* تحديد الظروف المزرعية المثلى لأنتاج انزيم البروتييز من الفطر *Metarhizium anisopliae*

د.محمد رضا عنون
كلية العلوم /جامعة القادسية

منى ابراهيم جاسم
كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة كربلاء

ELWEA12@YAHOO.COM

الخلاصة :-

عينت الظروف المثلى لإنتاج انزيم البروتييز من الفطر ***Metarhizium anisopliae*** وتم الحصول على اعلى انتاج للأنزيم بإستعمال الوسط المتكوّن من عصير التمر بتركيز 0.05 % كمصدر كاربوني والمدعم بـ 0.5 % من الجيلاتين كمصدر نايتروجيني وكان حجم اللقاح المستعمل 16% عند رقم هيدروجيني ابتدائي مقداره 5.5 بعد 72 ساعة من الحضن بالحاضنة الهزازة عند سرعة رج 100 دورة / دقيقة وبدرجة حرارة 30 مْ .

الكلمات المفتاحية :- انزيم البروتييز ، الفطر *M.anisopliae* ، عصير التمر

المقدمة:-

يعد الفطر *M.anisopliae* من شعبة Ascomycota من اهم الفطريات المستعملة في المقاومة الجرثومية كونه من الفطريات الآمنة غير الملوثة للبيئة ويمكن استعماله كبديل للمبيدات الكيميائية بكفاءة ، وله القدرة على اصابة عدد واسع من الافات الحشرية تقدر بـ 200 نوع تعود الى 50 عائلة حشرية فضلاً عن اصابته للقراد والحلم (1). يهاجم الفطر مضائفه عن طريق ملامسة سبوراته للسطح الخارجي لجدار اجسامها واختراقه من خلال افرازه لأنزيمات التحلل المائي مثل البروتييز والكايتنيز واللايبيز فضلا عن افرازه لسموم الدستروكسين والفيردوكسين داخل اجسام مضائفه محدثا القتل فيها (2) . ان الفطر *M.anisopliae* يتميز بافرازه لأنزيم البروتييز اكثر من باقي الأنزيمات (3) ، ويتميز الأخير بتنوعه الواسع الذي جذب الانتباه العالمي لاستعماله في مختلف التطبيقات الفسلجية والصناعية كصناعة الاغذية والجلود والمنظفات والعلاجات الصيدلانية وادارة النفايات فضلا عن كونه اداة مهمة في دراسة التركيب البروتيني لذلك اصبح يمثل 60-65 % من مبيعات السوق العالمي للانزيمات الصناعية (4 ; 5) ويعد تحديد الظروف المثلى لنمو الكائنات المجهرية من الامور ذات الاهمية البالغة للوصول الى افضل نمو لهذه الاحياء وبالتالي اقصى انتاجية للأنزيمات نظرا لاهميتها في الحفاظ على التوازن بين مختلف مكونات الوسط والتقليل من كمية المكونات غير المستخدمة في نهاية العملية التخمرية (6). وبهدف دراسة النظام الأنزيمي للفطر تضمن البحث تحديد الظروف المثلى لانتاج انزيم البروتييز المنتج من قبله والذي يمثل عامل الضراوة فيه .

---

*البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الثاني

المواد وطرائق العمل :-

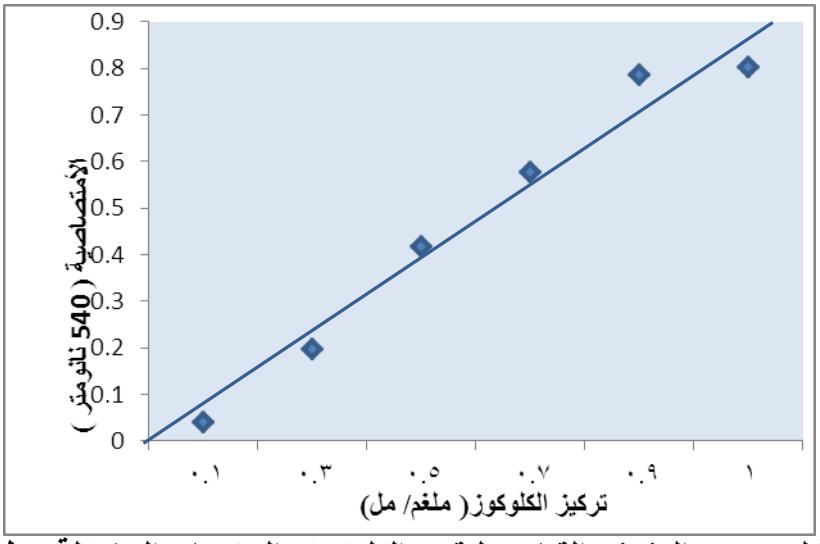
1- المصدر الكاربوني وتركيزه : أ- المصدر الكاربوني : - تحضير عصير التمر
استخدم عصير التمر الزهدي كمصدر كاربوني في وسط انتاج انزيم البروتييز من الفطر *M.anisopli*ae ، حضر العصير وفق الطريقة الموصوفة من قبل (7) اذ اضيف 500 مل من الماء المغلي الى 250غم من تمر الزهدي المزال منه النوى والأقماع وترك لمدة 24 ساعة للحصول على العصير ثم رشح باستخدام قماش الململ اعقبها عملية نبذ مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق للحصول على الراشح بشكل رائق. ثم خفف العصير المتحصل عليه الى النسبة المطلوبة من السكريات المختزلة .

1- تقدير السكريات المختزلة
قدرت السكريات المختزلة في وسط عصير التمر بطريقة (8) واعتمادا على المنحنى القياسي للكلوكوز كسكر مختزل .
2- عمل المنحنى القياسي للكلوكوز
- المحاليل المستعملة
محلول رقم (1) - محلول الكلوكوز الخزين (1 mg / ml) حضر هذا المحلول بأذابة 0.1 غم من الكلوكوز في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام عملية الأذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .
محلول رقم (2) - محلول 3,5 ثنائي نيترو حامض السالسيليك (3,5 Dinitrosalicylic acid , DNSA)
حضر هذا المحلول بأذابة 1 غم من المادة في 50 مل من الماء المقطر وبعد اتمام عملية الأذابة اضيف 20 مل من هيدروكسيد الصوديوم (2 مولر) ثم اضيف 30 غم من ترترات الصوديوم البوتاسيوم ($CuH_4KNaO_6.4H_2O$) وبعد اتمام الأذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر .
تم عمل المنحنى القياسي للكلوكوز بحسب الخطوات التالية :-
1- خفف محلول الكلوكوز القياسي بالماء المقطر للحصول على التراكيز (0.1 ، 0.3 ، 0.5 ، 0.7 ،0.9 و 1.0) ملغم / مل بحسب الجدول الاتي :-

رقم الأنبوبة	حجم محلول الكلوكوز الخزين (مل)	حجم الماء المقطر (مل)	كمية الكلوكوز (ملغم /مل)
1	**0.0**	**1.0**	**0.0**
2	**0.1**	**0.9**	**0.1**
3	**0.3**	**0.7**	**0.3**
4	**0.5**	**0.5**	**0.5**
5	**0.7**	**0.3**	**0.7**
6	**0.9**	**0.1**	**0.9**
7	**1.0**	**0.0**	**1.0**

2- أضيف 1 مل من كاشف محلول رقم (2) لكل أنبوبة ووضعت في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق. 3- بردت الأنابيب في حمام مائي ثلجي بعد انتهاء مدة الغليان مباشرة .
4- أضيف 5 مل ماء مقطر لكل أنبوبة وتم رجها جيداً . 5- تمت قراءة الأمتصاص في جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر واستعمل الأنبوب الأول في تصفير الجهاز(Blank) .

واستحصل المنحنى القياسي برسم العلاقة البيانية بين الأمتصاص على الطول الموجي 540 نانوميتر وكمية الكلوكوز(ملغم) وكما موضح في الشكل (1) .



الشكل (1) : المنحنى القياسي لتقدير الكلوكوز (السكريات المختزلة) بطريقة (3,5 Dinitro salicylic acid,DNSA).

ب – تركيز المصدر الكاربوني : لتحديد التركيز الأمثل من عصير التمر لأنتاج انزيم البروتييز خفف عصير التمر ليعطي تراكيز متدرجة من السكريات المختزلة (0.01 ، 0.05 ، 0.1 ، 0.3 ، 0.5 ، 0.7) % فضلاً عن المعاملة الخالية من العصير. تم تدعيم العصير ببعض المغذيات التي اشتملت على فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية بنسبة 0.1% و كبريتات المغنيسيوم بنسبة 0.05% وكلوريد الصوديوم بنسبة 0.25% ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 6.5 وبعدها اكمل الحجم الى 100 مل بالعصير نفسه لكل تركيز وعقم بالمؤصدة ، ثم لقح بحجم لقاح مقداره 6% من حجم الوسط وحضن في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة 28 م° وبسرعة رج 150 دورة /دقيقة لمدة 72 ساعة وبعدها فصلت الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الحاوي على الانزيم وذلك للحصول على الانزيم بشكل رائق .

2- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه : أ- نوع المصدر النيتروجيني : تم أختيار ستة مصادر نيتروجينية هي (كبريتات الأمونيوم و كلوريد الأمونيوم ونترات الصوديوم واليوريا والكازائين والجيلاتين) حيث أذيبت هذه المواد بنسبة 1%في وسط عصير التمر الحاوي على السكريات المختزلة 0.05% ودعم بالمغذيات المشار اليها سابقا وعقم الوسط ثم لقح بسبورات الفطر وتم الحضن تحت الظروف السابقة وصفها وذلك لتحديد المصدر النيتروجيني الامثل لانتاج انزيم البروتييز .

ب- تركيز المصدر النيتروجيني : أستخدمت تراكيز متدرجة من الجيلاتين (0.25 ، 0.5 ، 1 ، 2 ، 3 ، 4) % لغرض تحديد التركيز الأمثل للمصدر النيتروجيني المستعمل و تمت إذابتها في وسط الإنتاج الموصوف في الفقرة السابقة .

3 - تأثير درجة الحرارة : درس تأثير درجة الحرارة بحضن وسط الإنتاج الحاوي على عصير التمر والجيلاتين بنسبة 0.5% والملقح بالفطر *M.anisopliae* على درجات حرارة (25 و 30 و 35) مْ .

4 - تأثير سرعة الرج : حضن وسط إنتاج أنزيم البروتييز الموصوف سابقاً و الملقح بالفطر *M.anisopliae* لمدة 72 ساعة في حاضنتين احداهما ساكنة أي سرعة الرج صفر والأخرى هزازة و بأستخدام سرع رج مختلفة هي (50 و 100 و 150) دورة / دقيقة .

5 - تأثير حجم اللقاح : لقح وسط إنتاج إنزيم البروتييز بحجوم لقاح مقدارها (4 و 8 و 12 و 16 و20)% من لقاح الفطر *M.anisopliae* وذلك لتحديد حجم اللقاح الأمثل لإنتاج الإنزيم .

6 - تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي : عُدِّل الرقم الهيدروجيني لوسط إنتاج الإنزيم إلى (4.5 و 5.0 و 5.5 و 6.0و 6.5 و 7.0 و 7.5) باستخدام 0.2 مولر هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) و حامض الهيدروكلوريك (HCl) ولقح الوسط الإنتاجي بحجم لقاح مقداره 16% وحضن بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 72 ساعة و بسرعة رج 100 دورة / دقيقة .

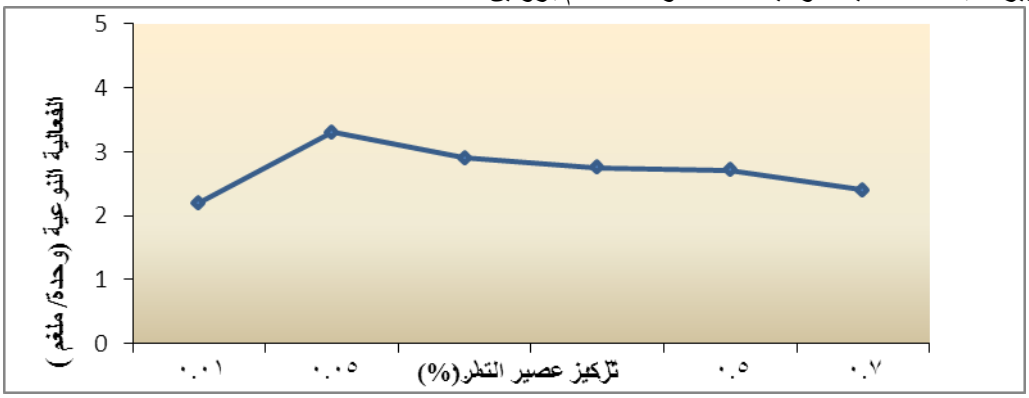
7 - تأثير مدة الحضن : لمعرفة تأثير مدة الحضن لقح وسط الإنتاج الموصوف بالفقرا ت السابقة بنسبة لقاح 16% وحضن لمدة 168 ساعة وتمت متابعة إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر قيد البحث يوميا وطوال مدة الحضن وذلك بسحب مكررين كل 24 ساعة لتقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين و قياس الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج .

8 - تأثير نوع الأملاح المعدنية وتركيزها : أ- تأثير نوع الاملاح المعدنية:
درس تأثير كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وكلوريد الصوديوم (الموجودة أصلاً في وسط الإنتاج بالتراكيز 0.025 و0.05 و 0.125 على التوالي) ، حيث حضر الوسط بوجود كبريتات المغنيسيوم المائية و بعدم وجودها و بوجود فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و بعدم وجودها وبوجود كلوريد الصوديوم وبعدم وجوده إضافةً إلى المعاملات الحاوية على كلا الملحين وغياب الثالث اضافة الى المعاملة الحاوية على كل الأملاح و تركت إحدى المعاملات بدون إضافة أملاح معدنية لغرض المقارنة ، وحضن الوسط الإنتاجي في الحاضنة الهزازة لمدة 72 ساعة.

ب- تركيز الاملاح المعدنية : درست ست تراكيز من كلوريد الصوديوم هي(0.05 ، 0.1 ، 0.25 ،0.5 ، 0.75 و1)% ولقح الوسط الإنتاجي بحجم لقاح مقداره 16% وحضن بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 72 ساعة و بسرعة رج 100 دورة / دقيقة وذلك لتحديد تركيز كلوريد الصوديوم الامثل لانتاج انزيم البروتييز .

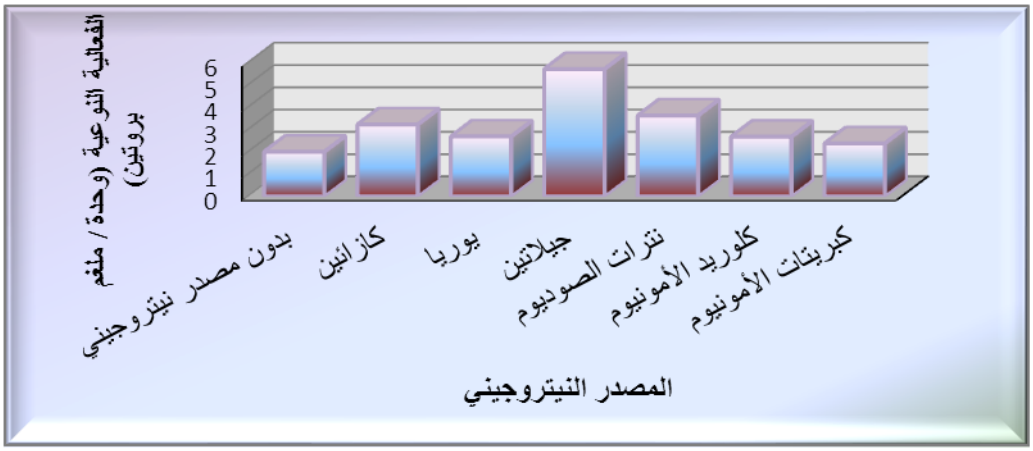
النتائج والمناقشة

1- تأثير تركيز المصدر الكاربوني : يبين الشكل (2) أن أفضل تركيز لعصير التمر لإنتاج إنزيم البروتييز هو 0.05 % إذ بلغت الفعالية النوعية 3.34 وحدة /ملغم بروتين ، وفي ضوء هذه النتائج تم استخدام عصير التمر بتركيز 0.05 % لإنتاج الإنزيم في تجارب البحث اللاحقة جميعها. ان لتواجد المصدر الكاربوني في وسط التغذية اهمية في انتاج الانزيمات وذلك لأهميته في تحرير الطاقة التي تحتاجها الكائنات المجهرية للنمو وانتاجها للانزيمات (9 ; 10). تتباين المصادر الكاربونية في انواعها وتراكيزها وفقا لاحتياجات الكائنات المجهرية (11) وان البحث عن مصادر كاربونية جديدة ورخيصة ومتوافرة في البيئة يعد هدفاً اساسياً تقام عليه البحوث العلمية وذلك لارتفاع اسعار السكريات النقية والهايدروكاربونات(12) لذا تم اختيار عصير التمر Date syrup (DS) والمستحصل عليه من ثمار الصنف الزهدي الذي تحتوي ثماره على نسبة عالية من السكريات تصل الى74% معظمها سكريات مختزلة (13) . يحتوي عصير التمر فضلا عن السكريات على الاحماض الدهنية و الاحماض الامينية والبروتينات والفيتامينات مثل فيتامين C والمعادن مثل الكالسيوم والمغنيسيوم والحديد والبوتاسيوم والصوديوم (14) لذا عُدَّ مصدرا بديلا للكاربون والايونات المعدنية ويحوي المغذيات الكافية لنمو الاحياء المجهرية (16;15) تناولت دراسات عديدة انتاج انزيم البروتييز من الاحياء المجهرية بأستخدام مصادر كاربونية مختلفة وبتراكيز مختلفة ،اذ حصل (17) على اعلى انتاجية لانزيم البروتييز بنوعيه chymoelastase (Pr1) وtrypsin like protease(Pr2) من الفطر *M.anisopliae* 892 عندما اضاف الى وسط الانتاج كيوتكل بعوض *Culex quinquefasciatus* وبفعالية نوعية بلغت (0.365 و0.308) وحدة/ملغم بروتين ،على التوالي، مقارنة مع كل من الوسط الذي اضيف له كيوتكل البعوض *Anopheles stephensi* والبعوض *Aedes aegypti* اذ بلغت الفعالية النوعية للانزيمين (0.211 و0.258) و(0.154 و0.244) وحدة/ملغم بروتين على التوالي بعد 8 ساعات من الحضن . بينت (18) ان استخدام خميرة الخبز كمصدر كاربوني بنسبة 1.5% في وسط الانتاج للفطر *B. bassianin* قد اعطى اعلى انتاجية لانزيم البروتييز اذ بلغت الفعالية النوعية 638.2 وحدة /ملغم بروتين .



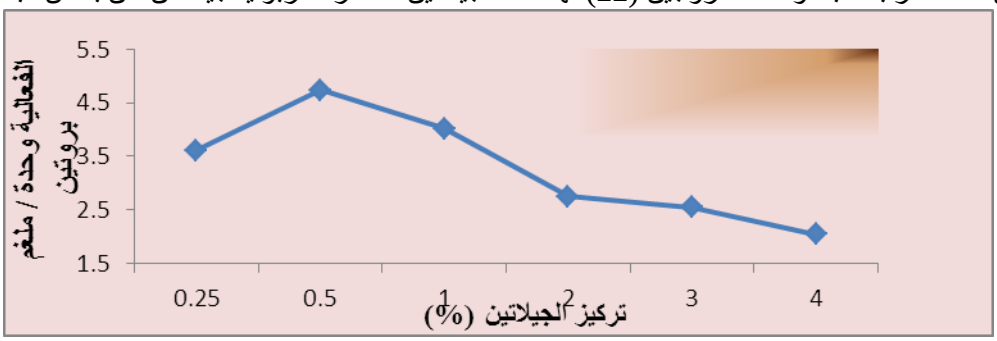
الشكل (2) : تأثير تركيز المصدر الكاربوني (عصير التمر) في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

2- تـأثير نـوع المصدر النيتروجيني و تركيزه : أظهرت نتائج الشكل (3) أن الجيلاتين هو المصدر النيتروجيني الأكفأ في إنتاج الإنزيم مقارنة بباقي المصادر النيتروجينية المستخدمة ، إذ بلغت الفعالية النوعية حدها الأقصى (5.714) وحدة / ملغم بروتين . في حين سجلت أوطأ فعالية نوعية للإنزيم بوجود كبريتات الامونيوم اذ بلغت (2.378) وحدة / ملغم بروتين،وإستناداً لهذه النتائج تم إختيار الجيلاتين مصدراً نيتروجينياً لإنتاج إنزيم البروتييز في تجارب البحث اللاحقة كافة .



الشكل (3) : تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

وبعد أن تم تحديد المصدر النيتروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيم درست تراكيز مختلفة من الجيلاتين لتحديد التركيز الأمثل منه لإنتاج الإنزيم ، ويتبين في الشكل(4) إن اعلى فعالية نوعية 4.739 وحدة / ملغم بروتين عند إستخدام تركيز 0.5 % من الجيلاتين، في حين إنخفضت الفعالية النوعية تدريجياً بزيادة تركيز المصدر النيتروجيني المستعمل في هذا البحث حتى وصلت اقلها عند التركيز 4 % من الجيلاتين اذ بلغت 2.048 وحدة / ملغم بروتين ، وبناءاً عليه فقد أُعتِمد هذا التركيز بالتجارب اللاحقة . يعد المصدر النيتروجيني المستخدم في وسط الانتاج احد العوامل الاساسية المؤثرة في نمو الخلايا المايكروبية وله تأثير حاث او مثبط في انتاجها للأنزيمات (19)، وبالنسبة لانزيم البروتييز يعد المصدر النيتروجيني مكون اساسي وجوهري يدخل في بناء الاحماض الامينية (20) وعلى الرغم من استعمال عصير التمر الذي يحوي على المغذيات الكافية لنمو الاحياء المجهرية الا ان بعض الدراسات والتجارب اثبتت انه غير غني بالاحماض الامينية والدهنية لذا وجب تزويد الوسط المغذي للكائن المجهري بعوامل داعمة كالمصدر النتروجيني لغرض تحفيز انتاجه لمواده الايضية (21)، لذا تم اختيار الجيلاتين كمصدر نتروجيني داعم لوسط تنمية الفطر *M.anisopliae* بعد ان اثبتت كفاءته في رفع مستوى انتاج انزيم البروتييز من الفطر المستخدم ، يعد الجيلاتين مصدرا نتروجينيا مهما اذ يتألف من العديد من الاحماض الامينية والسكريات اذ وجد على الاقل 75% من السكريات السداسية الموجودة في الكولاجين (Collagen) الذي يعد مصدر تصنيع الجيلاتين ترتبط بالمشتق الاميني Hydroxylysine بآصرة كلايكوسيدية O-glycoside linkage وان قسم من هذه السكريات ومنها سكر الكلوكوز تبقى الى حد ما مرتبطة بمكونات النتروجين (22) لهذا عد الجيلاتين مصدرا كاربونيا جيدا من لدن بعض الباحثين .



الشكل (4) : تأثير تركيز الجيلاتين في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae*

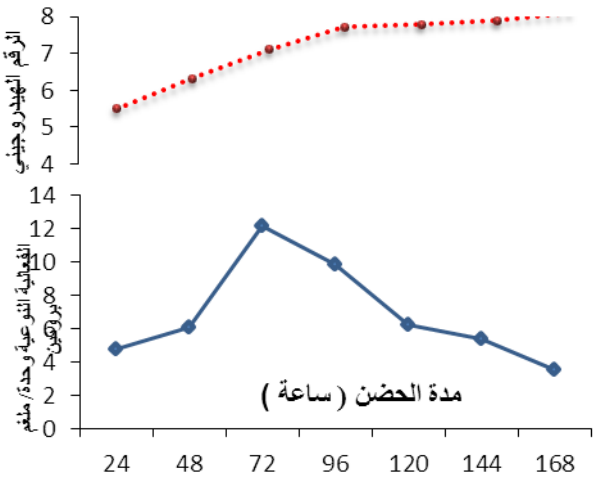
وجد ان النتيجة المستحصل عليها خلال هذه الدراسة لاتتفق مع نتيجة (23) الذي بين ان الجيلاتين هو الافضل كوسط زرعي سائل لزيادة انتاج الكتلة الحيوية للفطر *M.anisopliae* دون ان يكون هنالك استحثاث لانتاج او افراز انزيم Serine endoprotease (Pr1) الذي ينتجه غالبا هذا الفطر وغيره من الفطريات مثل *Aschersonia aleyrodis* و *Verticillium lecanii* و *B. bassiana* والذي يفرز في الغالب من العضو الضاغط appressorium اثناء عملية الاختراق لكيوتكل الحشرات .تتفق نتيجة البحث الحالي مع ماذكره الباحثان (24) بأن استخدام الجيلاتين بتركيز

1% له دور فعال في تحفيز وزيادة انتاج انزيم البروتييز المحلل للبروتينات من قبل الفطر *B. bassiana* . كذلك اتفقت مع نتيجة الباحث (17) الذين وجدوا ان انتاج انزيم البروتييز المفرز من الفطر بنوعيه Pr_1 وPr_2 المفرز من الفطر 892 *M.anisopliae* قد ازداد ثلاث مرات نتيجة لاضافة الجيلاتين كمادة حاثة مقارنة مع معاملة السيطرة . وقد يفسر انخفاض انتاج البروتييز بزيادة النتروجين الى ان الجينات المشفرة للانزيمات المطلوبة لاستهلاك النتروجين تنظم عادة باليات استحثاث او تحفيز متخصصة تخضع الى الية سيطرة رئيسية تعرف باليات كبح ايض النتروجين (Nitrogen metabolic repression) وتبعا لهذه الآليات فالجينات تعبر بمستويات عالية عند ظروف تحديد النتروجين فقط ، اما عند النمو بوجود مصادر نايتروجينية جاهزة ومفضلة فأنه يؤدي الى اعطاء اشارة لايقاف التعبير الجيني للانزيمات المحللة (25) وهذا مابينه (26) اذ لاحظوا ان اعلى انتاج لانزيم البروتييز من الفطر *Scledosporium apiospermum* يكون عند تركيز البيتون 0.1% في حين ان زيادة التركيز في الوسط الى 1% ادى الى زيادة في معدل نمو الفطر وانخفاض كبير جدا في انتاج الانزيم .كما لاحظ (27) ان كلا من البيتون والكازائين يحفز تراكم انزيم البروتييز في الوسط الزرعي لفطر *A. terreus* وبالتالي انخفاض الفعالية الانزيمية وذلك لان هذه المصادر النيتروجينية البسيطة تكون حاوية على عدد كبير من الاحماض الامينية والببتيدات الصغيرة وبذلك تؤدي الى ايقاف انتاج الانزيم بآلية كبح الايض الهدمية (Catabolic repression) ، ان المصادر النتروجينية العضوية المعقدة تكون مصدرا لتراكيز متباينة من الاحماض الامينية الحرة والببتيدات التي يكون لها تأثيرا مهما في تنظيم انتاج انزيمات البروتييز حسب الآلية المذكورة سابقا قد تكون الاحماض الامينية بتراكيز قليلة غير كافية لحث انتاج الانزيم او بتراكيز مثلى لحث الانتاج فتسبب اعلى انتاج للانزيم او انها قد تكون بتراكيز عالية فتسبب كبح انتاج انزيمات البروتييز (28).

3- تأثير مدة الحضن : يوضح الشكل 5 أن إنتاج الإنزيم يبدأ بعد 24 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 4.76 وحدة /ملغم بروتين ليصل إلى أقصاه بعد 72 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 12.25 وحدة / ملغم بروتين. تتفق هذه النتيجة مع ماذكره (29) ان 80% من فعالية انزيم البروتييز المنتج من الفطر *B. bassiana* قد بدأت بعد 24 ساعة من الحضن و وصلت اقصاها بعد 120 ساعة. ومع ماوجدته (18) التي ذكرت ان انتاج انزيم البروتييز المفرز من الفطر*B. bassiana* قد بدأ بعد 24 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 133.3 وحدة / ملغم بروتين ليصل الى اقصاه بعد 72 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 1304.34 وحدة /ملغم بروتين .

ان الافراز المبكر والسريع لانزيم البروتييز يدل على وفرة وغزارة المواد الغذائية في وسط التنمية الذي يحوي متطلبات النمو للكائن المجهري فضلا عن متطلبات انتاجه للانزيم (30 ;31) .وفي ضوء هذه النتائج فقد تم تثبيت مدة حضن قدرها 72 ساعة لأفضل إنتاج من الإنزيم وتم إستخدامها في التجارب كافة . تتعارض هذه النتيجة مع ماوجده كل من (32) عند تحديد اعلى انتاجية لانزيم البروتييز المفرز من قبل اربعة عزلات للفطر *M.anisopliae* اذ كانت في الايام 4-6 يوم من بداية الحضن ، ومع ماأكده (33) بأن مدة حضن مقدارها 5 ايام هي المثلى لانتاج انزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae* IF 28.2 . بينما اتفقت نتيجة البحث مع مابينه (34) في حال انتاج انزيم البروتييز من كل من الفطريات *B. bassiana* و *B. amorpha* . ان استعمال اوساط زرعية مختلفة لتنمية الاحياء المجهرية ينتج عنه اختلاف في مدة الحضن اللازمة لانتاج الانزيمات كما بين ذلك كل من (35) اذ اوضحا بأستعمال سلالتين من الفطر*M.anisopliae* احداهما ذات انتاج عالي لانزيم البروتييز وهي سلالة M19 والاخرى ذات انتاج واطئ للانزيم وهي سلالة M10 وبأستعمال 7 اوساط زرعية احدها وسط الحد الادنى ((minimal (MM) media) [وهو وسط مكون من املاح كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4 وفوسفات البوتاسيوم احادية الهيدروجين $KHPO_4$ وكبريتات المغنسيوم $MgSO_4$]ان كلا السلالتين اعطت اعلى فعالية للانزيم خلال 72 ساعة بأستعمال وسط MM بينما اعطت سلالة M10 وسلالة M19 وبأستعمال باقي الاوساط الزرعية اعلى فعالية للانزيم خلال 96 ساعة و120 ساعة على التوالي .

واختلفت نتيجة البحث الحالي مع ماحصلوا عليه (36) اذ اشاروا الى ان مدة الحضن المثلى لاعطاء اعلى انتاجية لانزيم البروتييز من سلالة 22 وسلالة CL11 العائدتين للفطر *M.anisopliae* هي خمسة ايام . ان انخفاض انتاجية الانزيم عند زيادة مدة الحضن دليل على ان الانزيم من مواد الايض الاولية التي تطرح في الطور اللوغارتمي من نمو الفطريات مستفيدةً من توفر المواد الغذائية في الوسط الزرعي (37) ثم يبدأ بالانخفاض التدريجي والذي قد يعزى الى حدوث تغيرات في وسط النمو وبشكل خاص في قيمة الرقم الهيدروجيني، وافراز الكائن الحي لانزيمات اخرى تعمل على تحطيم الانزيم قيد الدراسة (38) ، او قد يكون السبب نضوب المواد الغذائية بمرور الوقت وانتاج مواد ايضية سامة (39). وفضلاً عن ذلك فأن الشكل 5 يشير ايضاً الى إزدياد قيمة الرقم الهيدروجيني تدريجياً عن الرقم الهيدروجيني الابتدائي 5.5 لوسط التخمر ليصل إلى 7.1 بعد 72 ساعة حيث يصل إنتاج إنزيم البروتييز إلى أقصاه ،و بلغت أعلى قيمة للرقم الهيدروجيني في اليوم السابع8.14.

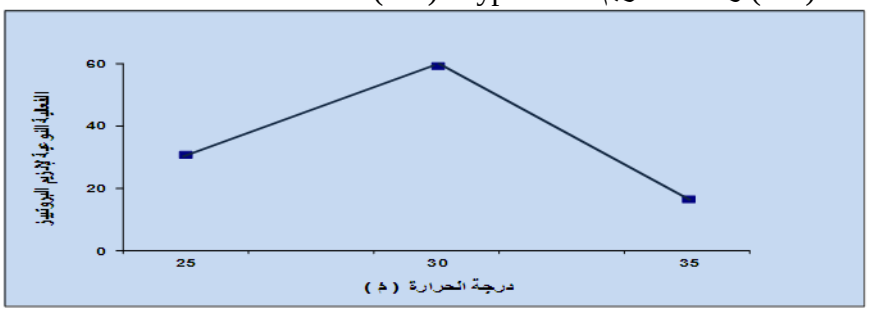


الشكل (5) : تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيم البروتييز من *الفطر M.anisopliae*

تتفق هذه النتيجة مع ماأشاروا اليه (36) من ارتفاع الرقم الهيدروجيني التدريجي خلال فترة التخمر عن الرقم الهيدروجيني الابتدائي 6.45 لوسط تخمر السلالة 22 من الفطر *M.anisopliae* ليصل الى 7.78 في اليوم الخامس اذ تصل انتاجية انزيم البروتييز الى الذروة وليبلغ الرقم الهيدروجيني اعلى قيمة له 8.57 في اليوم السادس عشر من بداية الحضن ، اما بالنسبة لسلالة CL11 من الفطر *M.anisopliae* فكانت النتيجة مشابهة للسلالة 22 اذ ارتفع الرقم الهيدروجيني تدريجيا عن الرقم الهيدروجيني الابتدائي 6.46 ليصل الى 8.14 في اليوم الخامس ثم يزداد ليصل الى 8.67 في اليوم السادس عشر من بداية الحضن . لعل ارتفاع الرقم الهيدروجيني خلال فترة التخمر يعزى الى وجود عصير التمر فضلا عن الجيلاتين اللذان يزودان الوسط بالاحماض الامينية الضرورية لتنمية الفطر *M.anisopliae* ، اذ انه في حالة استخدام الاحياء المجهرية للمركبات الامينية العضوية لغرض النمو فأن ذلك يؤدي الى ارتفاع الرقم الهيدروجيني لكون هذه المركبات ستفقد مجموعة الامين مما يؤدي الى ارتفاع الرقم الهيدروجيني (40) .

4- تأثير درجة الحرارة :

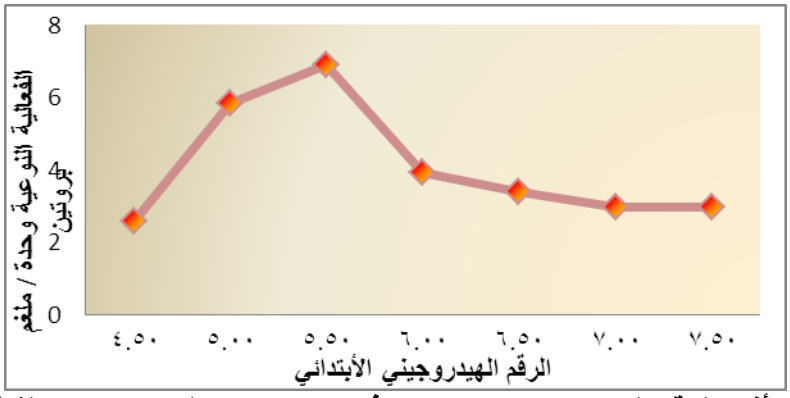
يوضح الشكل 6 تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae* ويبين إنخفاض إنتاج الإنزيم عند درجة حرارة 25 مْ إذ بلغت الفعالية النوعية (16.72) وحدة / ملغم بروتين ،يمكن تفسير ذلك بانه عند درجات الحرارة الواطئة تصبح الفعاليات الايضية عند الاحياء المجهرية بطيئة (41). فيما إزدادت هذه الفعالية ووصلت إلى أقصاها عند الدرجة الحرارية 30 مْ حيث بلغت (59.5) وحدة / ملغم بروتين ، مما يشير إلى أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم هي 30 مْ والتي أعتمدت في التجارب اللاحقة كافة . وفضلاً عن ذلك فأن الشكل المذكور يوضح إنخفاض الفعالية النوعية للإنزيم بإزدياد درجة الحرارة إلى 35 مْ ويمكن تفسير هذه الحالة بأن درجات الحرارة العالية تعمل على فقد الخواص التحفيزية للانزيم (42) كما انها تؤثر عكسيا على العمليات الايضية للاحياء المجهرية المنتجة للانزيمات المحللة للبروتين مسببة تثبيط نمو الفطر وبالتالي انتاج الانزيم (43) . تعد درجة حرارة الحضن معيارا حرجا يؤثر على كل من عمليتي بناء وافراز انزيم البروتييز القلوي في الاحياء المجهرية (45;44) وذلك من خلال تأثيره على :-1- عملية امتصاص الاوكسجين وتزويد الطاقة لاداء الفعاليات الايضية (46) .2- عمليات النقل والترجمة لتصنيع البروتين (47) .3- تأثيرها على الخواص الفيزيائية للغشاء الخلوي (48). ان النتيجة الحالية بهذا الخصوص لاتتفق مع ما أورده (33) اذ اوضحوا ن درجة الحرارة 35 مْ هي التي تسجل عندها السلالات M408 وM440 وM460 للفطر *M.anisopliae* اقصى انتاجية لانزيم البروتييز القلوي المعروف بـ Subtilisin-like (Pr1) وكذلك للانزيم Trypsin-like (Pr2) .



الشكل (6) : تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

وان الدرجة الحرارية السابقة الذكر هي المثلى لانتاج انزيم البروتييز من سلالتي M10 (السلالة قليلة الانتاج لانزيم البروتييز) وM19 (السلالة غزيرة الانتاج لانزيم البروتييز) للفطر *M.anisopliae* (35) .

5- تأثير الرقم الهيدروجيني الإبتدائي : إن تأثير الرقم الهيدروجيني الإبتدائي في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر ***M. anisopliae*** موضح في الشكل 7 إذ يلاحظ أن الفطر قادر على إنتاج الإنزيم بشكل أفضل في مدى رقم هيدروجيني (5 - 6) بيد أن أعلى إنتاج تحقق عند الرقم الهيدروجيني 5.5 اذ بلغت الفعالية النوعية لإنزيم البروتييز (6.90) وحدة / ملغم بروتين وانخفضت تدريجياً حتى وصلت أوطأ قيمة لها(2.97) وحدة / ملغم بروتين عند الرقم الهيدروجيني 7.5 . وبناءًا على ما تقدم من نتائج فقد تم تعديل الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج إلى 5.5 في مراحل البحث اللاحقة جميعها . يعد تأثير الرقم الهيدروجيني في نمو الفطريات وفعاليتها الحيوية أمرًا معقدًا، وتمتاز الفطريات بتحملها للأرقام الهيدروجينة الواطئة وان معظمها يمتلك رقمًا هيدروجينياً أمثلًا للنمو ما بين 5.0 - 6.0 (49) .

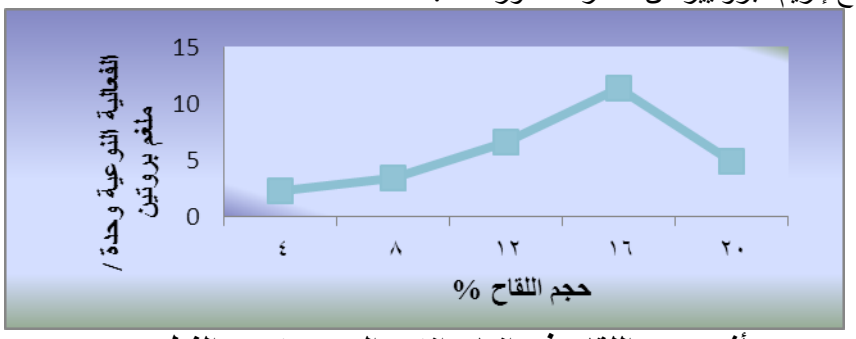


الشكل (7) : تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

ان إنتاج إنزيم البروتييز بوساطة الأحياء المجهرية يعتمد بشكل كبير على قيمة الرقم الهيدروجيني خارج الخلية إذ يتركز تأثيره على صفات الوسط الغذائي كذوبان المواد الغذائية وانتقالها وتأينها وتركيز البيكاربونات الناتجة من ذوبان ثاني أوكسيد الكاربون الذي يؤثر على السعة الدارئة للوسط الغذائي والتي ينعكس تأثيرها على نمو الفطر وإنتاجه للإنزيمات (50). كما ان للرقم الهيدروجيني تأثير كبير على العديد من العمليات الإنزيمية ونقل المكونات المختلفة عبر الغشاء الخلوي والذي بدوره يعزز نمو الخلايا وإنتاجها للإنزيم(51 ;52 ;53). وقد ذكروا (54) أن الرقم الهيدروجيني يؤثر على عملية الترجمة والاستنساخ وبناء البروتين ، أما (20) فقد ذكرا أن للرقم الهيدروجيني تأثير في ميكانيكية التعبير الجيني المنظم للتفاعلات الأيضية، وأن تكوين المواد الأولية والثانوية الداخلة في العمليات الحيوية لإنتاج إنزيم البروتييز القلوي تعتمد كثيرًا على الرقم الهيدروجيني للوسط. ان القيمة المستحصلة الحالية تتفق مع ما ذكره (55) اذ وجد ان أعلى فعالية لإنزيم البروتييز السام المفرز من الفطر*M.anisopliae* كانت عند الرقم الهيدروجيني 5.5. واتفقت مع نتيجة الباحثان (56) إذ وجدا ان الرقم الهيدروجيني الابتدائي 5.5 كان الأفضل في إنتاج انزيمي البروتييز والأمليز من الفطر *Aspergillus awamori* MTCC6652 . ان إنتاج كل نوع من أنواع إنزيمات البروتييز يتبع طريقة تعبير جيني مختلفة كاستجابة للرقم الهيدروجيني الخارجي (Ambient pH) إذ إن الإنزيمات تنتج عند الرقم الهيدروجيني الذي تكون عنده فعالة أو مؤثرة فقط ، وهذا يعني ان للرقم الهيدروجيني دور مهم في التعبير الجيني للبروتينات المفرزة (54) .

6- تأثير حجم اللقاح : يعد تركيز اللقاح عاملًا حرجًا لأي عملية حيوية لكونه مؤثرًا في نمو الخلية وبناء الإنزيم لذا يجب أن يضاف بالمستوى الأمثل(20 ; 57) وأن تلقيح بيئة النمو بعدد معلوم من السبورات يعد من الطرائق شائعة الاستخدام في إنتاج الإنزيمات من الفطريات ، إذ تضمن الحصول على نتائج قابلة للتكرار وغير متذبذبة . يُعّرف (58) حجم اللقاح الأمثل بأنه الحجم الذي يحتوي عدد محدود ومعلوم من الأحياء المجهرية القادرة على الاستفادة من المغذيات المحدودة في الوسط الزرعي وتحقيق الإنتاجية القصوى من الإنزيم. تبين النتائج زيادة تدريجية في إنتاج الإنزيم مع زيادة أعداد الخلايا في كمية اللقاح المضافة إلى الوسط الزرعي حتى بلغت الفعالية النوعية أقصاها (11.35) وحدة / ملغم بروتين عند إضافة حجم لقاح مقداره 16% ، إلا أنها إنخفضت بعد ذلك لتصل إلى (4.91) وحدة /ملغم بروتين عند إستخدام حجم لقاح 20 % وكما موضح في الشكل 8 ، تعطي هذه النتيجة مؤشرًا على ان حجم اللقاح العالي ليس بالضرورة أن يعطي حصيلة عالية من الأنزيم وإنما ينتج عنه نفاذ المواد الغذائية من الوسط الزرعي بوقت مبكر فضلًا عن فقدان الأوكسجين وذلك للنمو السريع للمزرعة وتكتل الخلايا مما يؤدي إلى انخفاض نسبة السكر والأوكسجين المستهلكين وبالتالي انخفاض إنتاج الإنزيم (5 ; 20 ; 59 ; 60) كما ان لحالة التنافس لهذه الأعداد الكبيرة من الخلايا تأثير على تمثيل العناصر الغذائية الأساسية في الوسط الزرعي وتغير الرقم الهيدروجيني له مما يؤثر سلباً في فعالية الإنزيم المنتج (61) ، لذا فقد تم استخدام حجم اللقاح 16% لإنتاج إنزيم في مراحل البحث اللاحقة اعتمادًا على النتيجة المستحصلة من هذا البحث . وكان حجم اللقاح 4×10^{6} سبور/مل هو المستعمل من قبل

(62) لإنتاج انزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae*. واستعمل (36) حجم لقاح مقدار 3×10^{7} سبور/ مل لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae* . في حين قام كل من (33) و (35) باستخدام حجم لقاح مقداره 1×10^{6} سبور/ مل لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر المذكور نفسه.



الشكل (8) : تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر*M. anisopliae*

7- تأثير سرعة الرج : يوضح الشكل 9 أن أعلى فعالية نوعية لإنزيم البروتييز بلغت (9.52) وحدة /ملغم بروتين ، عند سرعة رج 100 دورة /دقيقة ، حيث تزداد تهوية الوسط الزرعي عند هذه السرعة والتي تكفي لتجهيز الأوكسجين الذائب والمواد الغذائية في الوسط مما ينتج عنه زيادة الإنتاجية ، بينما ظهرت أوطأ فعالية نوعية للإنزيم عند سرعة رج صفر (الوضع الساكن) ، إذ بلغت 5.07 وحدة / ملغم بروتين ويعزى ذلك إلى عدم كفاية التهوية والمواد الغذائية والتي تؤدي إلى عدم قدرة الفطر للنمو بشكل كفوء (63) ، ان استخدام الحاضنة الهزازة في إنتاج الإنزيمات بوساطة الأحياء المجهرية الهوائية كالفطريات يسمح بالاستغلال الأمثل لمكونات الوسط الزرعي فضلاًعن تكون طبقة رقيقة نسبيًا من البيئة (الوسط الزرعي) المهواة بوساطة الانتشار خلال سطح السائل عن طريق الحركة الرحوية للرج ، وبذلك يسمح الرج أو التحريك بمزج وتجانس مكونات الوسط الزرعي بشكل جيد وكفوء بحيث يستطيع الفطر من النمو في اتزان بين الإمداد من الهواء في الأعلى والإمداد من المواد الغذائية في الأسفل (66; 65 (64; وقد أوجز كل من (67) و (68) فوائد الرج للوسط الزرعي بالآتي: 1) زيادة ذوبان الأوكسجين من خلال تحريك ومزج مكونات الوسط الزرعي. 2) تحسين توزيع المغذيات في الوسط الزرعي. 3) تشتيت أو تفريق الخلايا المتكتلة . 4) زيادة العمليات الايضية الهوائية خلال عملية التخمر. كذلك يبين الشكل 9 إنخفاض الفعالية النوعية للإنزيم بزيادة سرعة الرج اذ بلغت 8.12 وحدة /ملغم بروتين عند سرعة رج 150 دورة / دقيقة ان السرع العالية للرج لا تؤدي بالضرورة إلى زيادة إنتاج الإنزيم بل قد تؤدي الى تقليل إنتاجه من خلال مسخ الإنزيم وتحطيم الخلايا أو إنها تؤدي إلى تحلل الخلايا وزيادة نافذيتها نتيجة الاحتكاك بفعل قوى القص Shear forces (69; 63;59)

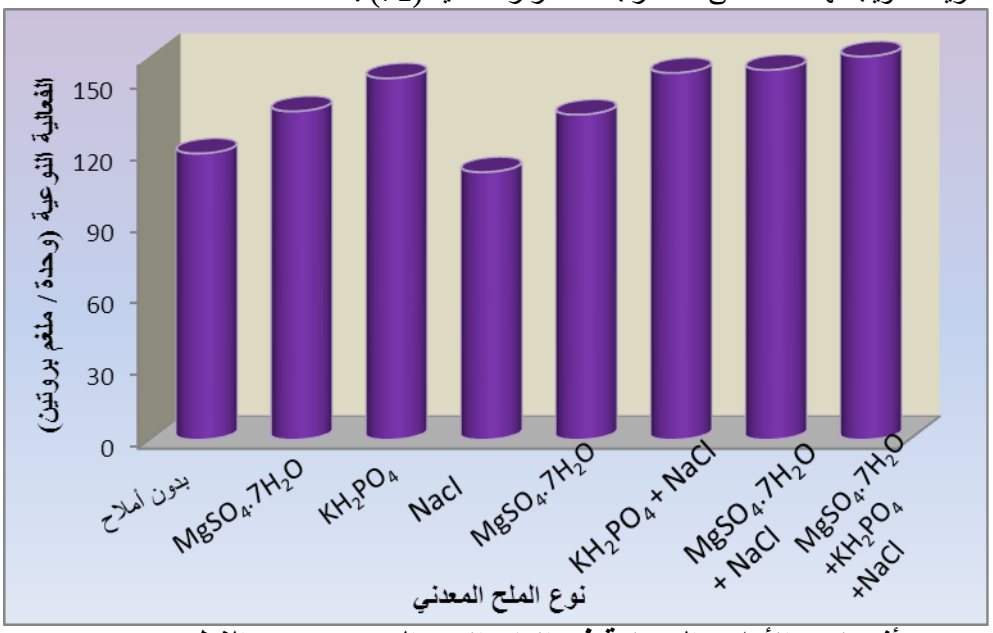
الشكل (9) : تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M. anisopliae*

و في ضوء هذه النتيجة تم تثبيت الحاضنة الهزازة على سرعة رج 100 دورة / دقيقة لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر ***M. anisopliae*** وأعتمدت في مراحل البحث اللاحقة . استخدمت سرع رج مختلفة لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M.anisopliae* فقام كل من (17) و (62) باستخدام سرعة الرج 150 دورة/دقيقة، بينما قام (33) باستخدام سرعة الرج 180 دورة/دقيقة. ان اختلاف سرع الرج باختلاف الأحياء المجهرية قد يعزى إلى الاختلافات في فسيولوجية الكائن المنتج للإنزيم ومكونات الوسط وحجمه بالدورق (70).

8- تأثير نوع الأملاح المعدنية و تركيزها :

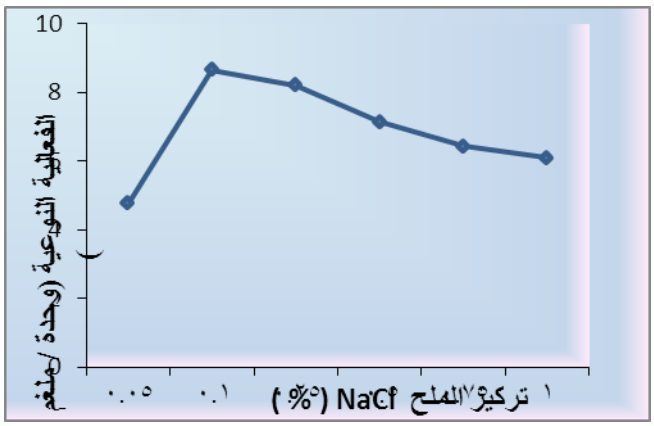
يظهر من الشكل 10 إن لإستخدام الأملاح الثلاثة معاً تأثيراً تنشيطياً واضحاً في إنتاج إنزيم البروتييز مقارنة بالمعاملة الخالية من الأملاح ، إذ بلغت الفعالية النوعية (7.66) وحدة /ملغم بروتين ، بينما أظهرت المعاملة الخالية من الأملاح المذكورة أقل فعالية نوعية إذ بلغت 4.78 وحدة / ملغم بروتين ، وتدرجت المعاملات الاخرى في تأثيرها على انتاج الأنزيم بين المعاملة الثلاثية الاملاح والاخرى الخالية منها . غير ان المعاملة الحاوية على ملح كلوريد الصوديوم لوحده قد كان لها تأثيراً تثبيطياً على انتاج الأنزيم اذ كانت لها فعالية نوعية اقل من اقل معاملة (المعاملة الخالية من الاملاح) وقد بلغت قيمتها 4.46 وحدة / ملغم بروتين . تعد الأملاح المعدنية (الأيونات المعدنية) أحد

المغذيات الأساسية التي تحتاجها الأحياء المجهرية بمقادير ضئيلة للنمو وتكوين الإنزيمات وثبوتية واستقرار بعضها الآخر لكنها تختلف بالاعتماد على مصدر الإنزيم (10 ; 66) كما إن وجود بعض هذه الأيونات يزيد من الثبات الحراري للأنزيمات ويجعلها فعالة حتى عند درجات الحرارة العالية (71) .



الشكل (10) : تأثير نوع الأملاح المعدنية في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *M .anisopliae*

يوجد العديد من الأبحاث التي أوضحت الدور الفعال للأملاح المعدنية في إنتاج الإنزيم من الفطريات، فقد استخدم (33) أملاح كبريتات الامونيوم $(NH_4)_2So_4$ و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2Po_4) وفوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين (K_2HPo_4) وكبريتات المغنسيوم $MgSo_4$ في انتاج انزيم البروتييزمن الفطر *M.anisopliae* . وفي ضوء النتائج اعلاه لقد تم التركيز على ملح كلوريد الصوديوم فقط لدراسة تأثير اختلاف تركيزه في انتاج انزيم البروتييز مع ثبوتية تركيز الملحين الآخريين (كبريتات المغنيسيوم المائية وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين) اذ درست تراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم لتحديد التركيز الأمثل منه لإنتاج الإنزيم ، وقد سجلت أعلى فعالية نوعية عند استخدامه بتركيز 0.1 % وكما موضح في الشكل 11 اذ بلغت الفعالية النوعية (8.66) وحدة / ملغم بروتين، في حين إنخفضت الفعالية النوعية تدريجياً بزيادة تركيز الملح فوصلت الى 6.1 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 1% من ملح كلوريد الصوديوم ان التراكيز العالية لملح Nacl تعمل على خفض إنتاجية البروتييز من الأحياء المجهرية (72) لكونها تسبب تغيرات في تركيب اللبيدات المكونة للغشاء الخلوي لخلايا الأحياء المجهرية (73) . اتفقت نتيجة البحث مع نتيجة الباحث (10) إذ حصلوا على أعلى إنتاجية لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *A. carbonarius* عند تركيز 0.1 % لملح كلوريد الصوديوم .



الشكل (11) : تأثير تركيز كلوريد الصوديوم في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر*M. anisopliae*

المصادر :-

1- **Samuels,** K. D. Z., Pinnock, D. E. & Allsopp, P. G. (1989). The potential of Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin (Deutermycotina, Hyphomycetes) as a biological control-agent of Inopus rubriceps (Macquart) (Diptera, Stratiomyidae). J Aust Entomol Soc 28, 69–74.

2- **Charnley**, AK.(2003). Fungal Pathogens of Insects: Cuticle Degrading Enzymes and Toxins. *Advances in Botanical* Research. 40: 241-321.

3-Fernandes , E.G. ; Valério , H.M. ; Feltrin , T. and Sand , S.T.V.D. (2012) . Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates . Brazilian Journal of microbiology : 827 – 833 . ISSN 1517 – 8382 .

4- Rao,M.; Tanksale,A.; Ghatge,M. & Deshpande, V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases . Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3):597-635.

5- Muthulakshmi, C.; Gomathi, D.; Kumar, D.; Ravikumar, G. ; Kalaiselvi, M. & Uma, C.(2011). Production ,purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation .Jordan Journal of Biological Sciences. Vol.4. No. 3. pp.137-148.

6- Kathiresan, K. and Manivannan, S.(2006) .Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (10), 829-832.

7- AL- Obaidi ,Z. S. ; Gh.M. Aziz ; Th. S. AL- Hakkak and M. A. AL- Hilli .(1987) . Optimization of propagation medium for bakers yeast using date extract and molasses . Date palm J.5(1) : 164-178 .

8- Miller ,G .I. (1959) . Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar . Anal. Chem. , 3r . 426-428 .

9- Haq, I.-U. ; Mukhtar, H. & Umber, H. (2008). Fermentation Medium Optimization For The Biosynthesis of Protease by *Penicillium chrysogenum* in shake flasks. Pakistan J. Zool. Vol. 40. (2): pp. 69-73.

10- Ire,F. ; Okolo,B. ; Moneke,A. & Odibo,F. (2011). Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation.African Journal of Food Science. Vol. 5(6):pp. 353-365.

11- Jaswal,R.; Kocher,G. & Virk,M. (2008).Production of alkaline protease by *Bacillus circulans* using agricultural residues:A statistical approach. Indian Journal of Biotechnology.Vol.7. pp. 356-360.

12- Dahot, M. (1994). Purification and some properties of alkaline protease from *Penicillium expansum.* Journal of Islamic Academy of Sciences. 7:2. 100-105.

13- بلاكت ، رعد طه .(1988). تأثير منظمات النمو :الأيثرل ، NAA ، CA_3 في التساقط وبعض الصفات الطبيعية والكيمياوية لثمار نخلة التمر صنف زهدي ، رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة بغداد – العراق .

14- **Al-Khateeb**, A.A., (2008). Enhancing the growth of date palm (Phoenix Dactylifera) in vitro tissue by adding date syrup to the culture medium. Sci. J. King Faisal University (Basic Appl. Sci.) 19, 71–85.
15- **Khiyami, M.;**Aboseide ,B. and Pometto , A.(2008).Influence of complex nutrient sources:Dates syrup and dates pits on Lactocooous lactis growth and nisin production.J.Biotechnol.136:717-742.

16- **Moosavi-Nasab,M.** and Yousefi ,A. (2011) .Biotechnological production of cellulose by Gluconacetobacter xylinus from agricultural waste .Iranian Journal of Biotechnology .Vol.9,No.2 ,pp:94-101.
17- **Mohanty, S.S. ; Raghavendra, K. and Dash, A.P**. (2008). Induction of chymoelastase(Pr1) of *Metarhizum anisopliae* and its role in causing mortality to mosquito larvae .World J Microbiol Biotechnol 24:2283-2288 .

18 -**العبادي** ، سرور محمد علي .(2012) .دراسة كيموحيوية لأنزيم البروتييز المنتج من الفطر *Beauveria bassiana* . رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة كربلاء.

19- **Wang**,L.; Ridgway,D.; Gu,T. & Moo-Young,M. (2005) . Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentation. Biotechnology Advances . 23. pp.115-129.
20- **Patil,U. and Chaudhari**, A.(2013). Production of Alkaline Protease by Solvent-Tolerant Alkaliphilic *Bacillus circulans* MTCC 7942 Isolated from Hydrocarbon Contaminated Habitat: Process Parameters Optimization .Indian Journal of Biotechnology .
21- **Djilali,B.;**Bouziane ,A.;Ahmed,H.;Kada,I. and Nawal,O.(2012).Study of the Behaviour of Lactbacillus Delbrueckii Subsp.Bulgaricus in Date Syrup in Batch Fermentation with Controlled pH .J.Biotechnol Biomaterial.2:2 .

22- **Wood** , H.W. (1958) .Technical and pharmaceutical uses of gelatine. J. Photogr. Sci , 6 , 91-96. (Cited from Ward , A.G. and A. Courts . 1977. The Science and Technology of Gelatin. A Cademic press . London , New York , San Francisco . 506pp.).
23- **Clarkson**, J. M. (1996). Molecular biology of fungi for the control of insects. In molecular biology of biological control of plants. Edited by Gunasekaran, M. and Weber, D.J.© by CRC press, Inc.
24- **Bidochka**, M. & Khachatourians,G. (1988). N-Acetyl-d-Glucosamine – Mediated Regulation of Extracellular Protease in the Entomo -pathogenic fungus *Beauveria bassiana* .Appl. Environ. Microbiol. Vol.54 No. 11. 2699-2704.
25- **Marzluf,G.(1997).**Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi.Microbiol.Mol.Biol.Rev.61(1):17-32.
26- **Larcher ,G.;**Cimon,B.;Symoens,F.Trongchin,G.;Chabase,D. and Bouchara,J. (1996).A 33 Kda serine proteinase from Scedosporium apiospermum .Biochem.J.315:11a-126.
27- **Ashur,S.A.;**El-Shura, H.M.;Metwally ,M. and Habib,S.A.(1996).Fungal fermentation of whey incorporated with certain supplements for the production of protease .Micrbios.86(346):59-69.
28- **Egorov** , N. S. ;Loriya,Z.K.and Yudina, T.G.(1983) .Effect of protein on exprotease synthesis in Bacillus thuringiesis .Microbiol.(USSR),52(4):443-446.

29- **Ito**, E. ; Varéa-Pereira, G. ; Miyagui, D. ; Pinotti, M. & Neves, P. (2007). Production of extracellular protease by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana*

reactivated on coffee berry borer,*Hypothenemus hampei*. Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol.50. No.2. pp. 217-223.
30- **Qureshi**,A. ; Bhutto,M. ; Khushk,I. & Dahot,M. (2011). Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis* EFRL 01. African Journal of Biotechnology. Vol. 10(26). pp. 5173-5181.
31- **Pandit**, N.P. and Maheshwari ,S.K. (2012) Optimization of Cellulase Enzyme Production from Sugarcane Pressmud Using Oyster Mushroom - *Pleurotus Sajor-Caju* by Solid State Fermentation. J Bioremed Biodegrad 3:140. doi:10.4172/2155-6199.

32- **Dhar**, P and Kaur , G.(2010) Cuticle – Degrading protease produced by Metarhizium anisopliae and their in Different Media .Indian J Microbiol .50 (4) 449-455 .

33- **Ali**,S. ; Huang,Z, ; Zang,W. & Ren,S. (2011) . Production and Regulation of Extracellular Proteases from the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the Presence of Diamondback Moth Cuticle. Pakistan J. Zool., vol. 43(6). pp. 1203-1213.

34- Campos, R.; Arruda, W.; Boldo, J.; da Silva, M.; de Barros, N.; de Azevado, J.; Schrank, A. & Vainstein, M. (2005). *Boophilus microplus* Infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM Analysis and Regulation of Subtilisin-like Proteases and Chitinases. Current Microbiology.Vol. 50. pp. 257-261.
35- Prakash,G.V.S.B. and Padmaja,V.(2012).Substrate effects and abiotic factors influencing protease enzyme production in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* .African J.of Biotechnology.Issn 1684-5315.
36- Braga, G.; Destéfano, R. & Messias,C. (1999) . Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. Revista de Microbiologia. 30 : 107-113.
37- Sumantha, A.; Deepa, P.; Sandhya1, C.; Szakacs, G.; Carlos, R. S. and Pandey1, A.(2006).Rice Bran as a Substrate for Proteolytic Enzyme Production. Brazilian archives of biology and technology. Vol.49, n. 5 : pp. 843-851.
38- Al-Juamily and H. Al-Zaidy, B.(2012)Optimization Conditions of Production Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus lichniformis*. British Journal of Pharmacology and Toxicology 3(6): 289-295.

39- Romero, F.; Garcia L.A.;and Diaz, M. ;(1998). Protease production from whey at high concentration by *Serratia marcescens.* Resour. Environ. Biotechnol., 2: 93–115. Cited from Muthulakshmi *et. al.*

40 - الحيدري، نظام كاظم والمصلح، رشيد محجوب . (1989) . الأحياء المجهرية الصناعية . الطبعة الأولى ، جامعة بغداد .
41-Ellaiah,**P**. and Srinivasulu,D.(1996).Production of extracellular protease by Streptomyces fradiae.Hind.Antibiot.Bull.,38:41-47.
42-Conn,T.K.;Cooper,R.M. and Charnley,A.K.(1987).Production of acidic protease.J.Gen.Microbiol.,133:1371-1382.
43- Irfan,M. ; Abdul Rauf, ; Syed,Q. ; Nadeem,M. & Baig,S. (2011). Exploitation of Different Agro-residues for Acid protease Production by *Rhizopus sp.*in Koji Fermentation. IJAVMS. Vol. 5. Issue 1:43-52.

44- Peek,K. ;Daniel,R.M.; Monk,C.;Parker,L. and Coolbear ,T.(1992).Purification and characterization of athermostable proteinase isolated from *Thermus* sp.strain Rt 41 A . European Journal of Biochemistry.Vol.207.NO.3 .PP. 1035-1044.

45- Engel,L.S.;Hill,J.M.;Caballero,A.R.;Green,L.C. and Callaghan,R.J. (1998). Protease IV a unique extracellular protease and virulence factor from Pseudomonas aeruginosa .J.Biol. Chem. .vol.273,no.27 ,pp.16792-16796 .

46- Frankena,J.;Koningostein,VanVerseveld,H.and Stouthamer,A.(1986).Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis* .Applied Microbiology and Biotechnology .vol.24,no.2,pp.106-112 .

47-Votruba,J.;Pazlarova,J.;Dvorakova,M.,Vachora,L.,Strnadova,M.; Kucerova,H.,Vinter,V.;Zourabian,R.and Chaloupka,J.(1991). External factors involved in the regulation of synthesis of an extracellular proteinase in Bacillus megaterium:effect of temperature .Applied Microbiology and Biotechnology,Vol.35,No.3,pp.352-357.

48- Rahman,R.N.;Geok, L.P.;Basri,M. and Salleh,A.B.(2005).Physical factors acting the production of organic solvent –tolerant protease by Pseudomonas aeruginosa strain K . Bioresource Technology,vol.96,no.4,pp.429-436.

49- Berry, D.R. (1975). The Environmental control of the physiology of filamentous fungi. In the filamentous fungi. Vol. 1 (ed. by Smith, J.R. & Berry, D.R) pp.16-32-Arnold.

50- Bull,A.T. and Bushnel,,M.E.(1976). Environmental control of fungal growth .Inthe filamentous fungi.J.E.Smith and D.R.Berry eds.Vol.2:1-26.Edward Arnold.London.

51-Ellaiah,P.;Adinarayana,K.;Bhavani,Y.;Padmaja,P.andSrinivasulu,B.(2002).Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated Aspergillus species .Process Biochem,38:615-620.

52- Akujobi ,C. ; Odu, N. ; Okorondu,S. & Ike,G.(2012) . Production of protease by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from abattoir environment . Journal of Research in Biology. Vol.2. No.2:077-082 .

53- Ali, S. S.; Vidhale ,N.N.(2013) Protease Production by *Fusarium oxysporum* in Solid- State Fermentation Using Rice Bran. American Journal of Microbiological Research, Vol. 1, 3, 45-47.

54- Ramon,A.M.;Porta,A. and Fonzi, W.A.(1999).Effect of environmental pHon morphological development of Candida albicans is mediated via the pac C-related transcription factor encoded by PRR2.J.Bacteriol.181(24):7524-7530.

55- Kucera,M.(1981).The production of toxic protease by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture .Journal of Invertebrate Pathology .Vol.38.(1), pp:33-38.

56-Negi,S. and Banerjee,R.(2010).Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation .African Journal of Biochemistry Research,Vol.4(3),pp.73-80.

57- Sandhya, C. ; Adapa, L. K. ; Nampoothiri, K. M. ; Binod, P. ; Szakacs, G. ; Pandy, A. (2004) . Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation . J. Basic Microbiol. , 44(1): 49-58

58- Abusham,R.A.;Rahman,R.N.Z.RA.;Salleh,A.B.(2009).Optimization of physical factors affecting the production of thermo-stable organic solvent –tolerant protease from anewly isolated halo tolerant *Bacillus subtilis* strain Rand .Microbial cell Factories,8:20 .

59- Haritha, R. ; SivaKumar,K. ; Swathi,A. ; Mohan,Y. & Ramana,T. (2011) . Characterization of marine *Streptomyces carpaticus* and optimization of condition for production of extracellular protease. Microbiology Journal . pp.1-13.
60- Deb, P.; Talukdar, S. A.; Mohsina, K.; Sarker, P. K. and Abu Sayem, S.M.(2013). Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* .SpringerPlus , 2:154.
61- سعود ، اسماء محمد ؛ عزيز ، غازي منعم ؛ الخفاجي ، زهرة محمود (2009) تحديد الظروف المثلى لأنتاج البروتييز من بكتريا *Staphylococcus aureus AG10* المعزولة محليا . المجلة العراقية للتقانات الحياتية 8 (1): 10-26 .

62- Paterson,I.C. ;Charnley,A.K.; Cooper,R,M. and Clarkson,M.(1994). Specific induction of a cuticle-degrading protease of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* .Microbiology,140,pp:185-189.
63- Sepahy,A. & Jabalameli, L. (2011) . Effect of culture conditions on the production of an extracellular protease by *Bacillus* sp. Isolated from soil sample of Lavizan Jungle park. Enzyme Research. pp. 1-7 .
64- Casida, L. E. Jr. (1968) . Industrial microbiology . John Wiley and Sons , Inc. , New York .

65- Rhodes, A. and Fletcher, D. L. (1966) . Principles of industrial microbiology . 1st ed. Pergamon Press , Oxford .

66- Stanbury, P. F. and Whitaker, A. (1984) . Principles of fermentation technology . 1st ed. Pergamon Press , Oxford .
67- Genckal,H. and Tari,C.(2006).Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from natural habitats .Enzyme Microbial Technology .vol.39,no.4,pp.703-710 .
68- Calik.P.;Bilir,E.;Calic,G. and Özdamar ,T.H.(2002). Influence of pH condition on metabolic regulation in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* .Enzyme Microbial Technology .vol.31,no.5,pp.685-697 .

69- Singh, R.S.; Sooch, B.S. and Puri, M. (2007b). Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. Bioresource Technology 98: 2518-2525.

70- Ghanem, K. ; AL-Fassi,F. & Farsi, R. (2011). Statistical optimization of cultural condition for chitinase production from shrimp shellfish waste by *Alternaria alternata* . African Journal of Microbiology Research. Vol. 5(13).pp.1649-1659.
71- Haq, I.-U.; Mukhtar, H. & Umber, H. (2006). Production of protease by *penicillium chrysogenum* Through Optimization of Environmental conditions.Journal of Agriculture & Social Sciences.Vol.2. No.1: 23-25.
72- Ventosa,A.;Nieto,J.J.andOren,A. (1998).Microbiol.Mol.Biol.Rev.62:504-544.

73- Suganthi ,C.;Msgeswari,A. ;Karthikeyan,S.;Anbalagan,M.;Sivakumar,A. and Gothandam,K.M.(2013).Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments.J.of Genitic Engineering and Biotechnology .11,47-52.

* Determining the optimum culture's conditions for protease production from *Metarhizium anisopliae*

Mohammed Reddah Annon
Sciences College /Al-Qadisiya University

Muna Ibrahim Jasim
Education of sciences freehold College / Kerballa University
ELWEA12@YAHOO.COM

Summary

The identify optimum conditions for protease production from *Metarhizium anisopliae* and the maximum yield was in the medium contain Date syrup (DS) at concentration 0.05 % as carbon sources and supplemented with 0.5 % gelatin as nitrogen sources , the inoculum size was 16 % at initial pH 5.5 after 72 h from incubation with rotary shaker at 100 rpm at the temperature 30 ˚C .

Key words : protease , *Metarhizium anisopliae*, Date syrup

*the research borrower from the doctorate thesis for the second researcher.