ) ملي مولاري ، بينما ارتفعت نسبة الفعالية المتبقية في كل من (  $MnCl$  ،  $CuCl_2$  ،  $ZnCl_2$  )

،  $\text{CoCl}_2$  ) عند استعمال تركيز ( 1 ) ملي مولاري ، بينما أنخفضت الفعالية الانزيمية انخفاضاً ملحوظاً في الحديدك إذ بلغت الفعالية المتبقية بنسبة ( 24.78 % ) على التوالي عند التركيز ( 5 ) ملي مولاري في حين أنخفضت الفعالية الانزيمية انخفاضاً طفيفاً بأستعمال الصوديوم إذ بلغت الفعالية المتبقية نسبة ( 97.4 % ، 99.7 % ) عند التركيز ( 5 ، 1 ) ملي مولاري على التوالي .

أن بعض الايونات لها دوراً منشطاً في فعالية الانزيم نتيجة لزيادة الالفة بين الانزيم والمادة الاساس من خلال تبادل الايونات أو مسك المجاميع المتفاعلة في الشكل الثلاثي كما أن بعض الانزيمات قد تحتاج في عملها بعض الايونات لتتمكن من أتمام عملها ، كما ان بعض الايونات لها دوراً مثبطاً في فعالية الانزيم كونها تشكل جزءاً مهماً في الموقع الفعال ( Matthews et al. , 2005 ) ، يبين الجدول ( 4- 8 ) تأثير بعض المواد الكيميائية في فعالية أنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز ( 5 ، 1 ) ملي مولاري ، إذ أظهرت النتائج عند أستعمال مركب SDS حصول زيادة ملحوظة في الفعالية الانزيمية بنسبة فعالية متبقية بلغت ( 111.2 % ) عند التركيز ( 5 ) ملي مولاري وبنسبة فعالية متبقية بلغت ( 118.3 % ) عند التركيز ( 1 ) ملي مولاري ، بينما كان هناك انخفاضاً ملحوظاً عند أستعمال مركب Pepstatin A إذ بلغت نسبة الفعالية المتبقية ( 0.03 % ) عند التركيز ( 5 ) ملي مولاري وبلغت نسبة الفعالية المتبقية ( 0.07 % ) بتركيز ( 1 ) ملي مولاري ، أن بروتيزات الاسبارتك تتثبط بفعل الببستاتين، إذ يحصل ارتباط لمجاميع الهيدروكسيل الموجوده في مركب الستاتين Statine مع المواقع المحفزيين لحمض الاسبارتك ( Vishwanatha (2009) ، كما كان هناك انخفاضاً طفيفاً عند أستعمال مركب EDTA إذ بلغت نسبة الفعالية المتبقية ( 99.15 % ) عند التركيز ( 5 ) ملي مولاري لم يؤثر أستعمال هذا المركب عند أستعماله بتركيز ( 1 ) ملي مولاري إذ كانت نسبة الفعالية المتبقية ( 101.4 % ) . أن الزيادة الطفيفة في فعالية الانزيم قد تعود الى تأثير مجاميع السلفهايدريل وأستراكها في الموقع الفعال لتحفيز الانزيم ومحافظةها على التركيب الفراغي للبروتين ( Pisani et al. , 1990 ) .

أنفقت هذه الدراسة مع العديد من الدراسات منها ما أشار اليه ( Yin et al. (2013) بأن فعالية أنزيم البروتيز المنقى المنتج من عفن *Aspergillus oryzae* BCRC ازدادت بوجود بعض الأيونات مثل البوتاسيوم والكوبلت والمغنسيوم والزنك بفعالية متبقية بلغت ( 103.1 ، 100.7 ، 100.6 ، 102.1 ) % على التوالي عند استعمال تركيز ( 1 ) ملي

مولاري بينما بلغت الفعالية المتبقية (102.6 , 103 , 104.1 , 101.6 ) % على التوالي عند أستعمال تركيز (5) ملي مولاري في حين أنخفضت الفعالية الانزيمية بوجود أيونات أخرى مثل الصوديوم والحديدوز والحديدك بفعالية متبقية بلغت ( 99.8 , 91.8 , 99.5 ) % على التوالي عند أستعمال تركيز ( 1 ) ملي مولاري وبلغت الفعالية المتبقية ( 98.9 , 37.8 , 0 ) % على التوالي عند أستعمال تركيز (5) ملي مولاري ، كما كانت النتائج مقارنة مع ما ذكره (Souza et al. (2017) من أن فعالية أنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى المنتج من عفن *Aspergillus foetidus* ازدادت بوجود بعض الأيونات مثل النحاس والمغنسيوم والكالسيوم والزنك بفعالية متبقية بلغت (110 , 148.2 , 122.1) % على التوالي عند أستعمال تركيز (1) ملي مولاري كما ارتفعت الفعالية الانزيمية بأستعمال مركب SDS بفعالية متبقية بلغت ( 109.5 % ) عند أستعمال تركيز ( 1 ) ملي مولاري ، في حين أنخفضت الفعالية الانزيمية بوجود مركب Pepstatin A و EDTA بفعالية متبقية بلغت ( 98.3 , 9 ) % على التوالي عند أستعمال تركيز (5) ملي مولاري . كما تشابهت النتائج مع ما وجدته (Song et al. (2020) أن فعالية أنزيم بروتيز الاسبارتك المنقى المنتج من عفن *Aspergillus niger* F0215 ارتفعت بوجود أيونات البوتاسيوم والنحاس والكالسيوم والمنغنيز والزنك بفعالية متبقية بلغت (123.2 , 101.3 , 103.2 , 135.2 ) % على التوالي عند أستعمال تركيز ( 5 ) ملي مولاري ، في حين أنخفضت الفعالية الانزيمية بوجود مركب Pepstatin A و EDTA بفعالية متبقية بلغت ( 89.6 , 0 ) % على التوالي عند أستعمال تركيز (5) ملي مولاري . كذلك مع ما أكده (Xue et al. (2024) أن الفعالية الانزيمية لأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من عفن *Trichoderma asperellum* أنخفضت بوجود مركب Pepstatin A بفعالية متبقية بلغت ( 0 , 0.07 ) % عند أستعمال التراكيز (0.01 , 0.02 ) ملي مولاري على التوالي ، كما أنخفضت الفعالية الانزيمية بوجود مركب EDTA و PMSF بفعالية متبقية بلغت ( 89.8 , 97.4 ) % على التوالي عند أستعمال تركيز ( 1 ) ملي مولاري وبفعالية متبقية بلغت ( 90.1 , 96.9 ) % على التوالي عند أستعمال تركيز ( 5 ) ملي مولاري .

جدول ( 4 - 8 ) تأثير الايونات المعدنية والمثبطات على فعالية أنزيم بروتيناز الاسبارتك المنتج من العزلة

المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4

الفعالية المتبقية %	التركيز (ملي مولاري )	المادة
100	0	الانزيم غير المعامل
100.2	5	<b>CaCl<sub>2</sub></b>
101.9	1	
98.5	5	<b>ZnCl<sub>2</sub></b>
102.2	1	
90.14	5	<b>FeCl<sub>2</sub></b>
95.7	1	
99.7	5	<b>CuCl<sub>2</sub></b>
103	1	
101.9	5	<b>KCl</b>
103.6	1	
24.78	5	<b>FeCl<sub>3</sub></b>
99.15	1	
98.59	5	<b>MnCl<sub>2</sub></b>
101.4	1	
98.59	5	<b>CoCl<sub>2</sub></b>
100.2	1	
97.4	5	<b>NaCl</b>
99.7	1	
107	5	<b>MgCl<sub>2</sub></b>
108.7	1	
0.03	5	الببستاتين
0.07	1	
99.15	5	<b>EDTA</b>
101.4	1	
111.2	5	<b>SDS</b>
118.3	1	

0.0898	5	LSD
0.0747	1	LSD

## 12.4 استعمال الانزيم المنقى جزئياً في تطرية اللحوم

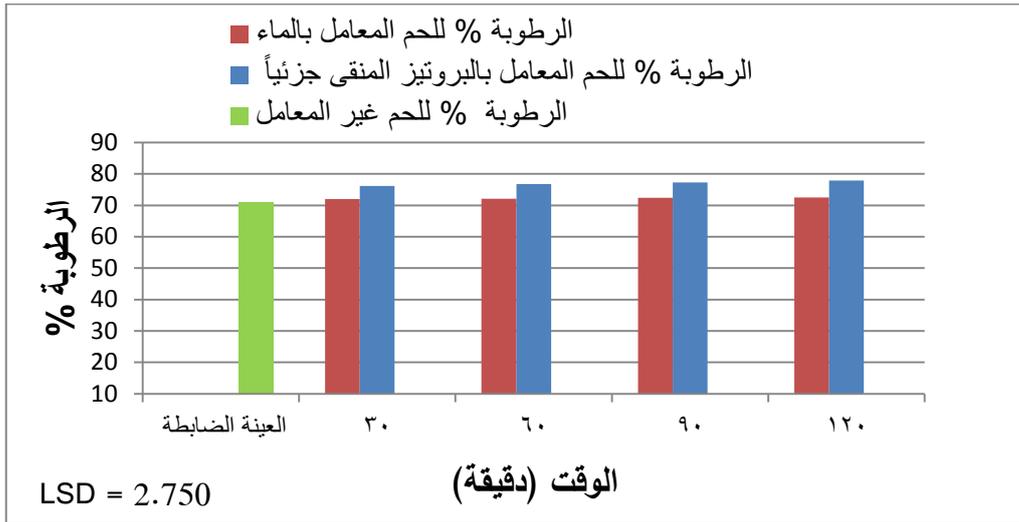
استعمل الانزيم المنقى جزئياً بواسطة كبريتات الامونيوم وبعد اجراء عملية الديلزة وبفعالية أنزيمية 598 وحدة / مل وفعالية نوعية 1107.4 وحدة / ملغم .

### 1.12.4 الفحوصات النوعية

#### 1.1.12.4 المحتوى الرطوبي Moisture Content

يبين شكل ( 4- 32 ) النسبة المئوية للمحتوى الرطوبي في اللحم البقري بعد معاملته بالماء المقطر وأنزيم بروتيز الاسبارتيك المنقى جزئياً وبتركيز ( 0.5 % ) بفترات غمر مختلفة . أذ لوحظ ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين مختلف معاملات اللحم البقري عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  أذ ارتفعت نسبة الرطوبة في اللحم المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتيك عن اللحم المعامل بالماء المقطر واللحم غير المعامل فكانت نسبة الرطوبة في اللحم قبل المعاملة ( 71% ) بينما كانت النسبة المئوية للمحتوى الرطوبي للعينة المعاملة بالأنزيم المنقى جزئياً ( 76.23 , 76.77 , 77.25 , 77.88 ) % في حين كانت النسبة المئوية للمحتوى الرطوبي للعينة المعاملة بالماء المقطر ( 72 , 72.11 , 72.44 , 72.52 ) % ولفترات غمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة على التوالي ، قد يعود سبب زيادة النسبة المئوية للمحتوى الرطوبي الى تأثير الانزيمات على بروتينات اللحم مما يؤدي الى انخفاض التداخلات بين البروتينات وبالتالي زيادة ارتباطها بالماء ( البدر ، 1998 ) وقد أتفقت هذه النتائج مع الدوري ( 1980 ) الذي أكد زيادة المحتوى الرطوبي للحم المعامل بالإنزيمات النباتية والحيوانية والميكروبية عن العينة المعاملة بالماء المقطر .

كما جاءت هذه النتائج مقارنة لما وجدته حسين ( 2005 ) عند دراسته المحتوى الرطوبي للحم البقر المعامل بأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Penicillium camemberti* ، والذي أشار الى زيادة المحتوى الرطوبي للحم المعامل بالانزيم .



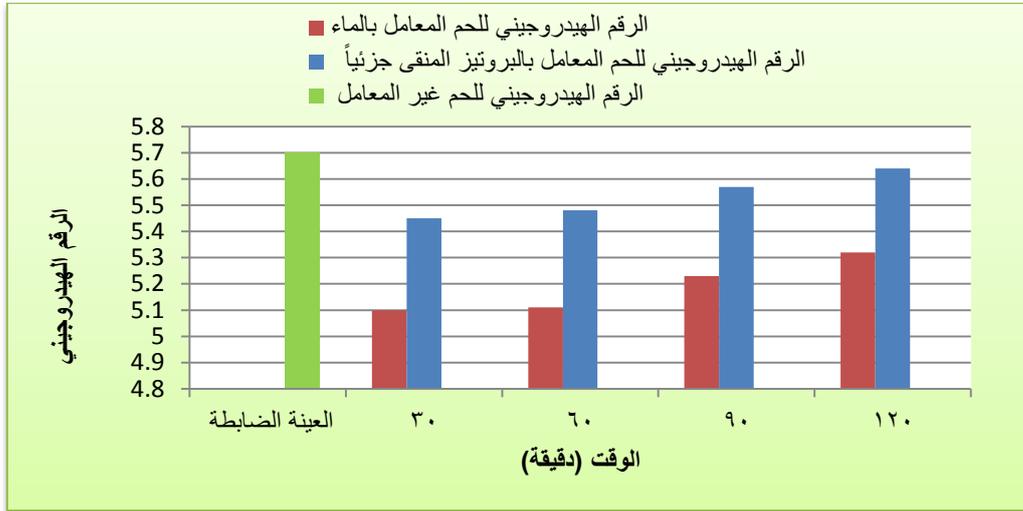
الشكل ( 4 – 32 ) النسبة المئوية للمحتوى الرطوبي للحم البقر المعامل بأنزيم بروتينز

الاسبارتيك بتركيز 0.5 % والماء المقطر ولفترات غمر مختلفة .

#### 2.1.12.4 الرقم الهيدروجيني

درس الرقم الهيدروجيني للحم المعامل بأنزيم بروتينز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر ولفترات غمر مختلفة . وقد كانت قيمة الرقم الهيدروجيني قبل المعاملة ( 5.7 ) . يؤدي تحلل الكربوهيدرات في اللحوم إلى إنتاج حامض اللاكتيك مع انخفاض مصاحب في الرقم الهيدروجيني من حوالي 7.2 في العضلات الحية إلى حوالي 5.5 في اللحوم ( Singh *et al.*, 2019). ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي لوحظ عدم وجود فروق معنوية بين مختلف معاملات اللحم البقري عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  ، أذ يبين الشكل (4–33) انخفاض الرقم الهيدروجيني للعينة المعاملة بأنزيم بروتينز الاسبارتك والعينة المعاملة بالماء المقطر ، وكان الانخفاض في الرقم الهيدروجيني للحم المعامل بأنزيم بروتينز الاسبارتك أقل من الانخفاض في الرقم الهيدروجيني للعينة المعاملة بالماء المقطر وبنفس التركيز (0.5%) ولجميع فترات الغمر المستعملة في الدراسة أي ان الانزيم قلل من الانخفاض في الرقم الهيدروجيني ، أذ لوحظ ان قيمة الرقم الهيدروجيني للعينة المعاملة بأنزيم بروتينز الاسبارتك سجلت ( 5.45 ، 5.48 ، 5.57 ، 5.66 ) بينما الرقم الهيدروجيني للعينة المعاملة بالماء المقطر ( 5.1 ، 5.11 ، 5.23 ، 5.32 ) ولفترات غمر ( 30 ، 60 ، 90 ، 120 ) دقيقة على التوالي ، ان ارتفاع الرقم الهيدروجيني وأبتعاده عن نقطة التعادل الكهربائي أثناء المعاملة الانزيمية يؤدي الى زيادة قابلية اللحم بالأحتفاظ بالماء وبالتالي زيادة طراوة اللحم

وتحسين جودته ( Kemp et al., 2010 ) ، جاءت هذه النتائج متطابقة مع ما ذكره حسين ( 2005 ) من ان معاملة اللحم البقري بأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Penicillium camemberti* قلل من الانخفاض في الرقم الهيدروجيني . كما تطابقت الدراسة مع ما وجدته ( Habtu et al. (2020) من ان معاملة اللحم البقري بأنزيم البروتيز يقلل من الانخفاض في الرقم الهيدروجيني .



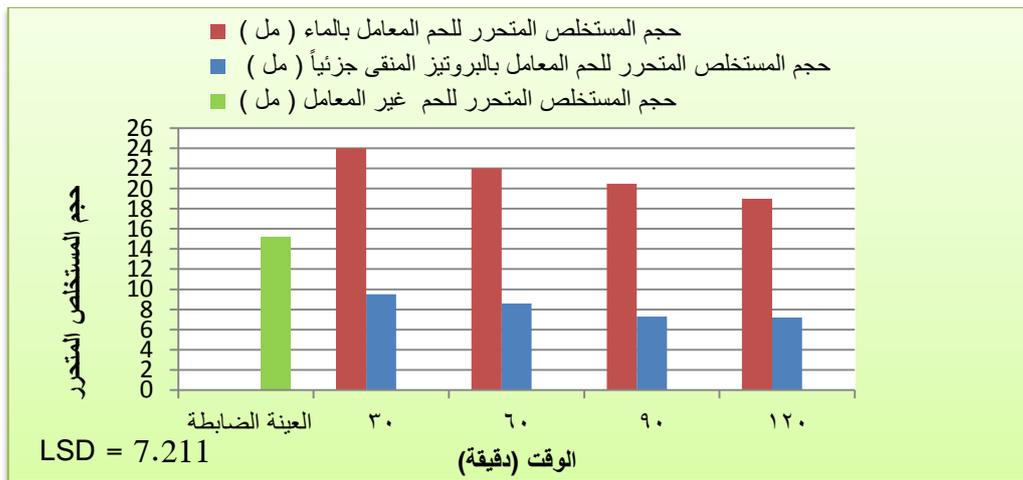
شكل ( 4- 33 ) الرقم الهيدروجيني للحم البقر المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر ولفترات غمر مختلفة

#### 3.1.12.4 حجم المستخلص المتحرر Volume of Released Extract

يوضح شكل ( 4- 34 ) ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  لحجم المستخلص المتحرر لعينة اللحم البقري المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك المنتج من العزلة المحلية لعفن *Aspergillus terreus* SFH4 بتركيز 0.5 % وعينة اللحم المعامل بالماء المقطر وعينة اللحم غير المعامل ( 15.2 ) ولفترات غمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة ، أذ بلغ حجم المستخلص المتحرر للعينة المعاملة بالأنزيم ( 7.2 , 7.3 , 8.6 , 9.5 ) مل بينما بلغ حجم المستخلص المتحرر للعينة المعاملة بالماء المقطر ( 19 , 20.5 , 22 , 24 ) مل ولفترات غمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة على التوالي .

أن انخفاض حجم المستخلص المتحرر في عينة اللحم المعامل بالأنزيمات قد يكون بسبب أبتعاد بروتينات اللحم عن نقطة التعادل الكهربائي مما يؤدي الى زيادة قابلية اللحم المعامل بالأنزيم للأحتفاظ بالماء وبالتالي انخفاض حجم المستخلص المتحرر وهذا ما يزيد من طراوة اللحم ( الدوري ، 1980 ) .

أنتفتت نتائج هذه الدراسة مع ماذكره البدر ( 1998 ) بأن حجم المستخلص المتحرر للحم البقر المعامل بالأنزيمات المختلفه حدث فيه أنخفاضاً ملحوظاً . كما أنتفتت النتائج مع ما وجده حسين ( 2005 ) من أن حجم المستخلص المتحرر للحم المعامل بأنزيم البروتيز المنتج من عفن *Penicillium camemberti* أنخفض بشكل ملحوظ .



الشكل ( 4 - 34 ) حجم المستخلص المتحرر للحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك وبتركيز 0.5 % والماء المقطر وبتركيز 0.5 % ولفترات غمر مختلفة

#### 4.1.12.4 قابلية حمل الماء ( W. H. C. )

يبين شكل ( 4 - 35 ) النسبة المئوية لقابلية حمل الماء للحم البقر المعامل بالماء المقطر وأنزيم بروتيز الاسبارتك وبتركيز 0.5 % لفترات غمر مختلفة ، بينت النتائج ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  وان النسبة المئوية لكلا المعاملتين بالأنزيم والماء المقطر قد أرتفعت عن النسبة المئوية للحم غير المعامل ( 27.6 % ) ، إذ بلغت النسبة المئوية لقابلية حمل الماء للحم المعامل بالأنزيم ( 40.2 ، 44.6 ، 46.2 ، 46.7 ) % في حين بلغت النسبة للحم المعامل بالماء المقطر ( 27.8 ، 28.2 ، 28.6 ، 28.9 ) % ولفترات غمر ( 30 ، 60 ، 90 ، 120 ) دقيقة على التوالي

، الماء هو جزيء ثنائي القطب وبالتالي يجذب إلى الأنواع المشحونة مثل البروتينات (Huff and Lonergan, 2005) لذلك فإن قابلية حمل الماء تعني الارتباط بين الماء والبروتينات وهذا ما يؤثر على عصيرية وطراوة اللحوم ، كما أن للرقم الهيدروجيني تأثيراً كبيراً على النسبة المئوية لقابلية حمل الماء للحوم كلما ابتعد الرقم الهيدروجيني من نقطة التعادل الكهربائي كلما ارتفعت النسبة المئوية لقابلية حمل الماء وبالتالي التأثير على نوعية اللحوم وطراوتها (Nuñez et al., 2020).

جاءت هذه النتائج مطابقة لما ذكره Alyounis et al. (2023) من زيادة قدرة اللحم على الاحتفاظ بالماء في عينات اللحوم المعاملة بأنزيم البروتيز مقارنة بعينة اللحم غير المعاملة .

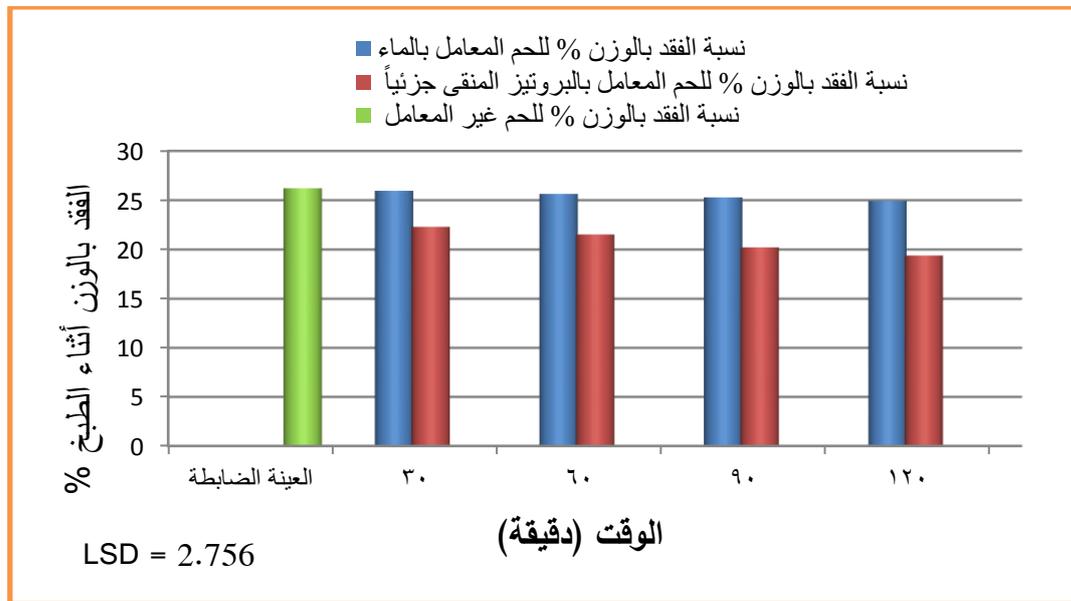


شكل ( 4- 35) النسبة المئوية لقابلية حمل الماء للحوم البقري المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5% والماء المقطر وبفترات وغمم مختلفة

#### 5.1.12.4 النسبة المئوية للفقد بالوزن أثناء الطبخ

درست النسبة المئوية للفقد بالوزن أثناء الطبخ للحوم البقري المسن بعد معاملته بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5% والماء المقطر وبفترات وغمم مختلفة كما في شكل ( 4- 36 ) ، لوحظ من خلال نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  وانخفاض النسبة المئوية للفقد بالوزن أثناء الطبخ للحوم المعامل بالأنزيم والماء المقطر عن النسبة المئوية للفقد بالوزن للحوم غير المعامل والتي كانت ( 26.2 % ) ، إذ بلغت النسبة المئوية للفقد بالوزن للحوم المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك

( 22.3 , 21.52 , 20.21 , 19.38 ) % بتركيز 0.5 % بينما بلغت النسبة المئوية للفقء بالوزن للحم المعامل بالماء المقطر ( 25.95 , 25.63 , 25.28 , 24.93 ) % وبفترات غمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة على التوالي ، وقد يعزى سبب أنخفاض الفقء بالوزن للحوم المعاملة بالانزيم أثناء الطبخ الى التماسك الحاصل للشبكة البروتينية بين سلاسل الأكتين والميوسين ( Akbari et al., 2021 ) وجاءت هذه النتائج متطابقة مع ما وجدته Lee et al. ( 2017 ) والذي بين بأن نسبة الفقء بالوزن للحوم أثناء الطبخ تنخفض عند إضافة الانزيم نتيجة لزيادة الارتباط وبالتالي أنخفاض الفقء بالوزن . كما أتفقت هذه النتائج مع Alyounis et al. (2023) عند دراستهم نسبة الفقء بالوزن للحم المعامل بأنزيم البروتيز ، أذ انخفضت نسبة الفقء بالوزن للحم المعامل بالأنزيم مقارنة بعينة اللحم غير المعامل .



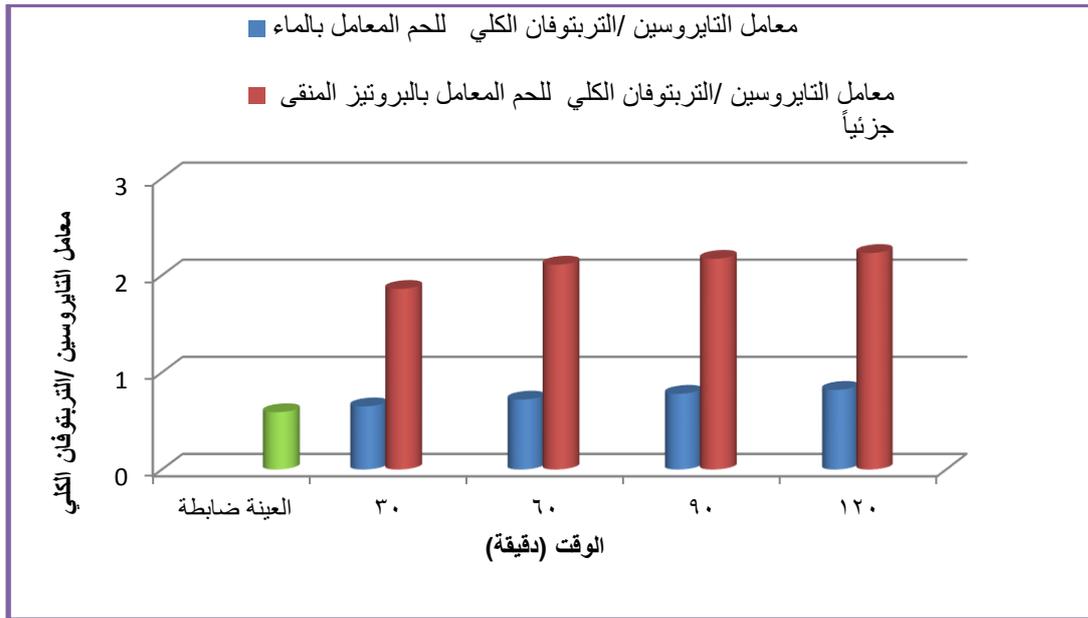
شكل ( 4 - 36 ) النسبة المئوية للفقء بالوزن أثناء الطبخ للحم المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك

بتركيز 0.5 % والماء المقطر بفترات غمر مختلفة

#### 6.1.12.4 معامل التايروسين / التربتوفان الكلي البروتيني وغير البروتيني

يوضح شكل ( 4-37 ) تأثير معامل التايروسين / التربتوفان الكلي للحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر بفترات غمر مختلفة ، من خلال نتائج التحليل الإحصائي لوحظ وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  بين قيمة معامل التايروسين / التربتوفان الكلي لكلا العينتين المعامله بالأنزيم والماء

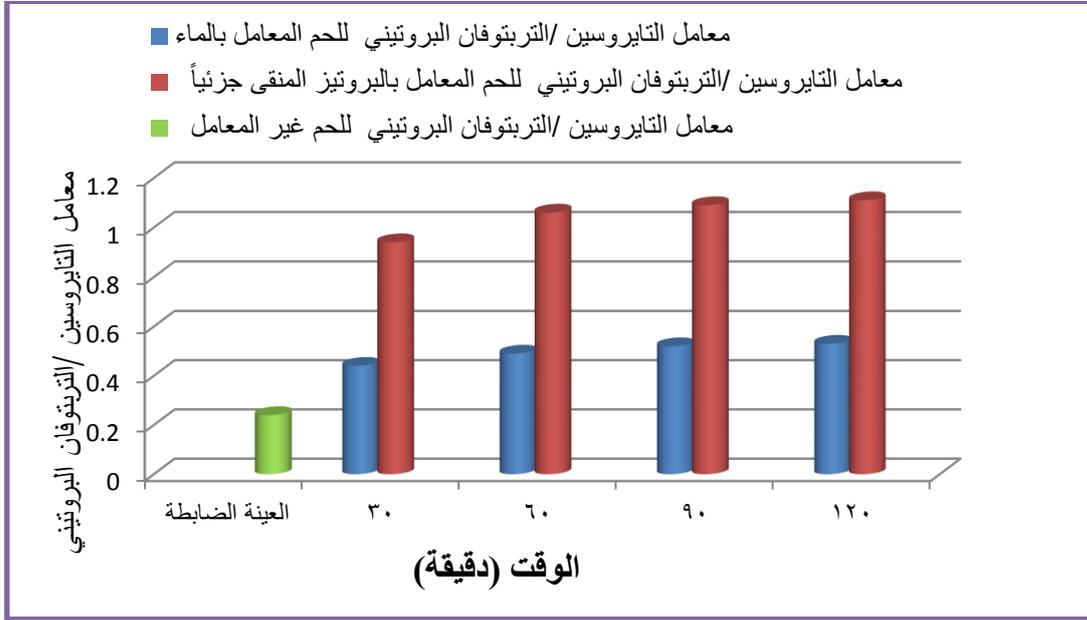
المقتر مقارنة بعينة اللحم غير المعاملة ( 0.59 ) ، أذ بلغت قيم معامل التايروسين / التربتوفان الكلي لعينة اللحم المعاملة بالأنزيم ( 1.86 , 2.11 , 2.17 , 2.23 ) بينما العينة المعاملة بالماء المقطر بلغت ( 0.65 , 0.72 , 0.78 , 0.82 ) وبفترات عمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة وعلى التوالي ، وقد يعود سبب الارتفاع الحاصل في قيمة معامل التايروسين/التربتوفان الكلي إلى ارتفاع نسبة الاحماض الامينية الاروماتية المتحررة نتيجة تحلل البروتين بواسطة أنزيم بروتيز الاسبارتك، أذ يعد ارتفاع معامل التايروسين / التربتوفان دليلاً على حدوث التحلل البروتيني للحوم إذ يستعمل هذا العامل لقياس تركيز الاحماض الامينية الاروماتية ( Jioe et al. , 2023 ) .



شكل ( 4 - 37 ) معامل التايروسين / التربتوفان الكلي للحم البقر المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر لفترات عمر مختلفة

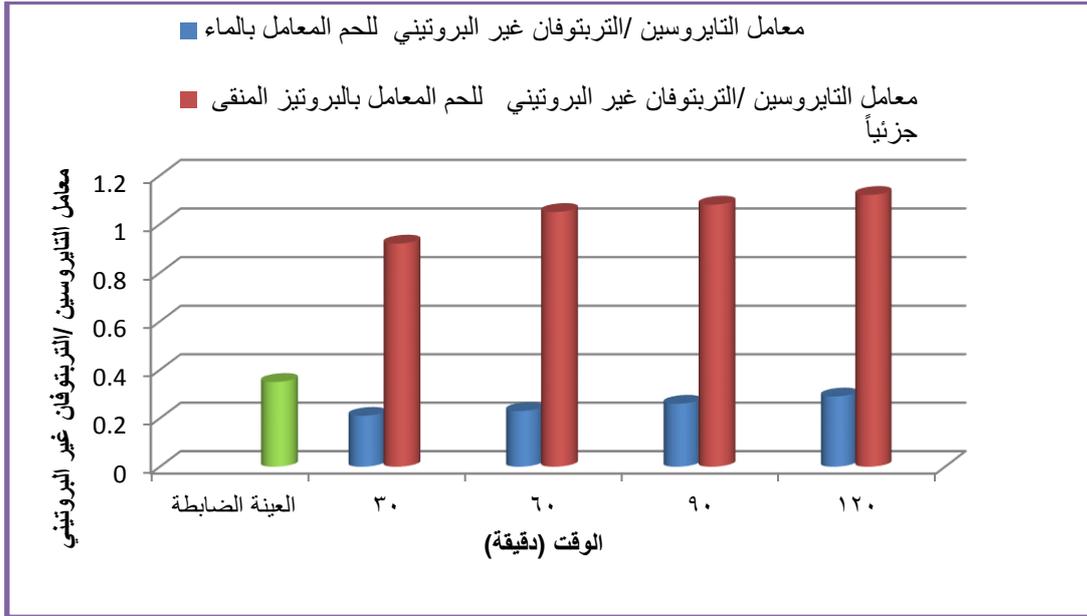
في شكل ( 4 - 38 ) ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي لوحظ وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  بين معامل التايروسين / التربتوفان البروتيني للحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر بفترات عمر مختلفة وعينة اللحم غير المعاملة ، أذ لوحظ ارتفاع قيمة معامل التايروسين / التربتوفان البروتيني لكلا العينتين المعاملة بالإنزيم والماء المقطر مقارنة بعينة اللحم غير المعاملة ( 0.24 ) ، إذ

بلغت قيم معامل التايروسين / التربتوفان البروتيني لعينة اللحم المعاملة بالأنزيم ( 0.94 , 1.06, 1.09, 1.11 ) بينما العينة المعاملة بالماء المقطر بلغت ( 0.44 , 0.49 , 0.52 , 0.53 ) وبفترات غمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة وعلى التوالي .



شكل ( 4 - 38 ) معامل التايروسين / التربتوفان البروتيني للحم البقر المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر لفترات غمر مختلفة

كما درس تأثير معامل التايروسين / التربتوفان غير البروتيني للحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر بفترات غمر مختلفة كما في الشكل (4- 39) ، ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي لوحظ وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  بين قيمة معامل التايروسين / التربتوفان غير البروتيني لكلا العينتين المعامله بالأنزيم والماء المقطر مقارنة بعينة اللحم غير المعاملة ( 0.35 ) ، إذ بلغت قيم معامل التايروسين / التربتوفان غير البروتيني لعينة اللحم المعاملة بالأنزيم ( 0.92 , 1.05 , 1.08 , 1.12 ) بينما العينة المعاملة بالماء المقطر بلغت ( 0.21 , 0.23 , 0.26 , 0.29 ) وبفترات غمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة وعلى التوالي ، ويعزى سبب ارتفاع قيم معامل التايروسين / التربتوفان الى تكون الاحماض الامينية نتيجة لتحلل بروتينات اللحم والتي يرافقها ارتفاع نسبة المواد النتروجينية غير البروتينية ( النجاوي ، 1985 ) .



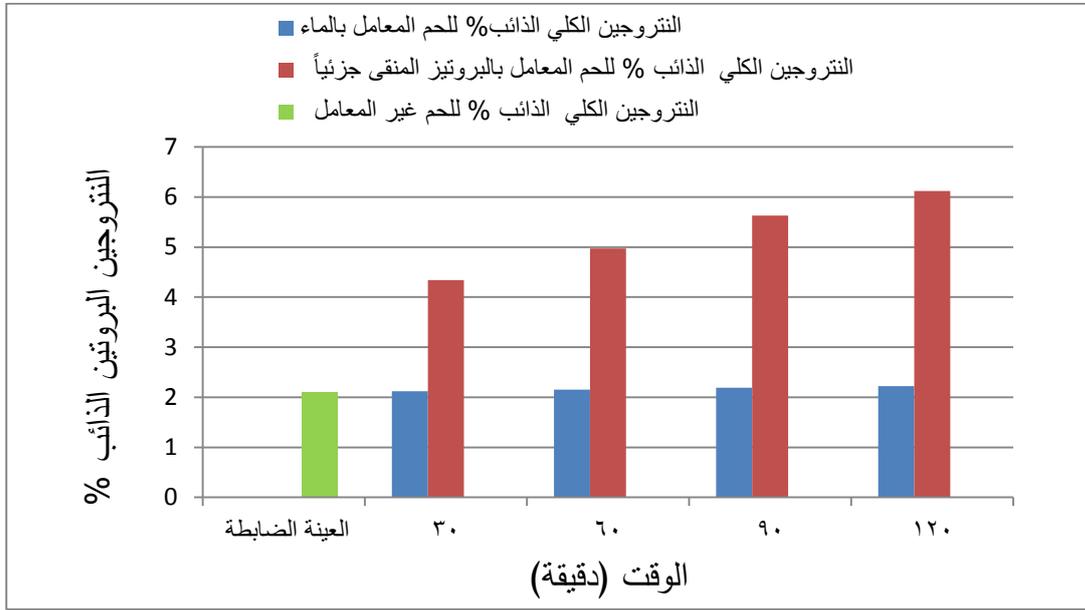
شكل ( 4 – 39 ) معامل التايروسين / التريبتوفان غير البروتيني للحم البقر المعامل بأنزيم بروتين الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر لفترات غمر مختلفة

جاءت هذه النتائج مطابقة لما ذكره *Alyounis et al. (2023)* من زيادة قيم معامل التايروسين / تريتوفان الكلي والبروتيني وغير البروتيني في عينات اللحوم المعاملة بأنزيم البروتين مقارنة بعينة اللحم غير المعاملة . وكذلك مع ما ذكره *Jahanbin (2021)* من أن ارتفاع نسبة الأحماض الأمينية الناتجة عن التحلل البروتيني لبروتينات اللحوم انعكس بشكل كبير على زيادة عامل التايروسين / التريبتوفان الذي كان مؤشراً على زيادة المواد النيتروجينية الذائبة .

#### 7.1.12.4 النتروجين الكلي الذائب والنتروجين البروتيني وغير البروتيني الذائب

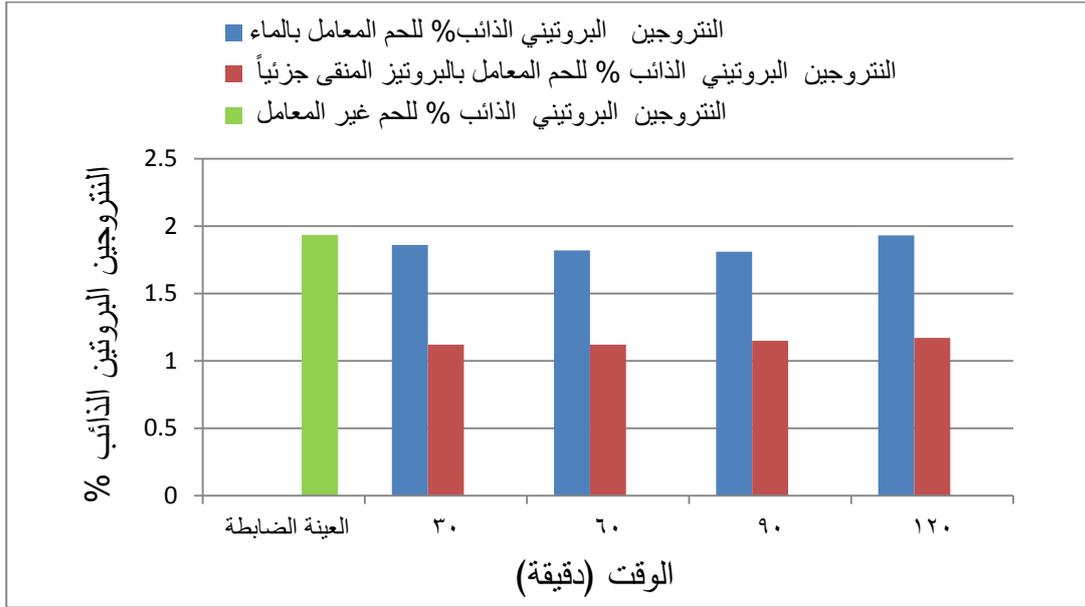
يبين الشكل ( 4 – 40 ) النسبة المئوية للنتروجين الكلي الذائب في اللحم البقري المسن المعامل بأنزيم بروتين الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر بفترات غمر مختلفة ، ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي لوحظ وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  بين النسبة المئوية للنتروجين الكلي الذائب ( Total Soluble Nitrogen ( TSN ) لعينة اللحم المعامل بأنزيم بروتين الاسبارتك وكذلك العينة المعاملة بالماء المقطر مقارنة مع العينة غير المعاملة ( 2.11 % ) ، إذ أعطت العينة المعاملة بالماء المقطر ( 2.12 و 2.15 ، 2.19 ، 2.22 ) % في حين ارتفعت هذه النسبة للعينة المعاملة بأنزيم والتي بلغت

( 4.34 , 4.97 , 5.63 , 6.12 ) % بتركيز 0.5 % ولفترات عمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة وعلى التوالي . قد يعود سبب ارتفاع النسبة المئوية للبروتين الكلي الذائب تغير تركيب البروتينات بفعل العوامل التي تؤثر على ثباتية البروتين مثل القوة الأيونية ودرجة الحرارة وغيرها ( الدوري ، 1980 ) .



شكل ( 4 - 4 ) النسبة المئوية للنتروجين الكلي الذائب للحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتين الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر بفترات عمر مختلفة

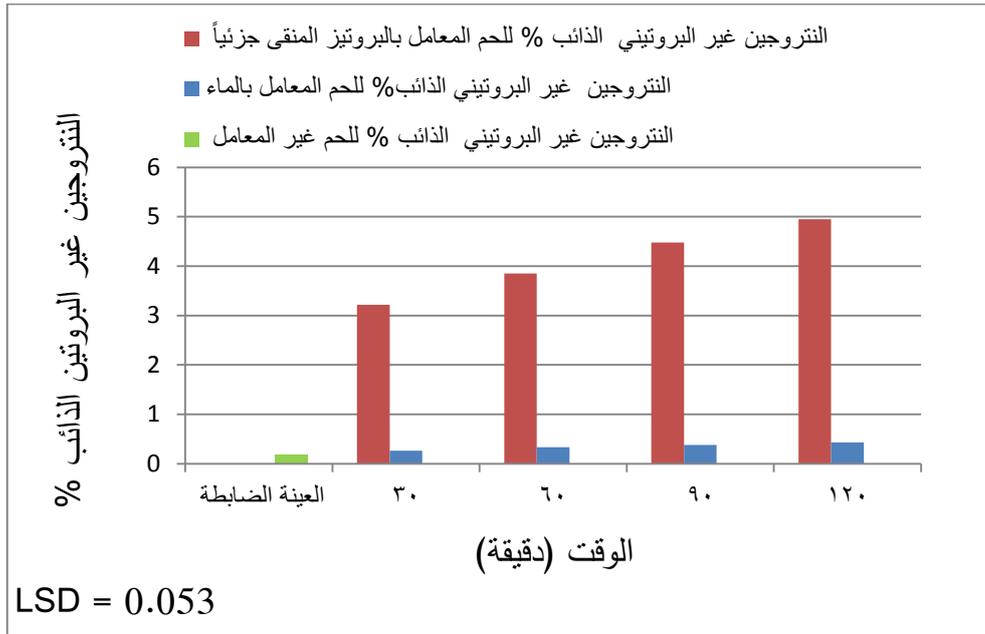
ويوضح الشكل ( 4 - 4 ) النسبة المئوية للنتروجين البروتيني الذائب Soluble Protein Nitrogen ( SPN ) للحم البقري المعامل بالماء المقطر وأنزيم بروتين الاسبارتك بتركيز 0.5 % وبفترات عمر مختلفة ، ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي لوحظ وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  بين النسبة المئوية ( SPN ) للحم المعامل بالماء المقطر والأنزيم عن العينة غير المعاملة ( 1.85 ) ، إذ انخفضت العينة المعاملة بالماء المقطر بشكل تدريجي حتى وصلت ( 1.6 , 1.63 , 1.67 , 1.72 ) % بينما انخفضت النسبة المئوية للنتروجين البروتيني الذائب للعينة المعاملة بأنزيم بروتين الاسبارتك بنسبة أقل من العينة المعاملة بالماء المقطر والتي بلغت ( 1.29 , 1.38 , 1.43 ) % وبفترات عمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة على التوالي .



الشكل ( 4 - 41 ) النسبة المئوية للنتروجين البروتيني الذائب لحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتينز الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المقطر بفترات غمر مختلفة

كما لوحظ في الشكل ( 4 - 42 ) ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  ، إذ ارتفعت النسبة المئوية للنتروجين غير البروتيني الذائب لحم البقري المعامل بأنزيم بروتينز الاسبارتك والماء المقطر مقارنة بالعينة غير المعاملة 0.18 % ، إذ بلغت النسبة المئوية للنتروجين غير البروتيني الذائب لحم المعامل بالماء المقطر ( 0.26 , 0.33 , 0.38 , 0.43 ) % في حين ارتفعت النسبة المئوية للعينة المعاملة بالأنزيم والتي بلغت ( 3.22 , 3.85 , 4.48 , 4.95 ) % ، وقد يعزى سبب انخفاض النسبة المئوية للنتروجين البروتيني الذائب وارتفاع النسبة المئوية للنتروجين غير البروتيني الذائب الى تحلل بروتين الياف العضلات والذي يؤدي الى تحول جزء من النتروجين البروتيني الذائب الى النتروجين غير البروتيني الذائب ( الدوري ، 1980 ) .

وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما ذكره حسين ( 2005 ) بارتفاع النسبة المئوية للنتروجين الكلي الذائب و النسبة المئوية للنتروجين غير البروتيني الذائب مع انخفاض النسبة المئوية للنتروجين البروتيني الذائب لحم البقر المعامل بأنزيم البروتينز المنتج من عفن *Penicillium camemberti* .



الشكل ( 4 - 42 ) النسبة المئوية للنتروجين غير البروتيني الذائب لحم البقر المسن المعامل بأنزيم بروتين الاسبارتك بتركيز 0.5 % والماء المفطر بفترات عمر مختلفة

#### 2.12.4 التقييم الحسي لشرائح اللحم

يبين الجدول ( 4 - 9 ) التقييم الحسي لشرائح اللحم المعاملة بأنزيم بروتين الاسبارتك بتركيز 0.5 % وبفترات عمر ( 30 , 60 , 90 , 120 ) دقيقة وشرائح اللحم غير المعاملة (العينة الضابطة) ، ومن خلال نتائج التحليل الإحصائي لوحظ وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $p \leq 0.05$  لتأثير معاملة عينة اللحم بأنزيم بروتين الاسبارتك على صفة العسيرية والظراوة والقبول العام مقارنة بالعينة الضابطة كما كان التأثير بشكل تدريجي خلال فترات الغمر المذكورة أعلاه ، إذ أعطت العينة المغمورة لفترة 120 دقيقة أعلى تأثيراً في صفة العسيرية والظراوة والقبول العام ، وقد يعزى سبب ذلك الى قابلية الانزيم على تكوين الروابط التقاطعية بين جزيئات البروتين وبالتالي إعطاء اللحم مظهراً متجانساً ومتماسكاً فضلاً عن زيادة قابلية حمل الماء مع زيادة فترات الغمر في المحلول الانزيمي وهذا ما حسن من درجة العسيرية والظراوة وبالتالي التقبل العام للحم (Liang et al., 2020).

جاءت هذه الدراسة مشابهة لما ذكره ( Habtu et al. (2020) من تحسن في النكهة والعسيرية والظراوة ودرجات القبول العام في عينات اللحم البقري المعامل بأنزيم البروتين مقارنة بالعينة الضابطة . كما جاءت النتائج قريبة لما وجدته Akpan and Omojola

( 2015 ) عند استعمال تراكيز مختلفة من انزيم البروتيزفي تطرية اللحم ، أذ كان هناك تحسن في الطراوة و العصيرية ودرجات القبول العام في عينات اللحم البقري المعاملة بأنزيم البروتيز تركيز 0.5 % مقارنة بالعينة الضابطة .

الجدول (4-9) التقييم الحسي لشرائح اللحم البقري المعاملة وغير المعاملة بأنزيم بروتيز الاسبارتك

القبول العام Acceptability	الطراوة Tenderness	العصيرية Juiciness	النكهة Flavor	اللون Color	الزمن دقيقة
7	7	7	7	7	
4.3	3	3	5	6	العينة الضابطة
5.5	5	5	5.4	5.9	30
5.7	5.5	5.4	5.5	5.7	60
5.8	5.8	5.6	5.7	5.5	90
6.2	6.4	6.2	5.8	5.4	120
0.4292	0.7770	0.7296	0.1862	0.1524	LSD

7 : مقبول جداً ، 6 : مقبول ، 5 : مقبول قليلاً ، 4 : وسط ، 3 : غير مقبول قليلاً ،  
2 : غير مقبول ، 1 : غير مقبول جداً

## 5 – الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

### 1.5 الاستنتاجات

- 1- تفوق العزله الفطرية G94 في إنتاج إنزيم بروتيز الأسبارتك مقارنة بالعزلات الأخرى بفعالية إنزيمية بلغت ( 258.6 ) وحدة / مل .
- 2- إمكانية إنتاج الإنزيم بطريقة تخمرات الحالة الصلبة وباستعمال المخلفات الزراعية مثل نخالة الحنطة كوسط طبيعي ورخيص ومتوفر .
- 3- تثبيط معظم فعالية الإنزيم عند معالته مع مثبت ( Pepstatin A ) كون هذا المثبط متخصص بتثبيط إنزيم بروتيز الاسبارتك .
- 4- تفوق الإنزيم المنتج من حيث الفعالية التحليلية مقارنة مع الفعالية التخثرية .
- 5- أثبتت العزلة المنتقاة ( G94 ) *Aspergillus terreus* بأنها لا تنتج الأفلاتوكسين عند تنميتها على وسط جوز الهند .
- 6- إمكانية تنقية الإنزيم بنقاوة عالية باستعمال التركيز بكبريتات الأمونيوم والديلزة والترشيح الهلامي Sephadex G-100 .
- 7- ثباتية إنزيم بروتيز الأسبارتك عند مديات من درجات الحرارة وأرقام هيدروجينية واسعة تراوحت بين ( 15 – 55 ) م° و ( 3 – 4 ) .
- 8- أظهرت نتائج الفحوصات النوعية والحسية للحم حصول تحسن واضح عند المعاملة مع إنزيم الأسبارتك وبتركيز 0.5 % .

## 2.5 التوصيات

- 1- دراسة محتوى وتسلسل الأحماض الأمينية في السلسلة الببتيدية باستعمال التقنيات الحديثة .
- 2- دراسة استعمال الإنزيم في تطبيقات غذائية أخرى .
- 3- دراسة إمكانية تحسين إنتاج الإنزيم من عفن *Aspergillus terreus* SFH5 عن طريق أحداث طفرات وراثية .
- 4- دراسة إمكانية استعمال إنزيم بروتيز الاسبارتك في التطبيقات الصيدلانية وذلك من خلال إجراء دراسات مشتركة مع الاختصاصات الطبية .

## 6- المصادر Referenses

## 1.6 المصادر العربية

- البدر، عبد الله أحمد (1998). استخدام الأجزاء الأنزيمية ذات الفعالية التحليلية العالية لبعض مخثرات الحليب في تطرية اللحوم. رسالة ماجستير. كلية الزراعة، جامعة البصرة .
- التميمي ، وسن كاظم عبد الرزاق ( 2014 ) . تنقية وتوصيف أنزيم الكولاجينيز المستخلص من أمعاء الاسماك وأستعماله في تطرية اللحوم . أطروحة دكتوراه ، كلية الزراعة ، جامعة البصرة ، العراق .
- حسناوي ، صادق فنجان ، اليونس، زينة كاظم ، المنهل ،علاء جبار عبد . ( 2024 ) . لمحة عامة عن بروتين الاسبارتك من التصنيف الى التوصيف . مجلة العلوم الإنسانية والطبيعية . (4)5 ، 69 – 49 .
- حسين ، آيات عدنان عباس . ( 2005 ) . إستخدام بروتينات من عفن *Penicillium camemberti* في بعض التطبيقات الغذائية والأوساط الزرعية . جامعة بغداد ، كلية الزراعة ، قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية ، 6-8 .
- الدوري، لؤي دوري خليل (1980). استخدام بعض الأنزيمات من المصادر المختلفة في تطرية اللحوم. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة الموصل، العراق.
- الطائي، منير عبود جاسم (1986). تكنولوجيا اللحوم والأسماك. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة البصرة، العراق.
- المعيني ، اسماء محمد سعود ( 2005 ) . دراسة كيموحيوية لأنزيم البروتياز المنتج من *Staphylococcus aureus* بكتريا المعزولة محلياً . معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية للدراسات العليا / جامعة بغداد : 153 .
- النجاوي، معتصم حسين محمد (1985). تأثير التعتيق والمعاملة بالبابين على بروتينات المايوفايبريل وبعض الصفات الأخرى للحوم الأغنام المسنة. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة صلاح الدين، العراق.

## 2.6 المصادر الاجنبية

- A.O. A. C.** ( 1975 ). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 12th Ed., Published by association of official analytical chemists Washington.
- Abbas**, H. M., Foda, M. S., Kassem, J. M., Bayomi, H. M., & Moharam, M. E. (2013). Production of white soft cheese using fungal coagulant produced by solid state fermentation technique. *World Applied Sciences Journal*, 25(6), 939–944.
- Abd Al–Manhel**, A. J. (2017). Production of exopolysaccharide from local fungal isolate. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 5(3), 338–46.
- Abdel–Nasser** A, Fathy HM, Badr A, Hathout A, Barakat OS (2022) Prevalence of aflatoxigenic fungi in cereal grains and their related chemical metabolites. *Egyptian Journal of Chemistry* 65:1–2 .
- Ahmadi**, S., Salehi, M., & Ausi, S. (2021). Kinetic and thermodynamic study of aspartic protease extracted from *Withania coagulans*. *International Dairy Journal*, 116, 104960.
- Ahmed**, N. E., El Shamy, A. R., & Awad, H. M. (2020). Optimization and immobilization of amylase produced by *Aspergillus terreus* using pomegranate peel waste. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1–12.
- Aitken**, A., Casey, J. C., Penny, I. F., & Voyle, C. A. (1962). Effect of drying temperature in the accelerated freeze-drying of pork. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 13(8), 439–448.

- Akbari, M., Razavi, S. H., & Kieliszek, M. (2021).** Recent advances in microbial transglutaminase biosynthesis and its application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology, 110*, 458–469.
- Akpan, I. P., & Omojola, A. B. (2015).** Quality attributes of crude papain injected beef. *Journal of Meat Science and Technology, 3(4)*, 42–46.
- Aljammas, H. A., Al Fathi, H., & Alkhalaf, W. (2018).** Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rhizomucor miehei* using solid–state fermentations. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 16(1)*, 213–216.
- Alsefar majid dakhil, R. (2017).** Purification and Charactrization of protease for some plants sources. *Al-Qadisiyah Journal of Pure Science, 22(4)*, 105–129.
- Alsoufi, M. A. (2013).** Partial purification and estimated some characterization of protease from prickly lettuce (*Lactuca serriola* L.) leaves and used it in some applications. *Iraqi Journal of Biotechnology, 12(2)*, 1–18.
- Alternaria, C. (2020 )** Evaluation of physiological and biochemical characteristics of alternaria species isolated from soil in assiut governorate, Egypt , in addition to dichotomous key to the encountered species . *Evaluation , 49(1)*, 34–59.
- Alyounis, Z. K., Alshawi, S. G., & Najm, T. A.(2023).** Extraction and Purification of Protease from Ginger (*Zinger officinalae*) Using in Aged Cows Meat Tenderizing. *Annals of Biology , 39 (2) : 447–451.*

- Ameen**, F. (2023). Purification and characterization of xylanase produced by *Aspergillus fumigatus* isolated from the northern border region of Saudi Arabia. *Fermentation*, 9(7), 595.
- Amer** ,A. E. A., Hashem . M. I., Amer. M. E., & Gomaa. A. M. (2015). "Using sweet whey for production of milk clotting enzyme by *Mucor miehei* NRRL 3420 in production of white soft cheese," *Middle East Journal of Applied*, vol. 5, no. 4, pp. 1068–1081.
- An**, Z., He, X., Gao, W., Zhao, W., & Zhang, W. (2015). Characteristics of miniature Cheddar-type cheese made by microbial rennet from *Bacillus amyloliquefaciens*: a comparison with commercial calf rennet. , *Journal of Food Science*, 79(1), 1,214–221.
- Anwar**, Z. (2023). Production of Industrial Applicable Enzymes From *Rhizopus Oryzae* Through Response Surface Methodology. *University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore* ,1–17 .
- Ao**, X. L., Yu, X., Wu, D. T., Li, C., Zhang, T., Liu, S. L., Chen, S.J., He ,L., Zhou, K., Zou, L. K. (2018). Purification and characterization of neutral protease from *Aspergillus oryzae* Y1 isolated from naturally fermented broad beans. *AMB Express*, 8(1), 1–10.
- Arima**, K., Yu, J., & Iwasaki, S. (1970). Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In *Methods in enzymology* . *Academic Press* . 19, 446–459.
- Ash**, K., Sushma, Ramteke, PW. (2018) Optimization of extracellular alkaline protease production from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soil samples. *Inter J Agric Environ Biotechnol* 11:187–194.

- Asha, B., & Palaniswamy, M. (2018).** Optimization of alkaline protease production by *Bacillus cereus* FT 1 isolated from soil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(2), 119–127.
- Ashie, I. N. A., Sorensen, T. L., & Nielsen, P. M. (2002).** Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness. *Journal of food science*, 67(6), 2138–2142.
- Aunstrup, K., Andersen, O., Falch, E. A. & Nielsen, T.K. ( 1979 ).** Production of microbial enzymes, In *Microbiol Technology*, A.H. Rose, ed. Academic press, Inc, New York .
- Ayugi, V., Okoth, S., & Nyongesa, B. W. (2015).** Identification Key for *Aspergillus* Species Isolated from Maize and Soil of Nandi County, Kenya. *University of Nairobi, Nairobi, Kenya* , 1–67.
- Balajee, S. A. (2009).** *Aspergillus terreus* complex. *Medical Mycology*, 47(sup1), S42–S46.
- Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017).** Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119–143.
- Bano, S., Dahot, M. U., & Naqvi, S. H. A. (2016).** Optimization of culture conditions for the production of protease by *Pleurotus eryngii*. *Pakistan Journal of Biotechnology*, 13(3), 193–198.
- Barrios–González, J., Pérez–Sánchez, A., & Bibián, M. E. (2020).** New knowledge about the biosynthesis of lovastatin and its production by fermentation of *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 8979–8998.

- Basha, M. A., Shetaia, Y. M., Mehaya, F. M., & Abdelzaher, F. H.** (2023). Solid-state fermentation and optimization of cellulase production using local fungal isolate. *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 22(3), 456–465.
- Baxter, A. P., Rong, I. H., Roux, C., & Van der Linde, E. J.** (1999). Collecting and preserving fungi—A manual for mycology. *Plant Protection Research Institute. Private Bag X, 134*.
- Bennett, J. W.** (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus: molecular biology and genomics*, 1–17.
- Bensmail, S., Mechakra, A., & Fazouane–Naimi, F.** (2015). Optimization of milk-clotting protease production by a local isolate of *Aspergillus niger* ffb1 in solid-state fermentation. *The journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 4(5), 467–472.
- Bhatia, RK., Ullah, S., Hoque, HZ., Ahmad, I., Yang, YH., Bhatt, AK., Bhatia, SK .**(2021) Psychrophiles: a source of cold-adapted enzymes for energy efficient biotechnological industrial processes. *The Journal of Environmental Chemical Engineering* 9(1),104607.
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M.H., & Weber, T.** (2019). antismash 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic acids research*, 47(W1), W81–W87.
- Brik, A., & Wong, C. H.** (2003). HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Organic & biomolecular chemistry*, 1(1), 5–14.

- Chahrazad, B., & Habiba, Z. (2021).** Production and characterization of proteases from *Aspergillus niger* strain isolated from dried fruit and its effect on gliadin. *01(4)*, 25–29.
- Chanalia, P., Gandhi, D., Attri, P., & Dhanda, S. (2018).** Extraction, purification and characterization of low molecular weight Proline iminopeptidase from probiotic *L. plantarum* for meat tenderization. *International journal of biological macromolecules*, *109*, 651–663.
- Chanalia, P., Gandhi, D., Jodha, D., & Singh, J. (2011).** Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, *22(4)*, 96–101.
- Chang, G. G., Wang, J. K., Huang, T. M., Lee, H. J., Chou, W. Y., & Meng, C. L. (1991).** Purification and characterization of the cytosolic NADP<sup>+</sup>-dependent malic enzyme from human breast cancer cell line. *European journal of biochemistry*, *202(2)*, 681–688.
- Chantavorakit, T., Klaysubun, C., & Duangmal, K. (2021).** *Streptomyces acididurans* sp. nov., isolated from peat swamp forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *71(7)*, 004849.
- Chen, H. (2013).** Modern solid state fermentation. *Netherlands: Springer*. 332.
- Chergui, D., Akretche–Kelfat, S., Lamoudi, L., Al–Rshaidat, M., Boudjelal, F., & Ait–Amar, H. (2021).** Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* using two downgraded Algerian date varieties. *Saudi journal of biological sciences*, *28(12)*, 7134–7141.

- Chimbekujwo**, K. I., Ja'afaru, M. I., & Adeyemo, O. M. (2020). Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African* 8: e00398,1–9.
- Choudhary**, K., Mankar, M. K., & Sahay, S. (2022). "Extremophilic enzymes: catalytic features and industrial applications" in *Extremophilic fungi: Ecology, Physiology and Applications* (Singapore: Springer Nature Singapore), 273–314.
- Coates**, L., Tuan, H. F., Tomanicek, S., Kovalevsky, A., Mustyakimov, M., Erskine, P., & Cooper, J. (2008). The catalytic mechanism of an aspartic proteinase explored with neutron and X-ray diffraction. *Journal of the American Chemical Society*, 130(23), 7235–7237.
- Colla**, L. M., Reinehr, C. O., Manfredini, P. G., Cavanhi, V. A. F., & Costa, J. A. V. (2023). Simultaneous production of proteases and antioxidant biopeptides by solid-state fermentation. *Sustainable Food Technology*, 1(6), 874–885.
- Contesini**, F. J., Liberato, M. V., Rubio, M. V., Calzado, F., Zubieta, M. P., Riaño-Pachón, D. M., Squina, F.M., Bracht, F., Skaf, M.S., & Damasio, A. R. (2017). Structural and functional characterization of a highly secreted  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase (GH62) from *Aspergillus nidulans* grown on sugarcane bagasse. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–proteins and proteomics*, 1865(12), 1758–1769.
- Copeland**, R. A. (2000). Kinetics of single-substrate enzyme reactions. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2, 137–139.

- Correia, T. C.,** Corrêa, A. P. F., Pimenta, D. B., and Vital, M. J. S. (2023). Bioconversion of poultry residues for the production of proteases by *Aspergillus* sp. isolated from Amazonian forest soil. *Ciência Rural*, *54*, e20220444.
- Couture, F.** (2023). Therapeutic Targeting of the Proteolytic Enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(1), 519–521.
- Crabbe, M. J. C.** (2004). Rennets: general and molecular aspects. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, *1*, 19–45.
- Craik, C. S.,** Page, M. J., & Madison, E. L. (2011). Proteases as therapeutics. *Biochemical Journal*, *435*(1), 1–16.
- Da Silva, O. S.,** de Oliveira, R. L., Souza–Motta, C. M., Porto, A. L. F., & Porto, T. S. (2016). Novel protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid–state fermentation. *Advances in Enzyme Research*, *4*(04), 125–143.
- Da Silva, R. R.** (2017). Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, *183*, 1–19.
- Da Silva, R. R.,** Souto, T. B., Gonsales da Rosa, N., de Oliveira, L. C. G., Juliano, M. A., Juliano, L., Rosa, J.C., Cabral, H. (2020). Evaluation of the milk clotting properties of an aspartic peptidase secreted by *Rhizopus microsporus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *50*(3), 226–233.
- Dadshahi, Z.,** Homaei, A., Zeinali, F., Sajedi, R. H., & Khajeh, K. (2016). Extraction and purification of a highly thermostable alkaline

- caseinolytic protease from wastes *Penaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. *Food Chemistry*, 202, 110–115.
- Dairawan, M., & Shetty, P. J. (2020).** The evolution of DNA extraction methods. *Am. Journal of Biomedical Science*, 8(1), 39–45.
- Dania, V. O., Alabi, O. V., & Azuh, V. O. (2021).** ITS-based identification and characterization of sweetpotato soft rot disease-causing *Rhizopus* species isolated from Oyo state, southwest Nigeria. *Journal of Plant Pathology*, 1–12.
- Darvishnia, M., Hasanvand, E., & Pakbaz, S. (2023).** Morphological and Molecular Identification of *Fusarium* Associated with Beans in Selseleh County. *Journal of Genetic Resources*, 9(2), 222–231.
- Dasari, P. K., Gannamaneni, S. S., Jahnavi, B., Umadevi, B., Balaji, M. A., Meghana, N., & Sravani, R. (2023).** optimization and production of protease using *aspergillus cervinus*. *World Journal of Pharmaceutical Research* , 12(4) , 2063–2071.
- Daudi, S.; Mukhtar, H.; Rehman, A. U. and UL-Haq, I. (2015).** Production of rennin-like acid protease by *Mucor pusillus* through submerged fermentation . *Pakistan Journal of Botany*, 47(3):1121–1127.
- de Hoog , G. S., Guarro, J., Gené, J., & Figueras, M. J. (2005).** Atlas of clinical fungi. Universitat Rovira i Virgili , Faculty of Science (FNWI) .
- de Lima, E. E., Franco, D. G., Galeano, R. M. S., Guimarães, N. C. D. A., Masui, D. C., Giannesi, G. C., & Zanoelo, F. F. (2021).** Biochemical characterization of a partially purified protease from *Aspergillus terreus* 7461 and its application as an environmentally

- friendly dehairing agent for leather industry. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(4), 320–330.
- De Oliveira**, D. M., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(3), 10–1128.
- Devi**, B. G., & HemaLatha, K. P. J. (2014). Isolation, partial purification and characterization of alkaline serine protease from seeds of *Cucumis melo* var *agrestis*. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 3(6), 88–95.
- Dolatowski**, J. Z. and Stasiak, D. M. ( 1999 ). The effect of low frequency and intensity ultrasound on pre-rigor meat on structure and functional parameters of freezing and thawed beef semimembranosus muscle . Proc. 44th . Inc. Cong. Meat Sci. tech. Barcelona , Spain .
- dos Santos Aguilar**, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253–262.
- Dubey**, R., Adhikary, S., Kumar, J., & Sinha, N. (2010). Isolation, production, purification, assay and characterization of alkaline protease enzyme from *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Dev Microbiol Molecular biology*, 1(1), 75–94.
- Dudani**, J. S., Warren, A. D., & Bhatia, S. N. (2018). Harnessing protease activity to improve cancer care. *Annual review of cancer biology*, 2, 353–376.

- Egan, H. ; Ronald, S. and Ronald , S. ( 1988 ).** Pearson's chemical analysis of foods . 8th ( Ed. ) longman Scientific and technology , Uk.
- El-Bondkly A (2012)** Molecular identification using ITS sequences and genome shufing to improve 2-deoxyglucose tolerance and xylanase activity of marine-derived fungus, *Aspergillus* sp. NRCF5. *Appl Biochem Biotechnol* 167(8):2160–73.
- Erekat, N. S. (2022).** Programmed cell death in cerebellar Purkinje neurons. *Journal of integrative neuroscience*, 21(1), 30,1–15.
- Fadel, M., Hamed, A. A., Abd-Elaziz, A. M., Ghanem, M. M., & Roshdy, A. M. (2021).** Cellulases and animal feed production by solid-state fermentation by *Aspergillus fumigatus* NRCF-122 mutant. *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(7), 3511–3520.
- Fairooz, H. A., Fairooz, N. A., & Chalooob, F. A. (2021).** Extraction condition of protease frombroccoli (Brassicaoleracea var italic) and study of Biochemical Characteristic from the selected source. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(2) ,2208–2219.
- Fernandes, S., Dias, B., Belo, I., & Lopes, M. (2023).** Enhancement of gluconic acid production by *Aspergillus niger* from by-products as glucose source using pressurized air conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnol ogy*, 98(9), 2146–2153.
- Fleischer, D. M., Venter, C., & Vandenplas, Y. (2016).** Hydrolyzed formula for every infant?. *Protein in neonatal and infant nutrition: Recent updates*, 86, 5–65.
- Foda, M. S., Moharam, M. E., Ramadan, A., & El-Bendary, M. A. (2012).** Over production of milk clotting enzyme from *Rhizomucor*

- miehei* through adjustment of growth under solid state fermentation conditions. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(8), 579–589.
- Garfin, D.E.** (1990). Purification procedures electrophoretic methods. *In: Methods in enzymology*. Murray, E. D. and Dentscher, P. J. (Eds.), 182: 425 – 441.
- Ghani, M., Ansari, A., Aman, A., Zohra, R. R., Siddiqui, N. N., & Qader, S. A. U.** (2013). Isolation and characterization of different strains of *Bacillus licheniformis* for the production of commercially significant enzymes. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(4), 691–697.
- Gimenes, N. C., Silveira, E., & Tambourgi, E. B.** (2021). An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications . *Separation & Purification Reviews*, 50(3), 223–243.
- Gopalakrishnan, S., Arigela, R., Thyagarajan, S., & Raghunathan, R.** (2022). Comparison and evaluation of enumeration methods for measurement of fungal spore emission. *Journal of Aerosol Science*, 165, 106033.
- Guo, Y., Li, X., Jia, W., Huang, F., Liu, Y., & Zhang, C.** (2021). Characterization of an intracellular aspartic protease (PsAPA) from *Penicillium* sp. XT7 and its application in collagen extraction. *Food Chemistry*, 345, 128834.
- Gurumalles, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S.** (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International journal of biological macromolecules*, 128, 254–267.

- Ha, M., Bekhit, A. E. D., Carne, A., & Hopkins, D. L. (2013).** Comparison of the proteolytic activities of new commercially available bacterial and fungal proteases toward meat proteins. *Journal of food science, 78(2)*, C170–C177.
- Habtu, E., Mekonnen, B., Kiros, H., Fesseha, H., & Getachew, B. (2020).** Meat tenderization of efficiency of papain, bromelain and Zingiber officinale on old aged beef carcass of local zebu cattle. *Journal of Trends in Technical & Scientific Research, 4(1)*, 9–15.
- Hailemichael, F. (2021).** Production and industrial application of microbial aspartic protease: a review. *International Journal of Food Engineering and Technology, 5*, 85–90.
- Hakim, A., Bhuiyan, F. R., Iqbal, A., Emon, T. H., Ahmed, J., & Azad, A. K. (2018).** Production and partial characterization of dehairing alkaline protease from *Bacillus subtilis* AKAL7 and *Exiguobacterium indicum* AKAL11 by using organic municipal solid wastes. *Heliyon 4:e00646*.
- Hamza, T. A., & Woldesenbet, F. (2017).** Optimization of culture growth parameters for production of protease from bacteria, isolated from soil. *Biosci Bioeng, 3*, 1–0.
- Han, J., Kong, T., Jiang, J., Zhao, X., Zhao, X., Li, P., & Gu, Q. (2023).** Characteristic flavor metabolic network of fish sauce microbiota with different fermentation processes based on metagenomics. *Frontiers in Nutrition, 10*, 1121310.1:18.

- Hernández–Martínez, R., Gutiérrez–Sánchez, G., Bergmann, C. W., Loera–Corral, O., Rojo–Domínguez, A., Huerta–Ochoa, S., Regalado–González, C., & Prado–Barragán, L. A. (2011).** Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry*, *46*(10), 2001–2006.
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X. C., Meijer, M., Kraak, M., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2020).** Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in mycology*, *95*, 5–169 .
- Hsiao, N. W., Chen, Y., Kuan, Y. C., Lee, Y. C., Lee, S. K., Chan, H. H., & Kao, C. H. (2014).** Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. *Electronic Journal of Biotechnology*, *17*(2), 89–94.
- Huang, X., Men, P., Tang, S., & Lu, X. (2021).** *Aspergillus terreus* as an industrial filamentous fungus for pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, *69*, 273–280.
- Huff–Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005).** Mechanisms of water–holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, *71*(1), 194–204.
- Inyawilert, W., Jadpram, O., Wonangkarn, A., Aeksiri, N., Wuthijaree, K., & Phinyo, M. (2020).** Isolation and Identification of Seed–Borne Fungi of Maize Grains from Cultivated in Phitsanulok Province, Thailand. *Agricultural magazine*, *17*(1), 38–47.

- Ja'afaru**, M. I., Chimbekujwo, K. I., & Ajunwa, O. M. (2020). Purification, characterization and de-staining potentials of a thermotolerant protease produced by *Fusarium oxysporum*. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 64(4), 539–547.
- Jadhav**, H. P., Sonawane, M. S., Khairnar, M. H., and Sayyed, R. Z. (2020) Production of alkaline protease by rhizospheric *Bacillus cereus* HP\_RZ17 and *Paenibacillus xylanilyticus* HP\_RZ19. *Environ Sustain* 3:5–13.
- Jahanbin**, S. (2021). Chemical determinants of digestibility of proteins and bio-availability of amino acids and identification of effective indicators of heat damage in animal products (*Doctoral dissertation, University of Guelph*), 186 .
- Jioe**, I. P. J., Shiesh, C. C., & Lin, H. L. (2023). Bitterness of Papaya Milk Is Related to Protein and Free Amino Acid Contents, with Phenylalanine and Tyrosine/Tryptophan Levels Being the Most Important. *HortScience*, 58(3), 261–267.
- Jisha**, N . V., Smitha, B. R., Pradeep, S., Sreedevi, S., N Unni, K., Sajith, S., & Benjamin, S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in enzyme research*, 1(03), 39–51.
- Kalaiselvan**, P., Dutta, D., Konda, N. V., Sharma, S., Kumar, N., Stapleton, F., & Willcox, M. D. (2023). Effect of Deposition and Protease Digestion on the Ex Vivo Activity of Antimicrobial Peptide-Coated Contact Lenses. *Nanomaterials*, 13(2), 336–349.
- Kamal**, S., Rehman, S., & Iqbal, H. M. (2017). Biotechnological valorization of proteases: from hyperproduction to industrial

- exploitation—a review. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 36(2), 511–522.
- Karray**, A., Alonazi, M., Horchani, H., & Ben Bacha, A. (2021). A novel thermostable and alkaline protease produced from *Bacillus stearothersophilus* isolated from olive oil mill sols suitable to industrial biotechnology. *Molecules*, 26(4), 1139.
- Kazhkenovna**, B. R., Kokomanovna, K. A., Begezhanovna, S. Z., Sovetbekovna, Z. A., & Erkinbekkizi, T. I. (2020). Screening of *Aspergillus Fungi* for extra cellular protease and collagenase production. *Scientific journal Reports of the NAS RK*, (2), 36–40.
- Kemp**, C. M., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., Buttery, P. J., & Parr, T. (2010). Tenderness—An enzymatic view. *Meat science*, 84(2), 248–256.
- Khademi**, F., Abachi, S., Mortazavi, A., Ehsani, M. A., Tabatabaei, M. R., & Malekzadeh, F. A. (2013). Optimization of fungal rennet production by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis* under solid substrate fermentation system. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 5(2), 115–121.
- Khootama**, A., Putri, D. N., & Hermansyah, H. (2018). Techno-economic analysis of lipase enzyme production from *Aspergillus niger* using agro-industrial waste by solid state fermentation. *Energy Procedia*, 153, 143–148.
- Klich**, M.A.(2002). Identification of common *Aspergillus* species . 1st Edition. Wageningen ,Netherlands.116 p

- Kline**, R. W., & Stewart, G. F. (1948). Glucose–protein reaction in dried egg albumen. *Industrial & Engineering Chemistry*, 40(5), 919–922.
- Koistinen**, H., Kovanen, R. M., Hollenberg, M. D., Dufour, A., Radisky, E. S., Stenman, U. H., Batra, J., Clements, J., Hooper, J. D., Diamandis, E., Schilling, O., Rannikko, A., & Mirtti, T. (2023). The roles of proteases in prostate cancer. *IUBMB life*, 75, 493–513.
- Koul**, M., & Singh, S. (2017). *Penicillium* spp.: Prolific producer for harnessing cytotoxic secondary metabolites. *Anti-Cancer Drugs*, 28(1), 11–30.
- Kuddus**, M. (Ed.). (2019). Enzymes in food biotechnology: production, applications, and future prospects. 912 .
- Kuila**, A., & Sharma, V. (Eds.). (2018). Principles and applications of fermentation technology. John Wiley & Sons. 4–5.
- Kumar**, S., Sharma, N. S., Saharan, M. R., & Singh, R. (2005). Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*, 40(5), 1701–1705.
- Laemmli**, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lass-Flörl**, C., Dietl, A. M., Kontoyiannis, D. P., & Brock, M. (2021). *Aspergillus terreus* species complex. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4), e00311–20.
- Lee**, H. C., Jang, H. S., Kang, I., and Chin, K. B. (2017). Effect of red bean protein isolate and salt levels on pork myofibrillar protein gels mediated by microbial transglutaminase. *LWT—food Science and Technology*, 76, 95–100.

- Li, C., Xu, D., Zhao, M., Sun, L., & Wang, Y. (2014). Production optimization, purification, and characterization of a novel acid protease from a fusant by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *European Food Research and Technology*, 238, 905–917.
- Li, S.;Yang, X.;Yang,S.;Zhu, M. and Wang,X.(2012).Technology prospecting on enzyme: Application, Marketing and Engineering .*Computational and Structural Biotechnology Journal*,2(3):1–11.
- Liang, F., Lin, L., He, T., Zhou, X., Jiang, S., and Lu, J. (2020). Effect of transglutaminase on gel properties of surimi and precocious Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) meat. *Food Hydrocolloids*, 98, 105261.
- Liu, D., Guo, Y., & Ma, H. (2023). Production of value-added peptides from agro-industrial residues by solid-state fermentation with a new thermophilic protease-producing strain. *Food Bioscience*, 53, 102534.
- Lopez, M., & Edens, L. (2005). Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7944–7949.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.
- Lumi Abe, C. A., Bertechini Faria, C., Fernandes de Castro, F., De Souza, S. R., dos Santos, F. C., Novais da Silva, C., José Tessmann, D & Barbosa-Tessmann, I. P. (2015). Fungi isolated from maize (*Zea mays* L.) grains and production of associated enzyme activities. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15328–15346.

- Luti, K., & Younis, R. (2014). An induction of undecylprodigiosin production from *Streptomyces coelicolor* by elicitation with microbial cells using solid state fermentation. *Iraqi J. Sci*, 55, 553–1562.
- Ma, X., Gao, M., Yin, Z., Zhu, W., Liu, S., & Wang, Q. (2020). Lactic acid and animal feeds production from *Sophora flavescens* residues by *Rhizopus oryzae* fermentation. *Process biochemistry*, 92, 401–408.
- Machado, A. R. G., Teixeira, M. F. S., de Souza Kirsch, L., Campelo, M. D. C. L., & de Aguiar Oliveira, I. M. (2016). Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 621–627.
- Maitig, A. M. A., Alhoot, M. A., & Tiwari, K. (2018). Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 12(4), 2059–2067.
- Mamo, J. & Assefa, F. (2018). The Role of Microbial Aspartic Protease Enzyme in Food and Beverage Industries. *Journal of Food Quality*, 2018:1–16.
- Mamo, J.; Orellana, J. F. S.; Yeleman, V.; Kangwa, M.; Fernandez-Lahore, M. H. and Assefa, F. (2020). Purification and Characterization of Aspartic Protease Produced from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under Solid-State Fermentation. *bioRxiv*, 20(20), 1–38 .
- Mandujano-González, V., Villa-Tanaca, L., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2016). Secreted fungal aspartic proteases: A review. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(2), 76–82.

- Marcial**, J., Pérez De Los Santos, A. I., Fernández, F. J., Díaz-Godínez, G., Montiel-González, A. M., & Tomasini, A. (2011). Characterization of an aspartic protease produced by *Amylomyces rouxii*. *Revista mexicana de ingeniería química*, *10*(1), 9–16.
- Mattedi**, A., Sabbi, E., Farda, B., Djebaili, R., Mitra, D., Ercole, C., Cacchio, P., Gallo, M. D., & Pellegrini, M. (2023). Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production. *Microorganisms*, *11*(6), 1106 – 1408.
- Matthews**, S. B., Waud, J. P., Roberts, A. G., & Campbell, A. K. (2005). Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate medical journal*, *81*(953), 167–173.
- Mauti**, G. O., Akol, J., Kaseha, W. M., & Ndaró, N. (2023). Activity of hydrolytic lipase enzyme synthesised by *Aspergillus terreus* isolated from petroleum-contaminated soil. *Botanica Lithuanica*, *29*(2) 59 – 69.
- McGinnis**, M. R. (2012). *Laboratory handbook of medical mycology*. Elsevier. **661 pp** .
- McKelvey**, S. M., & Murphy, R. A. (2017). Biotechnological use of fungal enzymes. *Fungi: Biology and applications*, 201–225.
- Medina**, J., Monreal, C. M., Orellana, L., Calabi-Floody, M., González, M. E., Meier, S., Borie, F., & Cornejo, P. (2020). Influence of saprophytic fungi and inorganic additives on enzyme activities and chemical properties of the biodegradation process of wheat straw for the production of organo-mineral amendments. *Journal of environmental management*, *255*, 109922.

- Mienda, B. S.,** Yahya, A., Galadima, I. A., & Shamsir, M. S. (2014). An overview of microbial proteases for industrial applications. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(1), 388–396.
- Mohamed, A. H.,** Balbool, B. A., & Abdel–Azeem, A. M. (2021). Aspergillus from different habitats and their industrial applications. In *Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 1: Biodiversity and Ecological Perspectives* . Cham: Springer International Publishing . pp. 85–106 .
- Mohd Azmi, S. I.,** Kumar, P., Sharma, N., Sazili, A. Q., Lee, S. J., & Ismail–Fitry, M. R. (2023). Application of Plant Proteases in Meat Tenderization: Recent Trends and Future Prospects. *Foods*, 12(6), 1336.
- Mokrani, S.,** & Nabti, E. H. (2024). Recent status in production, biotechnological applications, commercial aspects, and future prospects of microbial enzymes: A comprehensive review. *International Journal of Agricultural Science and Food Technology*, 10(1), 006–020.
- Mothe, T.,** & Sultanpuram, V. R. (2016). Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. *3 Biotech*, 6(1), 6–53.
- Muazu, A.** (2015). Production and characterization of extracellular protease enzyme from *Aspergillus niger* Using Different Agro–Industrial Residues. *International Journal of Science and Technology*, 4(12), 535–541.

- Naveed**, M., Nadeem, F., Mehmood, T., Bilal, M., Anwar, Z., & Amjad, F. (2021). Protease—a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*, 151, 307–323.
- Niehoff**, P. J., Müller, W., Pastoors, J., Miebach, K., Ernst, P., Hemmerich, J., Noack, S., Wierckx, N., and Büchs, J. (2023). Development of an itaconic acid production process with Ustilaginaceae on alternative feedstocks. *BMC biotechnology*, 23(1), 23:34.
- Nielsen**, J. E., Borchert, T. V., & Vriend, G. (2001). The determinants of  $\alpha$ -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering*, 14(7), 505–512.
- Niyonzima**, F. N., & More, S. S. (2015). Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. 3 *Biotech*, 5, 61–70.
- Novelli**, P.K., Barros, M.M., Fleuri, L.F., (2016). Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. *Food Chem.* 198,119–124.
- Nuñez**, S. M., Cárdenas, C., Pinto, M., Valencia, P., Cataldo, P., Guzmán, F., & Almonacid, S. (2020). Bovine skin gelatin hydrolysates as potential substitutes for polyphosphates: The role of degree of hydrolysis and pH on water-holding capacity. *Journal of Food Science*, 85(7), 1988–1996.
- Ooi**, C. K., Rasit, N., & Abdullah, W. R. W. (2021). Optimization of protease from *Aspergillus niger* under solid-state fermentation utilizing

- shrimp shell substrate. *Biointerface Res Appl Chem*, 11(6), 14809–14824.
- Ortuño, J.**, Mateo, L., Rodríguez–Estrada, M. T., & Bañón, S. (2021). Effects of sous vide vs grilling methods on lamb meat colour and lipid stability during cooking and heated display. *Meat Science*, 171, 108287.
- Osmolovskiy, A. A.**, Popova, E. A., Kreyer, V. G., Baranova, N. A., & Egorov, N. S. (2021). Vermiculite as a new carrier for extracellular protease production by *Aspergillus* spp. under solid–state fermentation. *Biotechnology Reports*, 29, e00576.
- Othman, B., & Sebo, N. H.** (2023). Utilization of Some Agro Wastes for the Production of Acid Protease by *Aspergillus niger*. *Journal of Survey in Fisheries Sciences*, 10(3S), 4319–4331.
- Palsaniya, P.**, Mishra, R., Beejawat, N., Sethi, S., & Gupta, B. L. (2012). Optimization of alkaline protease production from bacteria isolated from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(6), 858–865.
- Panda, S.K.**, Mishra, S.S., Kayitesi, E., Ray ,R.C., (2016) Microbial–processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: biotechnology and scopes. *Environ Res* 146,161–172
- Panesar, P. S.**, Panesar, R., Singh, R. S., Kennedy, J. F., & Kumar, H. (2006). Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*:

- International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(4), 530–543.
- Park, Y. K.**, De Santi, M. S. S., & Pastore, G. M. (1979). Production and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Food Science*, 44(1), 100–103.
- Patil, P. M.**; Kulkarni A. A. and Kininge , P.(2012). Production of Milk Clotting Enzyme from *Aspergillus oryzae* under Solid–State Fermentation using Mixture of Wheat Bran and Rice Bran. *International Journal of Scientific and Research Publications*,2(10),1–12.
- Pavlović, M.**, Šokarda Slavić, M., Ristović, M., Stojanović, S., Margetić, A., Momčilović, M., & Vujčić, Z. (2023). Optimization of solid–state fermentation for enhanced production of pectinolytic complex by *Aspergillus tubingensis* FAT43 and its application in fruit juice processing. *Letters in Applied Microbiology*, 76(8), ovad083.
- Pawar, K. S.**, Singh, P. N., & Singh, S. K. (2023). Fungal alkaline proteases and their potential applications in different industries. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1138401.
- Pisani, F. M.**; Rella, R.; Raia, C. A.; Rozzo, C.; Nucci, R.; Gambacorta, A.; Rosa, M. and Rossi, M. (1990). Thermostable  $\beta$ -galactosidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* Purification and properties. *European Journal of Biochemistry*, 187(2), 321–328.
- Pitt, J. I.**, & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* . New York: Springer. 519, p. 388.
- Prajapati, V. S.**, Ray, S., Narayan, J., Joshi, C. C., Patel, K. C., Trivedi, U. B., & Patel, R. M. (2017). Draft genome sequence of a

- thermostable, alkaliphilic  $\alpha$ -amylase and protease producing *Bacillus amyloliquefaciens* strain KCP2. *3 Biotech*, 7, 1–3.
- Punekar, N. S.** (2018). *Enzymes: catalysis, kinetics and mechanisms*. Springer.560.
- Purushothaman, K., Bhat, S. K., Singh, S. A., Marathe, G. K., & Rao, A. R. G. A.** (2019). Aspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. *International journal of biological macromolecules*, 139, 199–212.
- Putatunda, C., Kundu, BS., Bhatia, R .** (2019) Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus* sp. HD292. *Proc Natl Acad Sci India B Biol Sci* 89:957–965.
- Rawlings, N. D., & Salvesen, G.** (2013). *Handbook of proteolytic enzymes . Academic press*. 8040.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M.** (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110,1–20 .
- Rocha, F. T., Brandão–Costa, R. M., Neves, A. G. D., Cardoso, K. B., Nascimento, T. P., Albuquerque, W. W., & Porto, A. L. F.** (2021). Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774: Coffee ground residue for protease production by solid state fermentation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93, e20200867.
- Roy, S., Sarma, A., Paul, S., Jha, D. K., & Tayung, K.** (2023). Plant growth–promoting traits and activation of defense enzymes in traditional rice variety by fungal endophytes isolated from seeds of

- indigenous rice cultivars of Northeast India. *South African Journal of Botany*, 160, 483–492.
- Ruslan, N. F.**, Ahmad, N., Abas, A., Sanfilippo, A., Mahmoud, K., Munaim, M. S. A., & Nour, A. H. (2023). Sustainable Bioethanol Production by Solid State Fermentation: A Systematic Review .1–21
- Saccá, M. L.**, Barra Caracciolo, A., Di Lenola, M., & Grenni, P. (2017). Ecosystem services provided by soil microorganisms. In *Soil biological communities and ecosystem resilience* (pp. 9–24). Springer International Publishing.
- Saha, B. C.**, Kennedy, G. J., Bowman, M. J., Qureshi, N., & Dunn, R. O. (2019). Factors affecting production of itaconic acid from mixed sugars by *Aspergillus terreus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187, 449–460.
- Saito, M.**, & Machida, S. (1999). A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*, 40(2), 205–208.
- Sambrook, J.**, & Russell, D. W. (2006). Neutral polyacrylamide gel electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot4028.1–7.
- Sambrook, J.**, Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual . Cold spring harbor laboratory press.11,31.
- Sampaio e Silva, T. A.**, Knob, A., Tremacoldi, C. R., Brochetto–Braga, M. R., & Carmona, E. C. (2011). Purification and some properties of an extracellular acid protease from *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 2491–2497.

- Schmitt, V.,** Derenbach, L., & Ochsenreither, K. (2022). Enhanced L-malic acid production by *Aspergillus oryzae* DSM 1863 using repeated-batch cultivation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9*, 760500.
- Segal, I.H.**(1976). Biochemical Calculation (2nd ed). John Wiley and Sons, Inc serine protease from *Ficus religiosa*. *Food Chemistry*,131(4): 1295–1303.
- Shade, A.,** Jacques, M. A., & Barret, M. (2017). Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. *Current opinion in microbiology, 37*, 15–22.
- Sharma, N.** (2019). A review on fungal alkaline protease. *J. Emerg. Technol. Innov. Res. 6*, 261–273.
- Shetty, R.,** Vestergaard, M., Jessen, F., Hägglund, P., Knorr, V., Koehler, P., Prakash, H.S.; & Hobley, T. J. (2017). Discovery, cloning and characterisation of proline specific prolyl endopeptidase, a gluten degrading thermo-stable enzyme from *Sphaerobacter thermophiles*. *Enzyme and microbial technology, 107*, 57–63.
- Shivakumar, S.** (2012). Production and characterization of an acid protease from a local *Aspergillus* sp. by Solid substrate fermentation. *Archives of Applied Science Research, 4*(1), 188–199.
- Singh, P. K.,** Shrivastava, N., & Ojha, B. K. (2019). Enzymes in the meat industry. In *Enzymes in Food Biotechnology* (pp. 111–128). Academic Press.

- Singh, R.,** Mittal, A., Kumar, M., & Mehta, P. K. (2016). Microbial proteases in commercial applications. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 4(3), 365–374.
- Solanki, M. K.,** Abdelfattah, A., Sadhasivam, S., Zakin, V., Wisniewski, M., Droby, S., & Sionov, E. (2021). Analysis of stored wheat grain-associated microbiota reveals biocontrol activity among microorganisms against mycotoxigenic fungi. *Journal of Fungi*, 7(9), 781, 1–16.
- Song, P.,** Cheng, L., Tian, K., Zhang, M., Mchunu, N. P., Niu, D., Singh, S., Prior, B., & Wang, Z. X. (2020). Biochemical characterization of two new *Aspergillus niger* aspartic proteases. *3 Biotech*, 10, 1–9.
- Souza, P. M.,** Werneck, G., Aliakbarian, B., Siqueira, F., Ferreira Filho, E. X., Perego, P., Converti, A., Magalhaes, P.O., Junior, A. P. (2017). Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1103–1110.
- Souza, P.M.D,** Bittencourt, M.L.D.A., Caprara, C.C., de Freitas, M., de Almeida, R.P.C., Silveira, C., Fonseca, Y.M., Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, E.X.F., Junior, A.P., & Magalhães, P.O., (2015) A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz J Microbiol* 46(2):337–346
- Sun, Q.,** Chen, F., Geng, F., Luo, Y., Gong, S., & Jiang, Z. (2018). A novel aspartic protease from *Rhizomucor miehei* expressed in *Pichia pastoris* and its application on meat tenderization and preparation of turtle peptides. *Food chemistry*, 245, 570–577.

- Sun, Q., Zhang, B., Yan, Q. J., & Jiang, Z. Q. (2016). Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. *Food chemistry*, *213*, 708–713.
- Szczodrak, J., & Wiater, A. (1998). Selection of method for obtaining an active lactase preparation from *Penicillium notatum*. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, *38*(1), 71–75.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, *28*(10), 2731–2739.
- Tahir, M. A. (1979). *Effect of collagen on measures of meat tenderness*. The University of Nebraska–Lincoln.
- Tarek, H., Nam, K. B., Kim, Y. K., Suchi, S. A., & Yoo, J. C. (2023). Biochemical Characterization and Application of a Detergent Stable, Antimicrobial and Antibiofilm Potential Protease from *Bacillus siamensis*. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5774.
- Tebele SM, Gbashi S, Adebo O, Changwa R, Naidu K, Njobeh PB (2020) Quantification of multi-mycotoxin in cereals (maize, maize porridge, sorghum and wheat) from Limpopo province of South Africa. *Food Addit Contam – Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 37:1922–1938.
- Thakur, N., Kumar, A., Sharma, A., Bhalla, T. C., & Kumar, D. (2018). Purification and characterization of alkaline, thermostable and organic

- solvent stable protease from a mutant of *Bacillus* sp. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 217–224.
- Tharwat**, N., Sayed, M. A., & Fadel, H. M. (2014). Biochemical and molecular characterization of alkalothermophilic proteases purified from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry Research*, 31, 236–52.
- Theron**, L. W., & Divol, B. (2014). Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8853–8868.
- Tseng**, T. F., Liu, D. C., & Chen, M. T. (2000). Evaluation of transglutaminase on the quality of low-salt chicken meat-balls. *Meat Science*, 55(4), 427–431.
- Ulloa-Avellán**, O., Calderón-Hernández, A., Rubí-Chacón, R., & Vargas-Leitón, B. (2023). *Aspergillus* spp. Isolated from Lungs of Poultry (*Gallus gallus*) at the Mycology Laboratory, School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica between 2008 and 2021 and Associated Factors. *Journal of Fungi*, 9(1), 46–58.
- Umbrey**, Y., Divya, M., Das, T., Das, S., & Mahapatra, S. (2021). Isolation and identification of seed borne mycoflora associated with popular rice cultivars in North East India. *Journal of Cereal Research* 13 (Spl-1): 43–50. <http://doi.org/10.25174/2582-2675/2021,112852>.
- Usharani**, B., & Muthuraj, M. (2010). Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. *African Journal of Microbiology Research* 4(11), 1057–1063.

- Usman, A.,** Mohammed, S., & Mamo, J. (2021). Production, Optimization, and Characterization of an Acid Protease from a Filamentous Fungus by Solid-State Fermentation. *International Journal of Microbiology*, 2021(1), 6685963.
- Vandenbergh, L. P.,** Karp, S. G., de Oliveira, P. Z., de Carvalho, J. C., Rodrigues, C., & Soccol, C. R. (2018). Solid-state fermentation for the production of organic acids. *In Current developments in biotechnology and bioengineering* , 415–434.
- Verma, A. K.,** Umaraw, P., Singh, V. P., Kumar, P., & Mehta, N. (2019). Tender meat attracts consumers: beneath other mechanical processes in the meat industry tenderization is used globally. *Fleischwirtschaft international: Journal for Meat production and Meat processing*, (3), 36–43.
- Viniegra–González, G.,** Favela–Torres, E., Aguilar, C. N., de Jesus Romero–Gomez, S., Diaz–Godinez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 157–167.
- Vishwanatha, K. S.** (2009). Acid protease from *Aspergillus oryzae*: Structure–stability and enhancement of the activity by physical, chemical and molecular biological approaches (Doctoral dissertation, university of Mysore).
- Volesky, B.,** Luong, J. H., & Aunstrup, K. (1984). Microbial enzymes: production, purification, and isolation. *Critical reviews in Biotechnology*, 2(2), 119–146.

- Wagner**, L., Stielow, J. B., de Hoog, G. S., Bensch, K., Schwartze, V. U., Voigt, K., Alastruey-Izquierdo, A., Kurzai, O., & Walther, G. (2020). A new species concept for the clinically relevant *Mucor circinelloides* complex. *Persoonia—Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 44(1), 67–97.
- Wajeaha**, A. W., Asad, M. J., Mahmood, R. T., Zainab, T., Nazir, S., Khan, J., Shah, M. B., Ahmed, M., Shah, S. L., Ismail, M., Zaman, N., Ahmed, D., Khan, I., Rizwan, M. (2021). Production, purification, and characterization of alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its compatibility with commercial detergents. *BioResources*, 16(1), 291–301.
- Wang**, F., Ni, H., Cai, H.-N., and Xiao, A.-F. (2013). Tea stalks—a novel agro-residue for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* JMU-TS528. *Annals of Microbiology*, 63(3): 897–904.
- Wångsell**, F. (2006). *Design and Synthesis of Serine and Aspartic Protease Inhibitors* (Doctoral dissertation, Institutionen för fysik, kemi och biologi). 1–51.
- Ward**, O. P. (2011). Proteases. *Comprehensive biotechnology*, 2<sup>nd</sup> ed.; Moo-Young, M., Ed.; Academic Press: Burlington, USA, pp 571–582.
- Wardah**, Z. H., Chaudhari, H. G., Das, A., Prajapati, V. S., & Raol, G. G. (2024). Statistical optimization of the bioconversion of agricultural residue into L-glutaminase enzyme by *Aspergillus terreus* ZHG2 under solid-state fermentation. *Biologia*, 79(1), 321–332.

- Warner, R. D., Wheeler, T. L., Ha, M., Li, X., Bekhit, A. E. D., Morton, J., Vaskoska, R., Dunshea, F., Liu, R., Purslow, P., & Zhang, W. (2022).** Meat tenderness: Advances in biology, biochemistry, molecular mechanisms and new technologies. *Meat Science, 185*, 108657.
- Wei, M., Chen, P., Zheng, P., Tao, X., Yu, X., & Wu, D. (2023).** Purification and characterization of aspartic protease from *Aspergillus niger* and its efficient hydrolysis applications in soy protein degradation. *Microbial Cell Factories, 22*(1), 42,1–9 .
- Whitaker, J. (1972).** Principles of Enzymology for the Food Science. Marcel Wiking Co. , Battimor. 686 pp.
- White, A. ; Handler , P. and Smith, E. ( 1973 ).** Principles of Biochemistry Mc Graw–Hill Book company . Alba Kiston publication. New York .
- Wong ,D.I. ; Cooney ,L. C. ; Deman ,A. L. ;Dunnill, p. ;Humphrey , A. E. and Lilly ,M. D. (1974).** Fermentation and enzymes technology . Wiley and sons ,New York.
- Xue, Y., Yan, Q., Li, X., & Jiang, Z. (2024).** Characterization of a novel aspartic protease from *Trichoderma asperellum* for the preparation of duck blood peptides. *Applied Microbiology and Biotechnology, 108*(1), 131.
- Yadav, R. P., Patel, A. K., & Jagannadham, M. V. (2011).** Purification and biochemical characterization of a chymotrypsin–like serine protease from *Euphorbia neriiifolia* Linn. *Process Biochemistry, 46*(8), 1654–1662.

- Yegin, S.,** Fernandez–Lahore, M., Jose Gama Salgado, A., Guvenc, U., Goksungur, Y., & Tari, C. (2011). Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 949–960.
- Yimer, D., & Kebede, A.** (2014). Production and Characterization of Bacterial Protease from Isolates of Soil and Agro–Industrial Wastes. Haramaya University . 31.
- Yin, F. W.,** Sun, X. L., Zheng, W. L., Yin, L. F., Luo, X., Zhang, Y. Y., Wang, Y. F., Fu, Y. Q. (2023). Development of a Strategy for L–Lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae* Using *Zizania latifolia* Waste and Cane Molasses as Carbon Sources. *Molecules*, 28(17), 6234.
- Yin, L. J.,** Chou, Y. H., & Jiang, S. T. (2013). Purification and characterization of acidic protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118. *Journal of Marine Science and Technology*, 21(1), 14 : 105 – 110 .
- Yoshimi, A.,** Miyazawa, K., & Abe, K. (2016). Cell wall structure and biogenesis in *Aspergillus* species. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(9), 1700–1711.
- Yu, X. C.,** Ma, S. L., Xu, Y., Fu, C. H., Jiang, C. Y., & Zhou, C. Y. (2017). Construction and application of a novel genetically engineered *Aspergillus oryzae* for expressing proteases. *Electronic Journal of Biotechnology*, 29, 32–38..
- Yujie, G.;** Tao, T.; Peng, Y.; Yaru, W. ; Yaxin, R. ; Bin, Y. and L. Huiying, (2019). High–level expression and characterization of a novel

- aspartic protease from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 and its potential application in juice clarification, *Food Chem.* 281: 197–203.
- Zarrin, M., Ganj, F., & Faramarzi, S. (2016).** Analysis of the rDNA internal transcribed spacer region of the *Fusarium* species by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism. *Biomedical Reports*, 4(4), 471–474.
- Zhang, B., Sun, Q., Liu, H. J., Li, S. Z., & Jiang, Z. Q. (2017).** Characterization of actinidin from Chinese kiwifruit cultivars and its applications in meat tenderization and production of angiotensin I–converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *LWT*, 78, 1–7.
- Zhang, J., Qiao, W., & Luo, Y. (2023).** Mitochondrial quality control proteases and their modulation for cancer therapy. *Medicinal Research Reviews*, 43(2), 399–436.
- Zhang, L., Yi, H., Du, M., Ma, C., Han, X., Feng, Z., and Zhang, Y. (2012).** Enzymatic characterization of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* DSM 40587 in high salt and effect of enzymatic cross–linking of yak milk proteins on functional properties of stirred yogurt. *Journal of dairy science*, 95(7), 3559–3568.
- Zhao, G., Ding, L. L., Yao, Y., Cao, Y., Pan, Z. H., & Kong, D. H. (2018).** Extracellular proteome analysis and flavor formation during soy sauce fermentation. *Frontiers in microbiology*, 9, 1–7.
- Zhou, L. W., & May, T. W. (2023).** Fungal taxonomy: current status and research agendas for the interdisciplinary and globalisation era. *Mycology*, 14(1), 52–59.

## **Abstract**

Forty pure isolates were obtained from soil and grains (rice, wheat, barley and corn). Primary screening was performed for these isolates and thirty-two enzyme-producing isolates were selected. Secondary screening was performed using solid-state fermentation to select the most efficient isolate in producing aspartic protease enzyme. The isolate (G94) was the best among these isolates. This isolate was identified and it was found to be *Aspergillus terreus* mold. Toxin testing also showed that the local isolate of *Aspergillus terreus* mold (G94) does not produce aflatoxins. The isolate was genetically identified using the ITS rRNA test, which showed 99.55% similarity with *Aspergillus terreus* mold, which was registered in the gene bank under the name *Aspergillus terreus* SFH4 (LC719967) .

The optimum conditions for the production of aspartic protease enzyme from the local isolate of *Aspergillus terreus* SFH4 mold were studied. It was observed that wheat bran is the best medium for enzyme production, the optimal wetting solution ratio is (3:1), and the pH was 5. It was also found that the best solution among the solutions used for extraction was acetate buffer with a pH of 5. The best inoculum size was 2 ml ( $1 \times 10^6$  spores/g solid), and the organic nitrogen source casein gave the highest enzyme productivity. It was observed that the best incubation period for the production of aspartic protease enzyme was 6 days, and the temperature was 30°C. The crude extract of aspartic protease enzyme was concentrated using ammonium sulfate salts, and the best saturation ratio was 50-70%, and then the process membrane osmosis (dialysis) was used for get rid of ammonium sulfate salts, after which the gel filtration step was used for a Sephadex G-100 column, as the results showed through measuring the absorbance at a wavelength of 280 nanometers that the recovery parts included three protein peaks of the enzyme extract, and after measuring the enzymatic activity of the three peaks, the activity of the aspartic protease enzyme appeared in the second peak, while no enzymatic activity

appeared in the other peaks (the first and third), then the purity of the enzyme was determined using the electrophoresis technique and the purity of the enzyme was observed through the appearance of a single protein band in the gel.

The pure aspartic protease enzyme and the partially purified enzyme were characterized. It was found that the molecular weight of the purified enzyme was (35) kilodaltons, and that the optimum pH for the pure and partially purified aspartic protease enzyme was (5), and that the pure and partially purified enzyme showed stability in a pH range of numbers ranging from (4-5) when incubated at a temperature of 35°C for 30 minutes. The optimum temperature for the pure and partially purified enzyme was 55°C, and the completely purified and partially purified enzyme showed stability in a range of temperatures ranging from (15-55)°C. The activation energy required for substrate conversion to products was (13.89) kilocalories/mol, while the value of the denaturation of the aspartic protease enzyme was (95.97) kilocalories/mol. The kinetic constants of the purified aspartic protease enzyme were studied by using different concentrations of casein as a substrate. The effect of activators and inhibitors on the activity of the aspartic protease enzyme was studied at a concentration of (1, 5) millimolar. Some activators played a role in activating the activity of the aspartic protease enzyme, while the enzyme activity decreased significantly in ferric at a concentration of 5 millimolar, while the enzyme activity decreased. A slight decrease was observed with the use of sodium, while the enzyme lost most of its activity when using the Pepstatin compound .

The partially purified enzyme was used in tenderizing meat. Qualitative and sensory tests were conducted on meat treated with aspartic protease enzyme at a concentration of (0.5%) and distilled water for immersion periods of (30, 60, 90, 120) minutes. It was observed that the moisture content and water holding capacity increased in the meat treated with the enzyme and the meat treated with distilled water. The pH, volume of the released

extract, and percentage of weight loss during cooking decreased in the meat treated with the enzyme and the meat treated with distilled water. It was also observed that the total protein and non-protein tyrosine/tryptophan coefficient value increased for both samples treated with the enzyme and distilled water compared to the untreated meat sample. It was observed that the percentage of total dissolved nitrogen (TSN) and the percentage of dissolved non-protein nitrogen increased for the meat sample treated with the enzyme and the meat treated with distilled water compared to the untreated sample, and the percentage decreased For soluble protein nitrogen (SPN) for both samples, it was higher than for the untreated meat sample.

The results of the sensory evaluation of the meat slices treated with aspartic protease enzyme at a concentration of 0.5% and with immersion periods of (30, 60, 90, 120) minutes and the untreated meat slices (control sample) showed that the sample immersed for a period of 120 minutes had the highest effect on the quality of juiciness, tenderness, and general acceptability.



# **Production, purification and characterization of aspartic protease from locally isolated mold *Aspergillus terreus* and its use in meat tenderization**

**Dissertation**

**Submitted To the Council of The College of Agriculture  
University of Basrah In Partial Fulfillment of the  
Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in  
Food Science (Biotechnology)**

**By**

**Sadeq Fenjan Hasnawi Hasouni**

**Master of Food Science**

**2017**

**Supervised By**

**Prof.Dr. Alaa Jabbar Abd Al- Manhel**

**Assist Prof.Dr.Zena Kadhim AL-Younis**

**2024**

ملحق ( 1 ) تسلسل القواعد النتروجينية للعزلة المحلية *Aspergillus terreus* SFH4  
**Aspergillus terreus SFH4 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA**  
 Sequence ID: [LC719967.1](#) Length: 605 Number of Matches: 1

- [See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 1 to 605 [GenBankGraphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1118 bits(605)	0.0	605/605(100%)	0/605(0%)	Plus/Plus

```

Query  1      GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTATG  60
          |||
Sbjct  1      GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTATG  60

Query  61      GCCCAACCTCCCACCCGTGACTATTGTACCTTGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTTGC  120
          |||
Sbjct  61      GCCCAACCTCCCACCCGTGACTATTGTACCTTGTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCGTTGC  120

Query  121     TGGCCGCCGGGGGGCGACTCGCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAACC  180
          |||
Sbjct  121     TGGCCGCCGGGGGGCGACTCGCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAACC  180

Query  181     CTGTTCTGAAAGCTTGCACTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAA  240
          |||
Sbjct  181     CTGTTCTGAAAGCTTGCACTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAA  240

Query  241     TGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAAT  300
          |||
Sbjct  241     TGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAAT  300

Query  301     TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGG  360
          |||
Sbjct  301     TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGG  360

Query  361     GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCG  420
          |||
Sbjct  361     GGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCG  420

Query  421     TCCCCCGGCTCCCGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCTCCGGTCCCTCGA  480
          |||
Sbjct  421     TCCCCCGGCTCCCGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCTCCGGTCCCTCGA  480

Query  481     GCGTATGGGGCTTCGTCTTCCGCTCCGTAGGCCCGGCGCGCCCGCCGACGCATTTATT  540
          |||
Sbjct  481     GCGTATGGGGCTTCGTCTTCCGCTCCGTAGGCCCGGCGCGCCCGCCGACGCATTTATT  540

Query  541     TGCAACTTGtttttttCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG  600
          |||
Sbjct  541     TGCAACTTGTTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG  600

Query  601     CCCCC  605
          ||||
Sbjct  601     CCCCC  605
    
```

ملحق ( 2 ) جداول التحليل الاحصائي

1- التحليل الاحصائي للمحتوى الرطوبي للحم البقر المعامل بأنزيم بروتيز الاسبارتيك بتركيز 0.5 % والماء المقطر ولفترات غمر مختلفة

S.O .V	D . F	S.S	M . S	Cal. F	Tab. F 0.05
Bet. Treat	2	150.828	75.41410093	314.8640771	3.403
Exp. Error	24	5.748	0.239513194		
Total	26	156.577			

2- التحليل الاحصائي للتقييم الحسي

أ- اللون

S.O .V	D . F	S.S	M . S	Cal. F	Tab. F 0.05
Bet. Treat	4	1.300	0.325	7.926829268	2.866
Exp. Error	20	.820	0.041		
Total	24	2.120			

ب - النكهة

S.O .V	D . F	S.S	M . S	Cal. F	Tab. F 0.05
Bet. Treat	4	1.940	0.485	6.466666667	2.866
Exp. Error	20	1.500	0.075		
Total	24	3.440			

ج - العصرية

S.O .V	D . F	S.S	M . S	Cal. F	Tab. F 0.05
Bet. Treat	4	29.760	7.44	10.50847458	2.866
Exp. Error	20	14.160	0.708		
Total	24	43.920			

ح - الطراوة

S.O .V	D . F	S.S	M . S	Cal. F	Tab. F 0.05
Bet. Treat	4	33.760	8.44	13.02469136	2.866
Exp. Error	20	12.960	0.648		
Total	24	46.720			

د- القبول العام

S.O .V	D . F	S.S	M . S	Cal. F	Tab. F 0.05
Bet. Treat	4	10.300	2.575	3.91337386	2.866
Exp. Error	20	13.160	0.658		
Total	24	23.460			

الملاحق (3) صفحة تسجيل عن *Aspergillus terreus* SFH4 في موقع NCBI

LOCUS LC719967 605 bp DNA linear PLN 02-AUG-2022  
 DEFINITION *Aspergillus terreus* SFH4 genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA.  
 ACCESSION [LC719967](#)  
 VERSION LC719967.1  
 KEYWORDS .  
 SOURCE *Aspergillus terreus*  
 ORGANISM [Aspergillus terreus](#)  
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;  
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;  
 Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 605)  
 AUTHORS Hasnawi,S.F., Al-Manhel,A.J.A. and AL-Younis,Z.K.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (19-JUL-2022) to the DDBJ/EMBL/GenBank databases.  
 Contact:Sadeq Fenjan Hasnawi  
 University of Basrah, College of Agriculture; Basrah 66002, Iraq  
 URL :<https://www.uobasrah.edu.iq>  
 REFERENCE 2  
 AUTHORS Hasnawi,S.F., Al-Manhel,A.J.A. and AL-Younis,Z.K.  
 TITLE Purification and characterization of Aspartic protease produced from locale fungi isolate by SSF and using in food system  
 JOURNAL Unpublished (2022)  
 COMMENT  
 FEATURES Location/Qualifiers  
     source 1..605  
         /collection\_date="2022-01-10"  
         /country="Iraq"  
         /db\_xref="taxon:33178"  
         /isolation\_source="Soil"  
         /mol\_type="genomic DNA"  
         /organism="[Aspergillus terreus](#)"  
         /strain="SFH4"  
     misc\_RNA <1..>605  
         /note="contains 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, and 28S rRNA"  
 BASE COUNT 107 a 185 c 174 g 139 t  
 ORIGIN

الملحق (4) كتاب شكر وتقدير

Ministry of Higher Education  
and Scientific Research  
University of Basrah  
College of Agriculture  
HUMAN RESOURCES

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة البصرة - كلية الزراعة  
الموارد البشرية

Ref: ٢٠٢٣/٦/١  
Date: ٢٠٢٣/٦/١٦ التاريخ: ٢٠٢٣  
العدد: ٢٠٢٣

الى // صادق فنجان حسناوي المحترم  
اثير عبد الامير عبد الجبار المحترم  
جعفر زمل ذريب المحترم  
صفا حسين باقر المحترمة  
رنا حميد مجيد المحترمة  
رغد عبد الكريم عبد العالي المحترمة

م/ شكر وتقدير

تحية طيبة....  
تقديرا لجهودكم المتميزة والمبذولة بعملكم في مختبرات قسم علوم الاغذية بكليتنا . لا يسعنا الا نتقدم  
لكم بخالص شكرنا وتقديرنا آمليين الاستمرار على هذا العطاء خدمه لجامعتنا وعراقنا الحبيب .  
مع التقدير.....

أ.د. ساجد سعد حسن  
العميد وكالة  
٢٠٢٣/٦/

College of Agriculture - University of Basrah  
كلية الزراعة - جامعة البصرة  
(١٣٩١هـ - ١٩٧١م)

نسخة منه الى:  
مكتب العميد...مع التقدير  
شعبة الموارد البشرية مع الاوليات للحفظ...مع التقدير  
وحدة الارشفة الالكترونية.. مع التقدير  
قسم علوم الاغذية...مع التقدير  
الموما اليهم....مع التقدير  
الصادرة

٢٥/٦ ضال

العراق / البصرة / موقع مجمع كليات كرمة علي  
agriculture.college@uobasrah.edu.iq