انتاج البروتيز المحلل للخثرة الدموية من انواع وعزلات فطرية متنوعة
2 . تحديد الظروف المثلى لانتاج الانزيم من الفطر *Pleurotus ostreatus*

عبد الله عبد الكريم حسن* سعود رشيد العاني* منى حمودي الجبوري**

تاريخ قبول النشر 2006/6/12

الخلاصـة:

حددت الظروف المثلى لتثبيت اقصى فعالية للبروتيز المحلل للخثرة الدموية المنتج من الفطر الغذائي *Pleurotus ostreatus* النامي في الوسط الصلب المؤلف اساسا من مخلفات السوس ، في دراسة تاثير عدد من المدعمات الغذائية في فعالية الانزيم ، سجلت اضافة 5% من كسبة بذور فول الصويا اعلى فعالية انزيمية (بتفوق معنوي حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى 0.01) بلغت 7.7 وحدة / مل . ان نسبة رطوبة وسط مخلفات السوس المدعم بـ 5% كسبة بذور فول الصويا المثلى 60% سجل الفطر *Pleurotus ostreatus* خلالها اعلى فعالية انزيمية بلغت 7.2 وحدة / مل وبلغت اقصى فعالية انزيمية عند الرقم الهيدروجيني 6 و 7 حيث بلغت 7.4 و 7.0 وحدة / مل ، كما وسجل الفطر *Pleurotus ostreatus* اعلى فعالية انزيمية عندما اضيف اللقاح الى الوسط الصلب بنسبة 2% وبمدة حضانة 21 يوما بدرجة 30°م . سجل الفطر *Pleurotus ostreatus* اقصى فعالية انزيمية في نهاية الاسبوع الثالث من الحضن وهي مرحلة اكتمال النمو الخضري – تمو الغزل الفطري- اذ بلغت 7.6 وحدة / مل وما لبثت ان انخفضت الى 6.2 وحدة / مل في نهاية الاسبوع الرابع من الحضن (مرحلة انتاج الاجسام الثمرية الغذائية) ومن ثم الى 4.4 وحدة / مل في نهاية الاسبوع الخامس (مرحلة بعد حصاد الاجسام الثمرية) .

المقدمـة:

تعد الفطريات من المصادر المايكروبية المنتجة لانزيمات البروتيز بانواعها المختلفة ، وسجلت البحوث انتاج انزيمات البروتيز المحللة للخثرة الدموية من انواع فطرية مختلفة (17,15,7,6,5,2). اجرى بالميري وجماعته (20) دراسة خصائص بروتيزخارج خلوي من الفطر P. ostreatus المنمى في الوسط السائل المؤلف اساسا من مرق البطاطا والدكستروز ومستخلص الخميرة ووجد في الدراسة نفسها ان الانزيم محلل لخثرة الليفين بالاضافة الى ركائز بروتينية اخرى. سجلت عدداً من البحوث انتاج انزيمات بروتيز محللة لخثرة الليفين بعد استخلاصها وتنقيتها من الاجسام الثمرية لعدد من الفطريات البازيدية وان انتاج الاجسام الثمرية للفطريات هي احدى ميزات الاوساط الزرعية الصلبة ، حيث غالبا ما يتعذر انتاج هذه الاجسام الثمرية في الاوساط الزرعية السائلة ومن الفطريات التي انتج من اجسامها الثمرية انزيم بروتيز محلل لخثرة الليفين الفطر P. ostreatus (7) والفطر Ganoderma lucidium (6) ، واشارت معظم الدراسات التي سجلت انتاج انزيمات البروتيز المحللة لخثرة الليفين بوساطة الفطريات النامية في الاوساط الغذائية الصلبة او السائلة بمدى رقم هيدروجيني 6-7 (20,19,15,5) .

غالبا ماتكون نسبة رطوبة الوسط المثلى للنمو هي النسبة نفسها المثلى لانتاج الانزيمات ، فأشار رجرتنام و بانو (22) الى ان نسبة الرطوبة 60% في الوسط الصلب هي المثلى لنمو الفطر P. ostreatus وهي النسبة نفسها المثلى لأنتاج اعلى فعالية من انزيمات البروتيز والسليليز والبيتا- كلوكوسايديز. سجل الباحث نوناكا وجماعته (19) اقصى فعالية لأنزيم البروتيز المنقى من الفطرين P. ostreatus و Grifola frondosa بدرجة 25-30 م وهي الدرجة الحرارية المثلى لنمو الغزل الفطري، في حين ذكر الباحث دايسارا (9) في دراسته التي شملت عدداً من الفطريات المنتجة لأنزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين ،ان جميع الانواع المدروسة سجلت اقصى فعالية لهذا الانزيم عند التحضين بدرجة 30 م .

ذكرت دراسات اخرى ان اقصى انتاج لأنزيم بروتيز محلل لخثرة الليفين لعدد من الفطريات الناقصة خلال ثلاثة ايام فقط (5,3,2) ، في حين بلغت هذه المدة 7-9 أيام عند انتاج انزيم البروتيز من الفطر P. ostreatus في ظروف الوسط السائل (12). وذكر نوناكا وجماعته (19) ان مدة الحضن اللازمة لانتاج انزيم البروتيز من الاجسام الثمرية للفطرين P. ostreatus وGrifola frondosa هي المدة اللازمة لانتاج الاجسام الثمرية والبالغة 18-25 يوماً وذلك في ظروف الوسط

* مركز تكنولوجيا الاغذية / دائرة البحوث الزراعية والتكنولوجيا الاحيائية / وزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد - العراق
** قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة بغداد

الصلب. اجريت غربلة 21 نوع وعزلة فطرية بالاضافة الى عدد من الاوساط الزرعية السائلة والصلبة في دراسة سابقة (11) وانتخب الفطرالغذائي Pleurotus ostreatus كأفضل فطر منتج لبروتيز محلل للخثرة الدموية . تهدف الدراسة الحالية الى تحديد الظروف المثلى لنمو الفطرPleurotus ostreatus للحصول على اعلى فعالية لهذا الانزيم .

المواد وطرائق العمل

زراعة الفطر*Pleurotus ostreatus* وانتاج اجسامه الثمرية

انتج الفطر (P. ostreatus w.v) بأستخدام طريقة الزراعة بالاكياس البلاستيكية لغرض انتاج الاجسام الثمرية (23) ، حيث لقحت مخلفات السوس المبسترة بالبخار بدرجة حرارة 60 م لمدة 6 ساعات بعد تبريدها الى درجة حرارة الغرفة بطريقة التلقيح الخلالي through spawning حيث خلط اللقاح بنسبة 3% من اساس الوزن الجاف للوسط وعبىء الوسط في اكياس بلاستيكية بأبعاد 30×50 سم بواقع 4 كيلوغرام وسط رطب لكل كيس وحضنت الاكياس بدرجة 27 م . ازيلت الاكياس عن الوسط الملقح بعد21 يوما او لحين الأكتمال التام لنموالغزل الفطري لغرض اثمار الفطر، رفعت نسبة الرطوبة في غرفة التحضين الى 80% عن طريق رش ارضية وجدران الغرفة بالماء 3-4 مرات باليوم مع اجراء التهوية المستمرة لطرد غاز CO2 مع المحافظة على درجة 27 م طيلة فترة الاثماربالاضافة الى توفير الضوء من شمعات الفلورسنت الاعتيادية بواقع 4 ساعات باليوم كحد ادنى ، مع رش الوسط بالماء النظيف بوساطة مرشات ذات فتحات دقيقة ، انتجت الاجسام الثمرية للفطر بعد 3-5 ايام وقدرت الكفاءة الاحيائية (النسبة المئوية لأوزان الاجسام الثمرية الى وزن الوسط الزرعي الجاف) كما وقدرت الفعالية الانزيمية المحللة للخثرة الدموية بعد استخلاص الانزيم من الوسط .

استخلاص البروتيز المحلل للخثرة الدموية

استخلص الانزيم بأضافة دارىء الفوسفات ذو الرقم الهيدروجيني 6 الى الوسط الصلب المشبع بالنمو الفطري (بعد تجزئة الوسط) بنسبة 1:3 (وزن : وزن) وخلط جيدا مع الرج ثم رشح خلال قماش شاش (4 طبقات) للتخلص من الاجزاء الصلبة كبيرة الحجم ، نبذ الراشح بالمنبذة المبردة بسرعة 4000 دورة بالدقيقة لمدة 15 دقيقة ثم قدرت الفعالية الانزيمية للطافي .

تأثير المدعمات الغذائية في انتاج الانزيم

اضيفت 5% من المدعمات الغذائية التي شملت نخالة الحنطة والشرش ومسحوق الذرة الصفراء وكسبة بذور فول الصويا وكسبة بذور زهرة الشمس في وسط مخلفات السوس وعقم الوسط ولقح كما ذكر سابقا وبعد انتاج الاجسام الثمرية قدرت الكفاءة الاحيائية والفعالية الانزيمية المحللة للخثرة الدموية .

تقدير نسبة البروتين في المدعمات الغذائية

قدرت نسبة البروتين (N×6.25) حسب طريقة مايكروكلدال Microkjeldahl بأستخدام جهاز Buchi-322 automatic nitrogen analyzer .

تقدير فعالية انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية طريقة الخثرة Clot Method

استخدمت الطريقة المذكورة من قبل كلاين (16) لتقدير فعالية انزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين في دراسات تعيين ظروف انتاج الانزيم ، انجزت الطريقة بأضافة 0.5 ميليلتر من محلول مولد الليفين (1%) الى 0.5 ميليلتر من دارىء البوريت ذي الرقم الهيدروجيني 7.8 في انبوبة الاختبار، واضيف في انبوبة اختبار اخرى 0.5 ميليلتر من محلول الانزيم مع 0.5 ميليلتر من دارىء البوريت ثم اضيف 0.2 ميليلتر من محلول الخثرين (20 وحدة / ميليلتر) ، اخيرا خلطت محتويات الانبوبتين وحضنت مباشرة بدرجة 37 م ثم حسب وقت تحلل الخثرة المتكونة .

قدرت الفعالية الانزيمية على اساس تحليل الخثرة الجلاتينية (خثرة الليفين) ، ان 100وحدة تكافىء كمية محلل الليفين Fibrinolysin المحلل لتلك الخثرة خلال 5 دقائق \ (One Unit = 500 lysis time) .

تعيين الظروف المثلى لأنتاج انزيم البروتيزالمحلل للخثرة الدموية

تحديد نسبة اللقاح المثلى

لقح وسط مخلفات السوس المزود بـ 5% كسبة بذور فول الصويا المرطب بنسبة 50% وبرقم هيدروجيني7 بنسب مختلفة من لقاح الفطر .P ostreatus شملت 1 و2 و 3 و4 و5 % من اساس الوسط الجاف بواقع ثلاث مكررات لكل نسبة وحسب طريقة الزراعة المذكورة في اعلاه وبعد الاستخلاص قدرت الفعالية الانزيمية .

تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل

حضر وسط مخلفات السوس المزود بـ 5% كسبة بذور فول الصويا بقيم رقم هيدروجيني 4-9 (بواقع ثلاث مكررات لكل قيمة) وذلك بترطيب

هذا الوسط بمحاليل دارئة مختلفة ، لقحت الاوساط بالفطرP. ostreatus وبعد الاستخلاص قدرت الفعالية الانزيمية .

تحديد درجة الحرارة المثلى

حضن وسط مخلفات السوس المزود بـ 5% كسبة بذور فول الصويا بالفطر P. ostreatus بقيم الرقم الهيدروجيني المثلى بدرجات حرارة شملت 20 و25 و 30 و 35 و40 م (بواقع ثلاث مكررات لكل درجة) وبعد انتهاء مدة الحضانة (21 يوم) استخلص الانزيم و قدرت الفعالية الانزيمية .

تحديد مدة الحضانة المثلى

لقح وسط مخلفات السوس المزود بـ 5% كسبة بذور فول الصويا بالفطر P.ostreatus بعد تحديد نسبة اللقاح Spawn المثلى والرقم الهيدروجيني الامثل ودرجة الحرارة المثلى وحضن لمدد زمنية شملت 1 و 2 و3 و4 و 5 اسابيع (بواقع ثلاث مكررات لكل مدة) ثم استخلص الأنزيم و قدرت الفعالية الانزيمية ازاء كل مدة .

تحديد نسبة رطوبة الوسط المثلى

رطب وسط مخلفات السوس المزود بـ 5% كسبة بذور فول الصويا بالدارىء المناسب لأمثل رقم هيدروجيني بنسب 40 و 50 و 60 و 70 و 80 % ، ولقح الوسط بنسبة اللقاح المثلى وحضن بدرجة الحرارة المثلى المستحصلة من نتائج الفقرات اعلاه وبمدة الحضانة المثلى ثم استخلص الأنزيم و قدرت الفعالية الانزيمية.

التحليل الاحصائي

اجريت التحاليل الاحصائية لنتائج البحث حسب اختباردنكن المتعدد الحدود Duncan Multiple Range Test واختبار الفرق المعنوي الاصغر Least Significant Difference(LSD) (24).

النتائج والمناقشة

تاثيرالمدعمات الغذائية في انتاج الانزيم

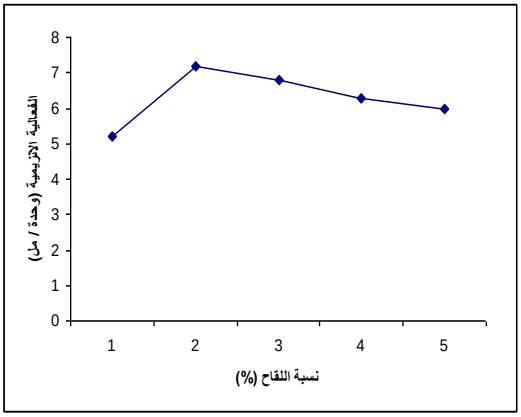
انتخب الفطر P. ostreatus (w.v) المنمى في وسط مخلفات السوس وذلك لتسجيله اقصى فعالية في تحلل الخثرة الدموية . وفي دراسة تاثير عدد من المدعمات الغذائية في فعالية الانزيم اضيفت نخالة الحنطة والشرش وكسبة بذور فول الصويا وكسبة بذور زهرة الشمس ومسحوق الذرة الصفراء بنسبة 5% (من اساس الوزن الجاف للوسط) ويبين الجدول (1) تاثير اضافة هذه المواد في وقت انتاج الاجسام الثمرية والكفاءة الحيوية ووقت تحلل الخثرة الدموية ، ويلاحظ من الجدول المذكور تسجيل افضل فعالية في تحلل الخثرة الدموية في وسط مخلفات السوس المدعم بكسبة بذور فول الصويا ، وبفعالية قدرها 7.7 وحدة / مل ، تليها اضافة نخالة الحنطة ومسحوق الذرة الصفراء التي بلغت فعالية تحلل الخثرة الدموية بوجودهما 6 و6.2 وحدة/مل ، على التوالي ، اذ لا توجد فروق معنوية بين هاتين المعاملتين (الجدول1) . كما سجلت اوقات انتاج الاجسام الثمرية (بعد اكتمال مرحلة النمو الخضري) بوقت مبكر (22 يوما) عند اضافة كسبة بذور الصويا مقارنة بـ 26 يوما في وسط التحكم ، وتظهر النتائج كفاءة نمو الفطر P. ostreatus (w.v) في وسط مخلفات السوس المدعم بكسبة بذور فول الصويا وذلك من خلال تسجيل اعلى كفاءة حيوية (77.6%) تفوقت معنويا على جميع المعاملات الاخرى (الجدول 1). يلاحظ من خلال الجدول نفسه ان هناك علاقة طردية بين المحتوى البروتيني للمادة المضافة وكل من الكفاءة الحيوية وكفاءة تحلل الخثرة الدموية وهذا ربما هو السبب الذي يعزى اليه زيادة نشاط انزيم البروتيز بوجود مواد غنية بالمحتوى البروتيني . ان زيادة الانتاجية سواء أكانت بصيغة أجسام ثمرية او كتلة حيوية (للغزل الفطري فقط) واقترانها بزيادة انتاج الانزيمات الخارجية يتفق مع ما جاء ت به دراسات عديدة في هذا المجال (27,26,14). ان اضافة المدعمات الغذائية وخاصة كسب او مسحوق بذور فول الصويا كمدعم لنموالفطريات الغذائية سجل في دراسات عديدة (21,10,8,1). كان لاضافة كسبة بذور فول الصويا في هذه الدراسة تاثير معنوي في زيادة انتاج انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية وهو السبب الذي ربما يعزى اليه كون هذا المصدر البروتيني كمحفز ملائما لانتاج الانزيم من قبل الفطر P. ostreatus (w.v) وتتفق هذه النتيجة مع دراسات اثبتت انتاج انزيمات بروتيز من بعض الفطريات في اوساط منتجات فول الصويا ، فقد سجلت زيادة في تحفيز انزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين من قبل الفطر Aspergillus fumigatus عندما نمى في وسط هوعبارة عن كسبة بذور فول الصويا (17) . وكذلك انتاج انزيم الناتوكاينيز المحلل لخثرة الليفين في غذاء متخمر اساسه حبوب فول الصويا (25) .

الجدول (1) تأثير المدعمات الغذائية المضافة الى وسط مخلفات السوس في وقت انتاج الاجسام الثمرية والكفاءة الاحيائية وفعالية انزيم البروتيز المحلل للخثرة الدموية للفطر (w.v) *P. ostreatus* .

تشير الحروف المتشابهه الى عدم وجود فروق معنوية وتشير الحروف المختلفة الى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى 0.01 .

نسبة اللقاح المثلى لانتاج الانزيم

يبين الشكل (1) ان نسبة اللقاح 2% من اساس الوزن الجاف لوسط مخلفات السوس المدعم بـ 5% كسبة بذور فول الصويا هي المثلى لانتاج الانزيم ، حيث سجلت اقصى فعالية لانزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين بلغت 7.2 وحدة / ميليلتر تلتها نسبة اللقاح 3% ، وبالرغم من تفوق فعالية الانزيم عند نسبة لقاح 2% الا انها لم تكن معنوية عند مقارنتها مع نسب اللقاح الاعلى (3-5%) . ازداد انتاج الانزيم بزيادة نسبة اللقاح الى حد اكثر من 3% يلاحظ انخفاض في انتاج الانزيم وربما يعزى السبب الى كثافة نمو الخيوط الفطرية وتنافسها على مغذيات الوسط الذي يؤدي بالنتيجة الى زيادة في النواتج الايضية الضارة كما ويؤدي ذلك الى استهلاك سريع للاوكسجين مما يؤثر سلبا على النمو المثالي وانتاج الانزيم .



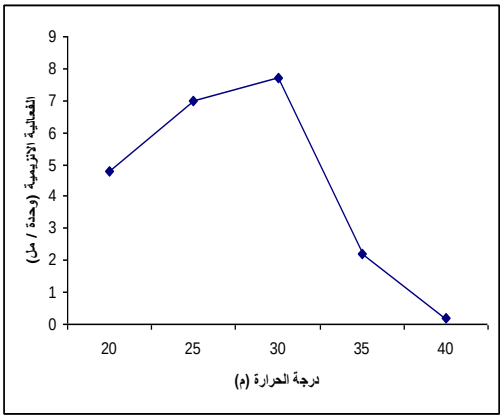
المدعمات الغذائية	المحتوى البروتيني (%)	وقت انتاج الاجسام الثمرية (يوم)	الكفاءة الاحيائية (%)	فعالية انزيم البروتيز المحلل لخثرة الدموية
نخالة الحنطة	5.2 ب ج	24 أ ب	74.8 ب	6.0 ب
الشرش	1.3 ج	25ب ج	71.8 ج	5.7 ب ج
كسبة بذورفول الصويا	18.7 أ	22 أ	77.6 أ	7.7 أ
مسحوق الذرة الصفراء	7.2 ب	24 أ ب	74.0 ب	6.2 ب
كسبة بذور زهرة الشمس	3.3 ج	25 ب ج	72.6 ب ج	5.8 ب ج
وسط السيطرة	-	26 ب ج	71.2 ج	4.3 ج

الشكل(1) نسبةاللقاح المثلى لأنتاج انزيم البروتيزالمحلل لخثرة الليفين من الفطر Pleurotus ostreatus(w.v)

درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم

يبين الشكل (2) انتاج انزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين بأقصى فعالية والتي سجلت في درجتي حرارة 25 و 30م ، اذ بلغت الفعالية الانزيمية 7.0و7.7 وحدة / ميليلتر ، على التوالي ، مع عدم وجود فروق معنوية بين هاتين المعاملتين ، ويبين الشكل نفسه ان هناك انخفاض شديد في فعالية الانزيم في الدرجات الحرارية العالية (35- 40 م) وهذا ربما يعزى بشكل رئيس الى تاثير درجات الحرارة في نمو الغزل الفطري ، ذلك أن الدرجات الحرارية المثلى لنمو الغزل الفطري وكما جاء في دراسات سابقة هي 25-30 م (23,18).

ان هذه النتائج تتفق مع ما جاءت به دراسات سابقة (26,13) الذي ذكر ان الدرجة الحرارية المثلى لنمو الفطر P. ostreatus هي 27 م سجل الفطر خلالها اعلى فعالية انزيمية (لعدد من الانزيمات) واعلى منتوج خلوي وكذلك تتفق النتائج مع دراسات اخرى في انتاج انزيم البروتييز المحلل لخثرة الليفين من قبل بعض الفطريات الناقصة (17,15) ومن عدد من الفطريات البازيدية (20,7,6) .



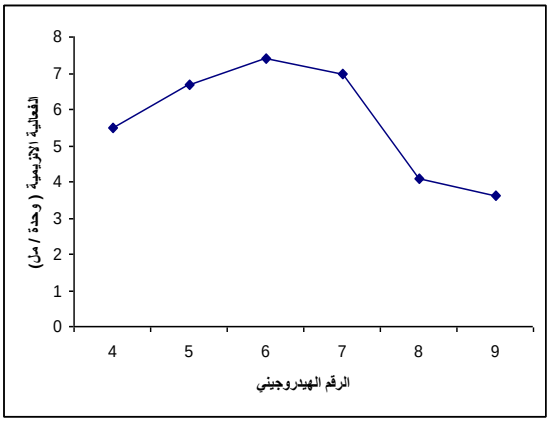
الشكل (2) درجة الحرارة المثلى لأنتاج انزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين من الفطر Pleurotus ostreatus(w.v) .

الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم

اظهرت النتائج تزايد انتاج انزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين من قبل الفطر P. ostreatus(w.v) بزيادة الرقم الهيدروجيني ، وبلغت اقصى فعالية انزيمية في قيم رقم هيدروجيني 6 و7 حيث بلغت الفعالية 7.4 و7.0 وحدة / ميليلتر ، على التوالي ، مع عدم وجود فروق معنوية بين هاتين المعاملتين ، ثم انخفضت الفعالية في قيم رقم هيدروجيني 8 و9 حيث بلغت 4.1 و3.6 وحدة / ميليلتر، على التوالي ، (الشكل 3) . والملاحظ من خلال هذه النتائج ان انتاج انزيم البروتيز من قبل الفطر P. ostreatus باقصى فعالية هي في قيم الرقم الهيدروجيني المثلى لنمو الغزل الفطري نفسه والذي يبلغ 6-7 حسب ما جاء ت به دراسات سابقة (23,18) .

ان نمو الفطر P.ostreatus في وسط صلب ذي رقم هيدروجيني مناسب يتيح للفطر انجاز كافة

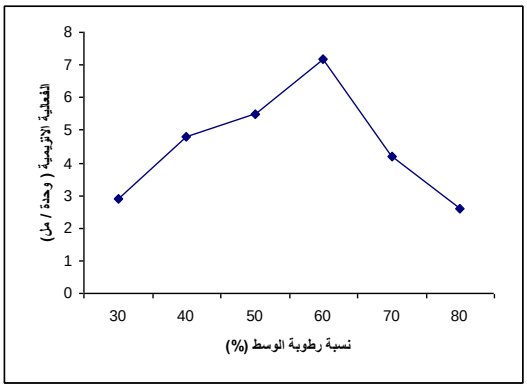
الفعاليات الحيوية (والتي اهمها افراز انزيماته الخارج خلوية لتحلل مكونات الوسط الى مواد ابسط يستغلها الفطر للنمو والطاقة) حيث تنجز مثل هذه الفعاليات بأمثل صورة وهذا ربما هو السبب الذي يعزى اليه اختلاف النشاط الانزيمي للفطر قيد الدراسة عند قيم الرقم الهيدروجيني المتطرفة. ان هذه النتائج تتفق مع دراسات مشابهة في هذا المجال (22,13,7).



الشكل (3)الرقم الهيدروجيني الأمثل لأنتاج انزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين من الفطر Pleurotus ostreatus(w.v)

نسبة رطوبة الوسط المثلى لانتاج الانزيم

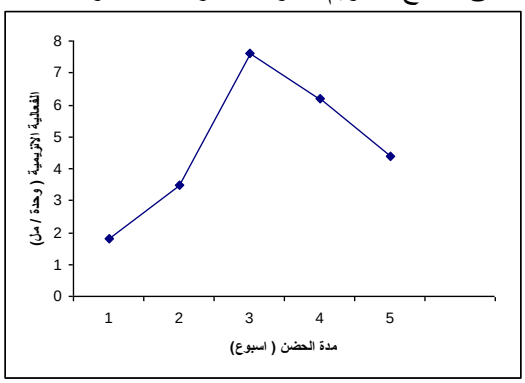
اشارت النتائج المدرجة في الشكل (4) الى أن لرطوبة الوسط الصلب تاثيرا واضحا في انتاج الانزيم ، فقد كانت نسبة رطوبة الوسط المثلى 60% التي سجلت فيها اعلى فعالية انزيمية بلغت 7.2 وحدة / ميليلتر، تلتها نسبة الرطوبة 50% والتي بلغت الفعالية الانزيمية فيها 5.5 وحدة / ميليلتر في حين كانت نسب الرطوبة الاخرى لها تاثير سلبي على انتاج الانزيم (الشكل4) . ان هذه النتائج تتفق مع ما جاءت به دراسة سابقة حول انتاج عدد من الانزيمات (من ضمنها انزيم البروتيز) من قبل الفطر P.ostreatus المنمى في الوسط الصلب (تبن الحنطة) (22) ، وتتفق كذلك مع ما اشار اليه عدد من الدراسات بكون المدى المناسب من الرطوبة في الوسط الصلب 50-60% وهو المدى الامثل لنمو معظم الفطريات مع الاداء الامثل لكافة الفعاليات الحيوية (15,10) .



الشكل (4) نسبة رطوبة الوسط لصلب المثلى لأنتاج انزيم البروتيزالمحلل لخثرة الليفين من الفطر P. ostreatus (w.v).

مدة الحضن المثلى لانتاج الانزيم

اظهرت النتائج ان فعالية انزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين المنتجة من قبل الفطر P.ostreatus كانت منخفضة في الاسبوع الاول والاسبوع الثاني من فترة الحضن ، حيث كانت الفعالية الانزيمية 1.8 و3.5 وحدة / ميليلتر ، على التوالي ، وبلغت الفعالية الانزيمية اقصاها في الاسبوع الثالث من فترة الحضن اذ بلغت 7.6 وحدة / ميليلتر وما لبثت ان انخفضت الى 6.2 وحدة/ ميليلتر في الاسبوع الرابع اذ لا توجد فروق معنوية بين فعالية الانزيم في الاسبوع الثالث والاسبوع الرابع ، في حين كان الانخفاض معنوياً في فعالية الانزيم في الاسبوع الخامس من مدة الحضن حيث بلغت الفعالية الانزيمية 4.4 وحدة / ميليلتر(الشكل 5) . ان مدة الحضانة لها تاثيرا مباشرا في انتاج الانزيم ويلاحظ ان هناك علاقة بطوري نمو الفطر P.ostreatus في الوسط الصلب مع انتاج الانزيم ، وتبين الصورة (1) ان نمو الفطر P.ostreatus في نهاية الاسبوع الثالث هي المرحلة المثلى لانتاج الانزيم مقارنة بالمراحل الاخرى.



الشكل (5) مدة الحضن المثلى لأنتاج انزيم البروتيز المحلل لخثرة الليفين من الفطر Pleurotus ostreatus(w.v).

الصورة(1) مراحل نمو الفطر Pleurotus ostreatus (w.v) في وسط مخلفات السوس المدعم بـ 5 % كسبة بذور فول الصويا .

الصورة من اليمين الى اليسار :

- بدايـة الأسبوع الأول : حال تلقيح الوسط الزرعي بلقاح الفطر.
- نهاية الأسبوع الثالث : النمو الكامل للغزل الفطري في الوسط الزرعي .
- نهاية الأسبوع الرابع : انتاج الأجسام الثمريةالناضجة .
- نهاية الأسبوع الخامس: الوسط الزرعي المشبع بالغزل الفطري بعد حصاد الاجسام الثمرية.

References:

1. Bano , Z. & Rajarathnam , S. 1988. *Pleurotus* Mushrooms. part II. Chemical coposition , nutritional value , post-harvest physiology , preservation and role as human food. Critical Reviews in Food Sci. & Nutri.27(2):87-159.
2. Batomunkueva , B. P. & Egorov , N. S. 2001. Isolation , purification , and resolution of the extracellular proteinase of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities . Microbiol. 70(5):519-523.
3. Bergkvist ,R. & Svard , P. O. 1964. Studies on the thrombolytic effect of a protease from *Aspergillus oryzae* . Acta. Physiolog. Scandanavia . 60:363-370.
4. Broadbent , D., Turner , R. W. & Walton , P. L. 1974. Proteolytic enzymes : Production by *Armillaria mellea* . In "Microbial Enzyme Production" (S. J. Gutcho , ed.). Noyes data corporation , New Jersey , P.204.
5. Cherdyntseva , T. A. & Egorov , N. S. 1989. Formation by fungi of the *Aspergillus* , *Acremonium* and *Verticilium* genera of extracellular proteases which coagulate blood plasma and lyse blood clots.Microbiol. 57(4):463-467.
6. Choi , H. S. & Sa , Y. S. 2000. Fibrinolytic and antithromboti protease from *Ganoderma lucidum*. Mycologia 92:545-552.
7. Choi , H. S. & Shin , H. H. 1998. Purification and partial characterization of a fibrinolytic protease in *Pleurotus ostreatus* . Mycologia 90:674-679.
8. Dhar , B. L. & Kapoor , J. N.1990. Post-composting nutritional supplementation for increased mushroom yield . Indian Phytopath.43(1):74-76.
9. Dissara ,Y. 2000. Fibrinolytic enzymes from filamentous fungi British Mycological Society Millennium Meeting : Topical Mycology , Liverpool,U.K.(Internet).
10. Hassan , A. A.,Natheer , A.M. & Mahmoud, A. R.2000.Effect of application of some organic sources on the oyster mush- room *Pleurotus ostreatus* yield.Iraqi J. Agric.5(4):186-190.
11. Hassan , A. A. 2005. Production of fibrinolytic protease from *Pleurotus ostreatus* by solid state fermentation. Ph.D.Thesis. University of Baghdad , Iraq.
12. Hong , J. S. and Namgung, H. 1975. Studies on the enzymes produced by *Pleurotus ostreatus* . II. Properties of neutral protease. Bull. Agric. Coll. Jeonbug Nat. Univ.6:107-112.

Sannia,G.2001.Purification and characterization and functional role of novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. Appl. Environ. Microbiol. 67(6):2754-2759.

21. Rajarathnam ,S.& Bano ,Z.1988.*Pleurotus* mushrooms.Part IB pathology,in vitro and in vivo growth requirements,and world status.Crit. Rev. Food Sci. Nutri.26(3):243-311.

22. Rajarathnam ,S. & Bano ,Z.1989. *Pleurotus* mushrooms. Part III. iotransformation of natural lignocellulosic wastes : commercial applications and implication. Crit. Rev. Food Sci. Nutri.28(1):31-113.

23. Stamets ,P.2000.Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ten speed press,Berkeley,Toronto.

24. Steel , P. G. D. & Torrie , J. H. 1980. Procedures of Statistics , A biometrical Approach , 2nd Ed. MacGraw Hill Book Co. Kagahusha , Tokyo , Japan.

25. Sumi , H., Hamada , H.,Tsushima ,H., Mihara ,H. & Muraki ,H.1999.A novel fibrinolytic enzyme(nattokinase) in the vegetable cheese natto;a typical and popular soybean food in the japanese diet. Japan functional food research association.(Internet).

26. Theradimani , M.,Marimuthu ,T.,Hepziba ,S. J. & Siddeswaran , K.2002.Correlation of cellulase and laccase activities with coirpith decomposition by white rot fungi.Mushroom Res.11(1):21-24.

27. Wood ,D. A. & Smith , J. F.1987. The cultivation of mushrooms (part I).The Mushroom J.187:633-637.

13. Jablonsky , I. 1981. Changes in biochemical and physiological activities of substrates colonized by fungi *Pleurotus ostreatus* , *Lentinus edodes* and *Agrocybe aegerita* . Mushroom Sci.11(2):659-664.

14. Jain , A. K. & Vgas , D. 2002. Yield response of *Pleurotus florida* on wheat straw in combination with other subsrrates Mushroom Res.11(1):19-21.

15. Kiessling , H. & Svensson , R. 1970. Influence of an enzyme from *Aspergillus oryzae* , protease I , on some components of fibrinolytic system. Acta.Chemie. Scandanavia 24:569-579.

16. Kline , D.L.1962. Enzymes in blood clotting . In "Methods in enzymology." (S.P. Colowick and N. O. Kaplan, eds). Acad- Mic press , New York and London.P.187

17. Larcher , G. Bouchara , J. P., Annaix , V. Symoens , F. Chabasse, D. & Tronchin , G. 1992. Purification and characterization of a fibrinolytic serine protease from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate . FEBS. 308:65-69.

18. Lin , Z. & Lin, Z. 1995. Fungi cultivation with Jun-Cao-pacific Edible Mushroom Training Center. P.110.

19. Nonaka, T., Dohmae , N., Hashimoto , T. & Takio , K. 1997.Amino for acyl - lysine specific acid sequences of metalloendopeptidases bonds from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruitbodies . J.Biol. Chem.272:30032-30039.

20. Palmieri , G., Bianco ,C., Cennamo , G., Giardina , P., Marino , G.,Mont ,M &

Production of fibrinolytic protease from various fungal isolates and species

2.Determination of optimum conditions for enzyme production from *Pleurotus ostreatus*

Hassan, A. A.* Alani, S. R*. AL-Jaboury, M. H.**

* Food Technology Center, Ministry of Science and Technology P.O.Box 765 , Baghdad , Iraq.
** Department of Biology, College of Science, Baghdad University

Abstract:

The optimum conditions for production of fibrinolytic protease from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* grown on the solid medium , Sus medium, composed of Sus wastes (produced from extracted medicinal plant *Glycyrrhiza glabra*) were determined. Addition of 5% of Soya bean seeds meal in Sus medium recorded a maximum fibrinolytic protease activity resulting in 7.7 units / ml. The optimum moisture content of Sus medium supplemented with 5% Soya bean seeds meal was 60% resulting in 7.2 units / ml.*Pleurotus ostreatus* produced a maximum fibrinolytic protease activity when the spawn rate,pH of medium and incubation temperature were 2,6 and 30°C, respectively. The maximum fibrinolytic protease activity was 7.6 units / ml when incubation period of *Pleurotus ostreatus* at the end of 3rd week (vegetative or mycelium stage), then lowered to 6.2 and 4.4 units/ml in the end of 4th week (reproduction or fruit bodies stage) and 5th week (after harvesting of fruit bodies), respectively. Although the minimum fibrinolytic protease activity was recorded in the end of 4th and 5th weeks, production of fibrinolytic protease regard to a byproduct after harvesting of fruit bodies.