

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

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

تاريخ قبول النشر 2008/4/2

الخلاصة:

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

المقدمة

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

استعملت نسب ترطيب مختلفة في تخمرات المواد الصلبة، فقد بين Malathi and Chakraborty [4] تأثير نسب ترطيب مختلفة تراوحت بين 35 - 80 % على انتاج البروتين المتعادل من احدى سلالات *A.flavus* في حين

البروتين القاعدي من احدى سلالات *A.oryzae* ودراسة انتاج انزيمات اللايباز والبروتيناز من انواع مختلفة من الفطريات كانت نسبة الترطيب المستعملة 50% عند تميتها في وسط نخالة الحنطة [6] .

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

وبصورة عامة تعد درجة 29 ± 1 درجة ملائمة لانتاج العديد من الانزيمات كالبروتيناز [5]، وانزيم بيتا - كلوكوسيداز [8] و اللايباز [6] ، والانزيمات المحللة للكتين [9 و 10] وانزيمات مختلفة اخرى [11] .

*معهد البحوث والتقنية [5] بالتعاون مع مركز البحوث الزراعية، جامعة بغداد.

**كلية العلوم للنبات/ جامعة بغداد، 25-50% على انتاج انزيم

وفق الطريقة الموصوفة من قبل Bradford [13].

اختيار سائل الترطيب :

استعملت خمسة محاليل للترطيب بعد تعديل الرقم الهيدروجيني لها ليصل إلى 7 وشملت (الماء المقطر) و (ماء الحنفية) و (محلول داريء الفوسفات بتركيز 0.2) و (محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.05 مولاري) و (محلول الكلايسين بتركيز 1 مولاري). وذلك لاختيار سائل الترطيب المناسب ، انتخب وسط التخمر نخالة الحنطة ورطب بسوائل الترطيب المذكورة اعلاه بنسبة 5 : 1 (وزن/ حجم) سائل ترطيب/مادة صلبة . ثم عُقم الوسط بالموصدة بدرجة حرارة 121 ° م وضغط 15 باوند/انج² مدة 15 دقيقة . ثم لقت الدوارق ولجميع المعاملات اعلاه بعالق الابواغ بواقع 1 × 10⁶ بوغ/10 غم مادة صلبة وحُضنت بدرجة حرارة 30 ° م مدة 72 ساعة .

تعيين الظروف المثلى لانتاج البروتين في وسط التخمر الصلب

اجريت دراسة تأثير بعض العوامل كنسبة الترطيب والرقم الهيدروجيني للوسط وحجم اللقاح ودرجة الحرارة ومدة التخمر على انتاج البروتين من قبل العزلة المحلية

A.niger var carbonarius باستعمال نخالة الحنطة وسطا صلبا بواقع (10) غم لكل دورق واستعمال محلول داريء الفوسفات في الترطيب ، اذ ثبتت جميع الظروف المشار اليها اعلاه باستثناء العامل المطلوب دراسة تأثيره .

هدفت الدراسة الحالية التعرف على الظروف المثلى لانتاج البروتين المتعادل من العزلة المحلية *Aspergillus niger var. carbonarius* باستعمال تقنية تخمرات الحالة الصلبة .

المواد وطرائق العمل

تم استخدام العزلة المحلية *Aspergillus niger var. carbonarius* في انتاج البروتين والمعزولة من جلود الحيوانات . طُبِق نظام تخمرات الحالة الصلبة في دوارق حجمية سعة 250 مللتر مزودة بسدادات قطنية وواقع مكررين لكل معاملة . واستعملت مادتان صلبتان هما نخالة الحنطة والذرة الصفراء بوصفهما مادتين اساسيتين اوليتين لتحديد المناسب منها لانتاج انزيم البروتيز ، واستعملت المواد الصلبة بمقدار 10 غم/دورق كلا على حدة .

ورطبت المواد الصلبة المذكورة اعلاه باستعمال محلول داريء الفوسفات بتركيز 0.2 مولاري ورقم هيدروجيني 7 ، وبنسبة ترطيب 5 : 1 (حجم /وزن) وذلك باضافة 50 مل من محلول داريء الفوسفات إلى 10 غم من المادة الصلبة ، ومزج سائل الترطيب مع المواد الصلبة وعقمت الدوارق بالموصدة بدرجة حرارة 121 ° م وضغط 15 باوند /انج² مدة 15 دقيقة .

ولقت الدوارق ولجميع المعاملات اعلاه بعالق الابواغ بواقع 10⁶ بوغ/10 غم مادة صلبة وحضنت بدرجة حرارة 30 ° م خلال 72 ساعة .

اتبعت الطريقة الواردة من قبل Murachi [12] في تقدير فعالية البروتيز المتعادل باستخدام كازين 0.5% بوصفها مادة اساس و تعرف الوحدة الانزيمية : بانها كمية الانزيم التي تسبب زيادة في الامتصاص الضوئي على طول موجي 280 نانوميتر مقدارها 0.01 في الدقيقة تحت الظروف القياسية. كما يمكن قياس تركيز البروتين فقد قدر

تعيين نسبة الترطيب المثلى لانتاج الانزيم

رُطب وسط نخالة الحنطة بمحلول داريء الفوسفات وينسب الترطيب الاتية : 1:4 و 1 : 4.5 و 1: 5 و 1 : 5.5 و 1 : 6 (حجم / وزن) سائل ترطيب / مادة صلبة ولقحت الدوارق بعالق الابواغ بواقع 1 × 10⁶ بوغ/غم مادة صلبة وحُضنت المزارع بدرجة حرارة 30 °م لمدة 72 ساعة ثم استخلص الانزيم وتم تقدير الفعالية والفعالية النوعية .

تعيين مدة التخمر المثلى لانتاج الانزيم :

حُضنت الدوارق الحاوية على وسط التخمر الصلب (نخالة الحنطة) بعد تقيحها بواقع 1 × 10⁶ بوغ /غم مادة صلبة بدرجة حرارة 30 °م لفترات زمنية مختلفة هي 24 و 48 و 72 و 96 و 120 ساعة بعد ان ثبتت الظروف البيئية الاخرى من درجة حرارة ورقم هيدروجيني وحجم اللقاح .

النتائج والمناقشة

لغرض دراسة كفاءة العزلة المحلية المنتخبة *Aspergillus niger var. carbonarius* على انتاج انزيم البروتينيز باستعمال تقنية تخمرات المزارع الصلبة فقد استعملت مخلفات ومواد نباتية أوساطا زرعية لاختبار افضل وسط تخمر صلب لانتاج أنزيم البروتينيز من هذه العزلة وهي (نخالة الحنطة ومسحوق الذرة الصفراء) أوساطا صلبة كلا على حدة ، وتبين أن وسط نخالة الحنطة هو افضل وسط تخمري صلب لانتاج الأنزيم مقارنة مع الوسط الأخر إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1500 وحدة / مل وفعاليتها نوعية 1200 وحدة / ملغم بروتين . بينما بلغت الفعالية الأنزيمية لمسحوق الذرة الصفراء 550 وحدة/ مل والفعالية النوعية 490 وحدة /ملغم بروتين الشكل (1) .وقد يعود سبب تفوق نخالة الحنطة على الوسط الاخر (الذرة الصفراء) إلى المحتوى العالي من البروتينات إذ تبلغ نسبة البروتين فيها (14.62)% بالمقارنة مع الذرة الصفراء التي تبلغ نسبة البروتين فيها (9.93)% . كما ان للخواص الفيزيائية للمواد المستعملة في تخمرات المزارع الصلبة تأثيرات مختلفة في انتاج الانزيمات مثل حجم الدقائق والمساحة السطحية التي تتعرض لفعال الاحياء المجهرية ومسامية الوسط [14 و 15 و 16]

تعيين الرقم الهيدروجيني الامثل لانتاج الانزيم

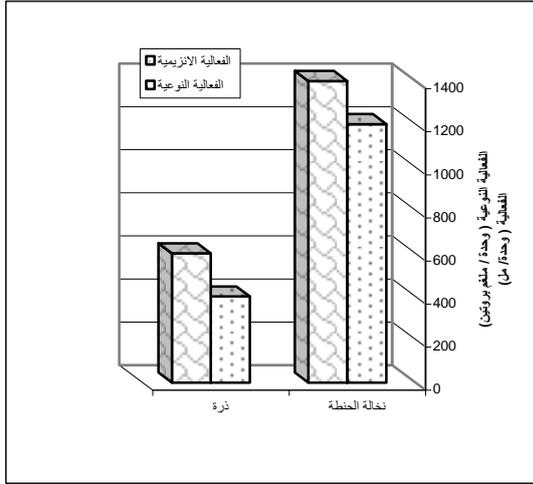
تم تحضير وسط نخالة الحنطة بارقام هيدروجينية تراوحت من (5.5 . 8) باضافة محلول داريء الفوسفات تركيز 0.2 مولاري ولقحت الدوارق بعالق الابواغ بواقع 1 × 10⁶ بوغ/غم مادة صلبة و وحُضنت بدرجة حرارة 30 °م لمدة 72 ساعة ثم استخلص الانزيم وقدرت الفعالية الأنزيمية والنوعية.

تعيين درجة الحرارة المثلى لانتاج الانزيم

لقح وسط نخالة الحنطة بعالق الابواغ 1 × 10⁶ بوغ/غم مادة صلبة وحُضنت بدرجات حرارة مختلفة (25 و 28 و 30 و 32 و 35) * م وخلال 72 ساعة ثم استخلص الانزيم وقدرت الفعالية الأنزيمية والفعالية النوعية .

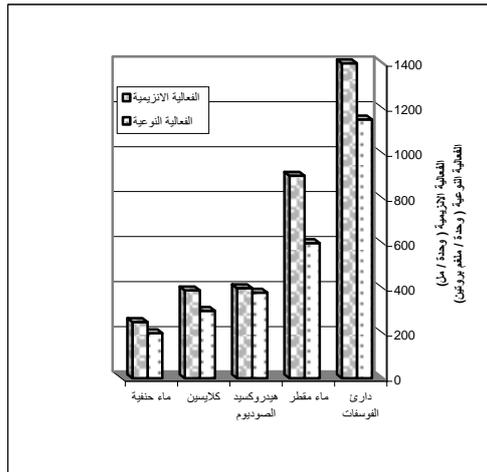
تعيين حجم اللقاح الامثل لانتاج الانزيم

لقح وسط نخالة الحنطة المرطب بمحلول داريء الفوسفات بنسبة 1 : 5 (حجم / وزن) والمعقم بالموصدة باعداد مختلفة من ابواغ الفطر تراوحت من (1 × 10³ . 1 × 10⁷) بوغ /غم وزن رطب وحُضنت المزارع تحت درجة حرارة 30 °م خلال 72 ساعة ثم استخلص الانزيم وتم تقدير الفعالية الأنزيمية والفعالية النوعية .



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

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

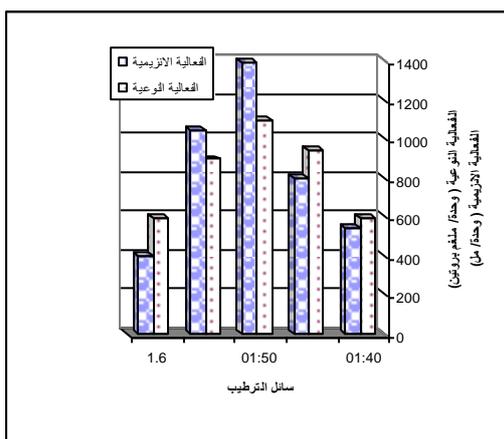


الشكل (2) : إنتاج أنزيم البروتياز من العزلة المحلية *Aspergillus niger var. carbonarius* عند تنميتها في وسط (نخالة الحنطة) المرطب بمحاليل مختلفة بنسبة (5 : 1) (حجم : وزن) .

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

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

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



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

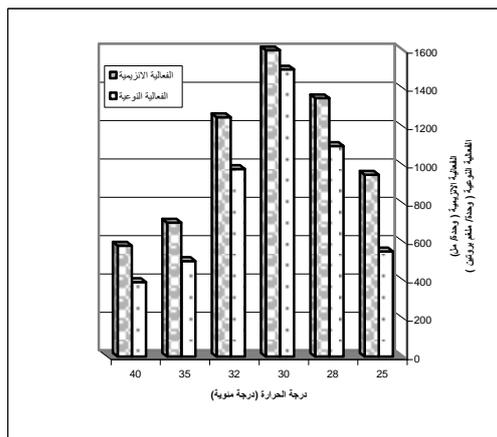
دُرس تأثير الرقم الهيدروجيني في إنتاج أنزيم البروتينيز باستعمال وسط نخالة الحنطة بأرقام هيدروجينية مختلفة (5.5 - 8) ، إذ أظهرت النتائج أن أعلى إنتاجية للأنزيم كانت عند رقم هيدروجيني 6.5، إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1600 وحدة/مل بينما بلغت الفعالية النوعية 1500 وحدة/ملغم بروتين. حدث انخفاض واضح في إنتاج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

ووجد في دراسة لإنتاج أنزيم البكتينيز من الفطر *A.niger* على وسط التخمر الصلب نخالة الحنطة بان الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل للإنتاج هو 6.5 - 7 ولمدة حضانة 48 ساعة [21] .

استعمل محلول الترطيب (داريء الفوسفات ذي رقم هيدروجيني 7) لترطيب وسط التخمر نخالة الحنطة وينسب الترطيب آتية: (4 : 1 و 4.5 : 1 و 5 : 1 : 5.5 : 1 و 6 : 1) حجم وزن (سائل ترطيب/مادة صلبة) (الشكل 3) .

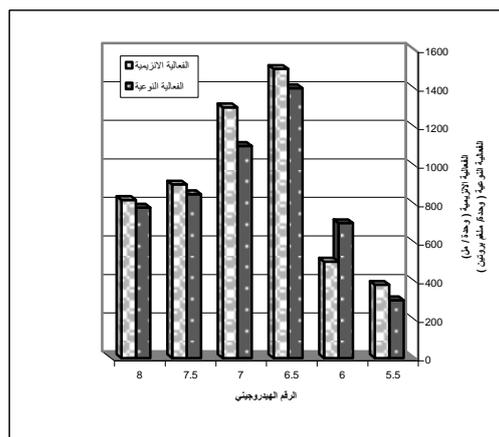
و يُلاحظ من خلال الشكل زيادة إنتاج الأنزيم مع زيادة نسبة الترطيب لغاية النسبة 5 : 1 (حجم : وزن) إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1450 وحدة/ مل وفعالية نوعية 1200 وحدة / ملغم بروتين، كما لوحظ انخفاض إنتاج الأنزيم بزيادة نسبة الترطيب عن (5 : 1) إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 500 وحدة/ مل وفعالية نوعية 700 وحدة /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

عند ارتفاع وانخفاض درجة الحرارة عن هذه الحدود [21,4]. يؤثر ارتفاع درجة الحرارة في إنتاج الانزيم اكثر من انخفاضها وهو ما لوحظ في هذه الدراسة عند رفع درجة حرارة المزرعة إلى 40 ° م لعدم ملائمة هذه الدرجة لنمو العفن من جهة وانخفاض ثبات الانزيم المنتج من جهة اخرى مقارنة بالدرجات الاوطأ.



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

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

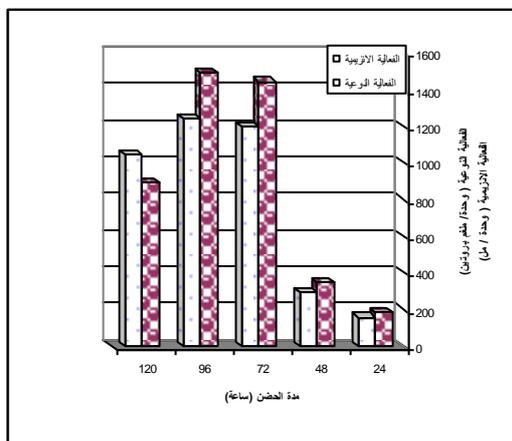


الشكل (4): إنتاج أنزيم البروتييز من العزلة المحلية *Aspergillus niger var. carbonarius* عند تنميتها في وسط (نخالة الحنطة) المرطب بمحلول داريء الفوسفات بنسبة (5: 1) حجم/وزن ويرقام هيدروجينية مختلفة .

يلاحظ من الشكل (5) بأن إنتاجية أنزيم البروتييز من الفطر *Aspergillus niger var. carbonarius* TFS1 تزداد بارتفاع درجة الحرارة من 25 - 30 م ، كما حصل انخفاض في كل من الفعالية الأنزيمية والفعالية النوعية عند ارتفاع درجة الحرارة عن 30 م . يلاحظ ان درجة الحرارة المثلى لأنتاج الانزيم كانت 30 م اذ بلغت الفعالية الانزيمية 1610 وحدة / مل وفعالية نوعية 1500 وحدة / ملغم بروتين ، وحصل انخفاض في كل من الفعالية الانزيمية والنوعية للانزيم عند ارتفاع درجة الحرارة عن 30 م . ان الانخفاض في درجات الحرارة عن الدرجة المثلى يؤدي إلى تباطؤ النمو وتأخر تخليق الانزيم لعدم ملائمة هذه الدرجة لنمو الفطر من جهة وانخفاض ثبات الانزيم من جهة اخرى .

تتفق درجة الحرارة المثلى لأنتاج انزيم البروتييز في هذه الدراسة وهي 30 م مع نتائج دراسات اخرى تناولت إنتاج انزيمات البروتييز من انواع الجنس *Aspergillus* حيث تراوحت درجات الحرارة المثلى لإنتاج هذه الانزيمات بين 28 - 30 م ، و اشارت هذه الدراسات إلى انخفاض فعالية الانزيم

إنتاجية الأنزيم مع زيادة مدة التخمير إلى 120 ساعة إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1100 وحدة / مل وفعاليتها نوعية 950 وحدة / ملغم بروتين . الشكل (7) .

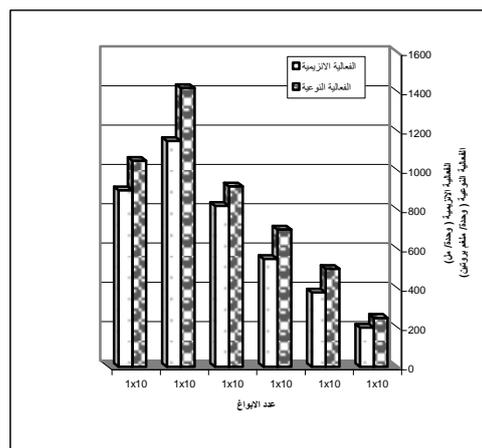


الشكل (7) : إنتاج أنزيم البروتييز من العزلة المحلية *Aspergillus niger var. carbonarius* عند تنميتها في وسط (نخالة الحنطة) المرطب بمحلول داريء الفوسفات بنسبة (5 : 1) حجم/وزن ويرقم هيدروجيني 6.5 وحضنها بدرجة حرارة 30 ° م ولمدة تخمر مختلفة .

كما بينت النتائج بأن مدة التخمير المثلى لإنتاج أنزيم البروتييز هي 96 ساعة ، إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1300 وحدة/مل وفعاليتها نوعية 1550 وحدة/ملغم بروتين ثم أخذت بالهبوط التدريجي مع تقدم مدة الحضانة إلى 120 ساعة شكل (7) .

تفسر الزيادة الواضحة في إنتاج الأنزيم خلال الطور الخضري بأن سرعة بناء الحوامض الامينية في الخلايا الخضرية يقدر بعشرة أمثال ما هو عليه في الابواغ وبذلك يكون تخليق البروتينات في الخلايا الخضرية اسرع من تخليقه في الابواغ وكلما كانت سرعة النمو اللوغاريتمي عالية كانت سرعة تخليق الأنزيم اعلى، ويصل إنتاج الأنزيم اقصاه في طور الثبات ثم ينخفض [24].

جاءت نتائج هذه الدراسة متفقة مع نتائج دراسات اخرى إذ وصل إنتاج أنزيم البروتييز لاحدى سلالات *A.oryzae* اقصاه بعد مرور 96 ساعة



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

بلغت الفعالية الأنزيمية 1200 وحدة/ مل وفعاليتها نوعية 1500 وحدة/ملغم بروتين انخفضت بعدها إلى 950 وحدة/ مل . كما بينت النتائج أن اضافة عدد قليل من الابواغ ($10^2 - 10^4$) إلى الوسط لا يعطي إنتاجية عالية للأنزيم مقارنة بالاعداد الاكثر ويعود ذلك إلى ان عدد الخلايا القليل لا يؤدي إلى نمو كثيف للكائن واستغلال مكونات الوسط بكفاءة عالية مما انعكس على إنتاج المواد الايضية وبضمنها الأنزيمات [22].

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

بينت النتائج بان مدة التخمير المثلى التي أعطت أعلى إنتاجية لأنزيم البروتييز من العزلة *Aspergillus niger var. carbonarius* على وسط نخالة الحنطة كانت 96 ساعة بدرجة حرارة 30 ° م ، إذ بلغت الفعالية الأنزيمية 1300 وحدة / ملغم بروتين ثم حصل انخفاض في

8. Macris ,B . J. ; Kekos, D. ; Evangelidou, X. ; Panayotou, M.G. and Rodis, P. 1987 .Solid state fermentation of straw with *Neurospora crassa* for CMCase and B- glucosidase production .*Biotechnolett.* 9 (9) :661 – 664 .
9. Kerem ,Z .; Friesem,D. and Hadar,Y. 1992. Lignocellulose degradation during SSF: *Pleurotus ostreatus* versus *phanerochaete chrysosporium* .*Appl . Environ . Microbiol.* 58 (4) : 1121 – 1127 .
10. Agosin , E. and Odier,E. 1985.Solid – state fermentation, lignin degradation and fermented by selected white – rot fungi . *Appl .Microbiol . Biotechnol .* 21 : 379 – 403 .
11. Considine ,P.J.;Buckley,R.J.; Griffin,T.O.; Touhy, M.G. and Coughlan,M.P. 1989. A Simple And Inexpensive Method Of Solid State Cultivation .*Bio technol .Tech.*3:85 – 90.
12. Murachi ,T. 1970 . Bromelain enzymes . In : *Methods in Enzymology* (ed . G.E . Perlman and L . Lorand).19 : 273 – 284 .*Academic Press . New york.*
13. Bradford , M. 1976 . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle protein . dybinding . *Analytical Biochemistry* , 72 : 248 – 254 .
- 14.الصفار ، منتهى عبد الكريم ، 1998. انتاج انزيم الفا - اميليز من *Bacillus MAG3* بواسطة تخمرات *stearothermophilus*. الحالة الصلبة وتنقيته . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة بغداد .
15. Kumar ,P.K.R. and Lonsane, B.K. 1987 . Gibberellic acid by solid state fermentation : Consistent and improved yields .*Biotech . Bioeng* .30(2) : 267 – 271.
- عندما لقمح الوسط بـ 1 × 10⁶ بوع /غم من الوسط المرطب بنسبة 1 : 3 (وزن :حجم) وحضن بدرجة حرارة 30 م° [18].

المصادر

1. Rehm , H.J.; Reed,G ; Puehler,A. and Stadler,P. 1993. *Biotechnology.* 2nd Ed.Vol. I: Biological fundamentals .VCH.Vevlag,Weinheim,Germany.
2. Bergkvist ,R . 1961 . Enzymes in pre – tanning . Swedish patent No.11134.
3. Pfleiderer , E . and Reiner,R. .1988 . Microorganisms in processing of leather . In : *Biotechnology* (ed.H.J.Rehm) .Vol – 6a : 730 – 743 .Verlag Chemie , Weinheim Deerfield Beach .
4. Malathi ,S.and Chakraborty,R. .1991 . Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid – state fermentation conditions for uses of depilation agent .*Appl .Environ . Microbiol.*55(3) : 712 – 716 .
5. Battaglino , R .A. ; Huergo,M.; Pilosof, A,M,R. .and Bartholomai, G.B. 1991 .Culture requirements of production of protease by *Aspergillus oryzae* in SSF.*Appl . Microbiol . Biotechnol .* 35 : 292 – 296 .
6. Rivera – Munoz , G ; Tinico – Valencia, J.R. ; Sanchez, S. and Farres,A. .1991 . Production of microbial lipases in solid state fermentation system. *Biotechnol Lett .* 13 (4) : 277 – 280 .
7. Pamment ,N . ; Robinson, C.W. ; Hilton, J. and Moo young, M. 1978. Solid state cultivation of *Chaetomium cellulyticum* on alkaline pretreated saw dust . *Biotechnol – Bioeng .* 20 : 1735 – 1744 .

- proteolytic enzymes by *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol* . 30 : 117 – 125 .
21. Viviana, M. and Ana, M.R. 1999. Application Of Doehlert Designs For Water Activity .PH, And Fermentation Time Optimization For *Aspergillus niger* Pectinolytic Activities Production In Solid – State And Submerged Fermentation . *Enzyme And Microbial Technology* . Vol.25:411 – 419.
22. Abdullah ,A.L. ; Tangerdy, R.P. and Murphy, V.G. 1985 .Optimization of solid substrate fermentation of Wheat straw .*Biotechnol . Bioeng* .27(1): 20 – 27 .
23. Sharma, O . P . and Sharma, K.D. 1980 . Changes In Properties Of Finished Indian Leather In Store Due To Fungal Infestation . *Interna . Biodeter .Bulletin* :ISSN. Vol.16.(3) : 73 – 78 .
24. Emtseva ,T.V. and Konovalov, S.A. . 1979 .Alkaline proteinases of microbiological origin (survey) .*Appl. Biochem. Microbiol* . 14 (5) : 511 – 523 .
16. Nigam , P. and Singh, D. 1994 Solid state (substrate) fermentation systems and their application in biotechnology . *J. Basic Microbiol* . 34 (6) : 405 – 423 .
17. Bhumiratana ,A.; Flegel, T.W.; Glinsukon, T. and Somporan, W. 1980 . Isolation and analysis of molds from soysauce Koji in Thailand .*Appl . Environ . Microbiol* . 39 : 430 – 435 .
18. حسن ، شذى سلمان (1996) . انتاج وتنقية وتوصيف البروتينيز القاعدي من العفن *Aspergillus oryzae* بطريقة تخمر المواد الصلبة . رسالة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة بغداد .
19. Hong Bai ; Shi – Jun Ge and Long – Xiang Zhang . 1999 . Total hydrolysis of food proteins by the combined use of soluble and immobilized protease . *International Journal of Food Science and Technology* . 34: 95 – 99.
20. Chopra ,S. and Mehta, P. 1985 .Influence of Various nitrogen and carbon sources on the production of pectolytic .Cellulolytic and

Optimum Conditions for the Production of Neutral Protease from local strain *Aspergillus niger var carbonarius*

*Essam F. Al-Jumaily**

*Khalid A. Habeb***

*Shaimaa E. Kadhum***

*Biotechnology Dept., Genetic Engineering and Biotechnology Institute, Baghdad University

** Biology Dept., College of Science for Women, Baghdad University

Abstract

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