دراسة كيموحيوية لإنزيم البروتيز المنتج من الفطر

Beauveria bassiana

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم – جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة

من قبل الطالبة

سرور محمد علي العبادي

بكالوريوس علوم حياة – جامعة كربلاء

2006

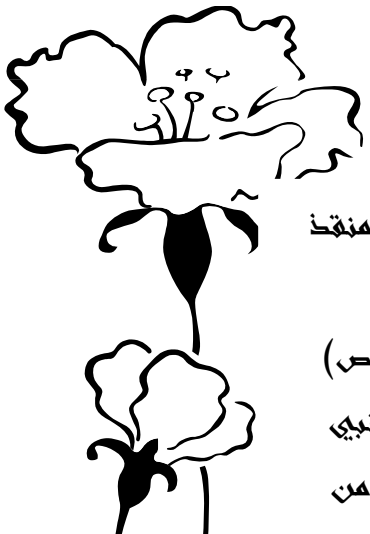
بإشراف

أ.م.د. علي عبد الكاظم جاسم

رمضان 1433 هـ

تموز 2012م

بسم الله الرحمن الرحيم
﴿رَبِّ أَوْزِعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ
الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ وَعَلَى وَالِدَيَّ وَأَنْ
أَعْمَلَ صَالِحًا تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي
بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ﴾
صدق الله العظيم
النمل ﴿١٩﴾



الإهـــــداء

الى صاحب الحضرة النبوية ..والرسالة الإلهية ..ومنقذ البشرية ..

إلى نبي الرحمة لهذه الأمة محمد (ص)

إلى منبع العطف والحنان .. ومن علمني نهج النبي والقرآن .. إلى من براحتيه وجدت الأمان ..إلى من فقدته منذ فترة من الزمان

...والدي العزيز(رحمه الله)

إلى من كللها الله بالهيبة والوقار ..ومن علمتني إن ارتقي سلم الحياة بحكمة واصطبار .. وساعدتني على نيل شهادتي هذه بكل افتخار

...والدتي العزيزة (رحمها الله)

إقرار المشرف

أشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيـــــــع :

الاســـــــم : د. علي عبد الكاظم جاسم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنـــــــوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريـــــــخ : / / 2012

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات أعلاه والمقدمة من قبل المشرف ، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيـــــــع :

الاســـــــم : د. ناجح هاشم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنـــــــوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريـــــــخ : / /2012

إقرار المقوّم اللغوي

أقر بأني قومت رسالة الماجستير الموسومة بـ (دراسة كيموحيوية لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *Beauveria bassiana*) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة إذ تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيـــــــع :

الاســـــــــم :

المرتبة العلمية :

التاريـــــــخ :

إقرار المقوّم العلمي

أقر بأني قومت رسالة الماجستير الموسومة بـ (دراسة كيموحيوية لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *Beauveria bassiana*) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة تقويماً علمياً .

التوقيـــــــع :

الاســـــــــم :

المرتبة العلمية :

التاريـــــــخ :

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة، نشهد أننا اطلعنا على هذه الرسالة وقد ناقشنا الطالبة سرور محمد علي في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونرى إنها جديرة بالقبول لنيل شهادة الماجستير في علوم الحياة وبتقدير إمتياز .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. عودة مزعل ياسر

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة بابل / كلية العلوم

التاريخ : / / ٢٠١٢

عضواً

التوقيع :

الاسم : د. مؤيد عمران موسى

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة بابل / كلية الطب

التاريخ : / / ٢٠١٢

عضواً

التوقيع :

الاسم : د. زهير حميد عبود

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريخ : / / ٢٠١٢

عضواً ومشرفاً

التوقيع:

الاسم : د. علي عبد الكاظم جاسم

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريخ : / / ٢٠١٢

مصادقة عميد كلية العلوم / جامعة كربلاء

التوقيع :

الاسم : د. أحمد محمود عبد اللطيف

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريخ : / / ٢٠١٢

بسم الله الرحمن الرحيم

شكر وتقدير

الحمد لله الذي تحيرت العقول والأفهام في كبرياء ذاته ، وكلَت الألسن والأقلام في بيان صفاته ، والصلاة والسلام على أمينه المصطفى ورسوله الأمجد أبي الزهراء محمد صلوات الله عليه وعلى أهل بيته الأوفياء الصادقين ، وبعد . . .

لا يسعني وأنا أنهي خطوتي الأخيرة في مشوار دام أكثر من سنتين إلاَ أن أقف متضرعة إلى الباري عز وجل وأخصه بالثناء والفضل على ما أمدني به من قوة وصبر لإنجاز هذه الدراسة .

ويسرني أن أتقدم بجزيل الشكر لذي العقل النير أستاذي الدكتور علي عبد الكاظم الغانمي الذي تكرم مشكوراً بإختيار الموضوع وأعانني بالإشراف عليه وقاسمني مشقة البحث ولم يبخل عليَ بعلمه ووقته فكان بحق مثالاً يحتذى به فأسال الله أن يثيبه وافر الجزاء .

كما ويطيب لي ان اتوجه بالشكر الى عمادة كلية العلوم ورئاسة ومنتسبي قسم علوم الحياة والى الذين جعلوا من فكرهم منارة أنارت لنا مسيرة العلم . . . أساتذة الكلية الأفاضل .

ولا يفوتني أن أشكر الدكتور زيدان خليف من كلية العلوم للبنات / جامعة بابل لتفضله مشكوراً بتزويدنا بالعزلة الفطرية المستخدمة في الدراسة .

وكيف أنسى إذ بلغت ما بلغت من تقديم شكري وأمتناني إلى عائلتي وصديقاتي وأخص منهم بالذكر حوراء وسهاد وطلبة الدراسات العليا . . . وإلى كل من أسهم بنصح أو مشورة لأجل إتمام هذا العمل فجزاهم الله خيراً .

. . . وفق الله الجميع لما فيه الخير . . .

سرور

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لتحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر ***Beauveria bassiana*** . كما شملت الدراسة تنقية جزئية لإنزيم البروتييز ودراسة بعض صفاته المهمة ، وأظهرت النتائج ما يأتي :

- كانت الظروف المثلى لإنتاج الإنزيمين هي إستخدام وسط مكوّن من خميرة الخبز بنسبة 1.5 % المدعم بـ 0.3 % من كبريتات الأمونيوم برقم هيدروجيني ابتدائي 6.5 وحجم لقاح مقداره 16%والحضن في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 30 مْ بسرعة رج 150 دورة / دقيقة ولمدة 72 ساعة .

- تم تنقية إنزيم البروتييز من الفطر ***B. bassiana*** جزئياً وقد إشتملت خطوات التنقية على الديلزة ثم الترسيب بالايثانول (70) % ثم التبادل الأيوني بإستخدام المبادل DEAE-Cellulose ، حيث حققت الخطوة الأخيرة عدد مرات تنقية 2.13 مرة بحصيلة إنزيمية 16.3 % .

- بعد توصيف إنزيم البروتييز ، أظهرت النتائج ما يأتي :

1- بلغت قيم ثابت ميكالس (K_m) (4.34 و6.26 و6.66) ملغم / مل حيال الكازائين والجيلاتين والبومين المصل البقري كمواد تفاعل ، على التوالي . في حين بلغت قيم السرعة القصوى (V_{max}) (16.13 و16.66 و16.66) ملغم / مل . دقيقة حيال البروتينات الثلاثة المستخدمة في الدراسة ، على التوالي أيضاً .

2- كان الرقم الهيدروجيني 9.0 هو الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز ، في حين تراوح الرقم الهيدروجيني للثبات بين (8.0-10.0) .

3- أظهر الإنزيم ثباتاً حرارياً بين (20-40) مْ لمدة 30 دقيقة .

4- تباين تأثير الأيونات المعدنية والمواد الكيمياوية المستخدمة في هذه الدراسة في فعالية إنزيم البروتييز ، إذ أدى إستخدام مادة الـ PMSF بالتركيزين (1 و5) ملي مولر إلى تثبيط فعالية الإنزيم تماماً مما يدل على أن الإنزيم يعود إلى مجموعة البروتييز السيريني، بينما كان لكلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) و كلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$) تأثيراً حاثاً لفعالية الإنزيم .

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة	أ-ب
	المقدمة	1
1	استعراض المراجع	4
1-1	الفطريات الممرضة للحشرات (Entomopathogenic Fungi, EPF)	4
2-1	الجنس *Beauveria*	5
1-2-1	الفطر *Beauveria bassiana*	6
3-1	المكونات الرئيسة لجدار الحشرة (Insect cuticle)	8
1-3-1	البروتين (Protein)	9
2-3-1	الكايتين (Chitin)	9
4-1	الإنزيمات المحللة لكيوتكل الحشرة	10
1-4-1	إنزيم البروتييز (Protease)	11
2-4-1	إنزيم الكايتينيز (Chitinase)	13
5-1	تأثير الظروف المزرعية والبيئية في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز	14
	1- تأثير مدة الحضن	14
	2- تأثير سرعة الرج	15
	3- تأثير المصدر الكاربوني	16
	4- تأثير المصدر النيتروجيني	17
	5- تأثير درجة الحرارة	18
	6- تأثير الأملاح المعدنية	19
	7- تأثير حجم اللقاح	20
	8- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي	21
6-1	تنقية إنزيم البروتييز	21
7-1	توصيف إنزيم البروتييز	23
	1- تعيين قيم ثابت ميكالس (K_m) و السرعة القصوى (V_{max})	23

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	2- تخصص الإنزيم حيال مادة التفاعل	24
	3- تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الإنزيم	25
	4- تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيم	26
	5- تأثير درجة الحرارة في ثبات الإنزيم	27
	6- تأثير بعض الأيونات والمواد الكيميائية في فعالية الإنزيم	28
2	**المواد وطرائق العمل**	30
2-1	المواد والأجهزة المستخدمة	30
2-1-1	المواد الكيميائية المستخدمة والشركات المصنعة لها	30
2-1-2	الأجهزة المستخدمة و الشركات المصنعة لها	31
2-2	طرائق العمل	32
2-2-1	العزلة الفطرية المستخدمة في الدراسة	32
2-2-2	تحضير اللقاح (البذرة)	32
2-2-3	تحضير وسط الإنتاج	32
2-2-4	تلقيح وسط الإنتاج	33
2-2-5	تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر ***Beauveria bassiana***	33
	1- تأثير مدة الحضن	34
	2- تأثير سرعة الرج	34
	3- تأثير تركيز المصدر الكاربوني	34
	4- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه	34
	5- تأثير درجة الحرارة	35
	6- تأثير نوع الأملاح المعدنية و تركيزها	35
	7- تأثير حجم اللقاح	35
	8- تأثير نسبة مساحة سطح الوسط إلى حجمه	35
	9- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي	36

التسلسل	الموضوع	الصفحة
2-2-6	تقدير فعالية إنزيم البروتييز	36
2-2-7	تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز	37
	1- عمل المنحنى القياسي لمادة البارانيتروفينول (pNP)	38
	2- تقدير الفعالية	39
2-2-8	تقدير البروتين	40
2-2-9	تنقية إنزيم البروتييز المنتج من الفطر *Beauveria bassiana*	42
	1- الديلزة	43
	2- الترسيب بالايثانول بنسبة 70%	43
	3- التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose	43
2-2-10	توصيف إنزيم البروتييز	45
	1- تقدير الثوابت الحركية للإنزيم	45
	2- تخصص الإنزيم حيال مادة التفاعل (Substrate specificity)	46
	أ- الفعالية النسبية للإنزيم بأستخدام مواد تفاعل مختلفة	46
	ب- تقدير الثوابت الحركية للإنزيم بإختلاف مادة التفاعل	47
	3- تقدير الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم	47
	4- تقدير الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم	48
	5- تقدير الثبات الحراري للإنزيم	51
	6- تأثير بعض الأيونات المعدنية والمواد الكيميائية في فعالية الإنزيم	51
3	**النتائج و المناقشة**	54
3-1	تحديد الظروف المثلى لإنتاج أنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *Beauveria bassiana*	54
	1- تأثير مدة الحضن	54
	2- تأثير سرعة الرج	57
	3- تأثير تركيز المصدر الكاربوني	59
	4- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه	61

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	5- تأثير درجة الحرارة	64
	6- تأثير نوع الأملاح المعدنية و تركيزها	66
	7- تأثير حجم اللقاح	68
	8- تأثير نسبة مساحة سطح الوسط إلى حجمه	70
	9- تأثير الرقم الهيدروجيني الإبتدائي	72
2-3	التنقية الجزئية لإنزيم البروتييز	73
	1- الديلزة	75
	2- الترسيب بالكحول الأثيلي	75
	3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني	77
3-3	توصيف إنزيم البروتييز	80
	1- الثوابت الحركية للإنزيم [ثابت ميكالس (K_m) و السرعة القصوى (V_{max})]	80
	2- تخصص الإنزيم حيال مواد تفاعل مختلفة	81
	3- الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم	85
	4- الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم	87
	5- الثبات الحراري للإنزيم	88
	6- تأثير بعض أيونات المعادن و المواد الكيمائية في فعالية الإنزيم	90
	الاستنتاجات والتوصيات	94
	المصادر	95
	الخلاصة باللغة الانكليزية	A-B

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1	خطوات تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *B. bassiana*	76
2	الثوابت الحركية لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana* حيال مواد تفاعل مختلفة	84
3	الفعالية النسبية لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana* حيال بروتينات مختلفة	85
4	تأثير بعض الأيونات المعدنية و المواد الكيميائية في فعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana*	92

قائمة المخططات

رقم المخطط	العنوان	الصفحة
1	تصنيف إنزيمات البروتييز على أساس موقع عملها على البروتين بعيداً عن النهايات الطرفية	12
2	تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *B. bassiana*	74

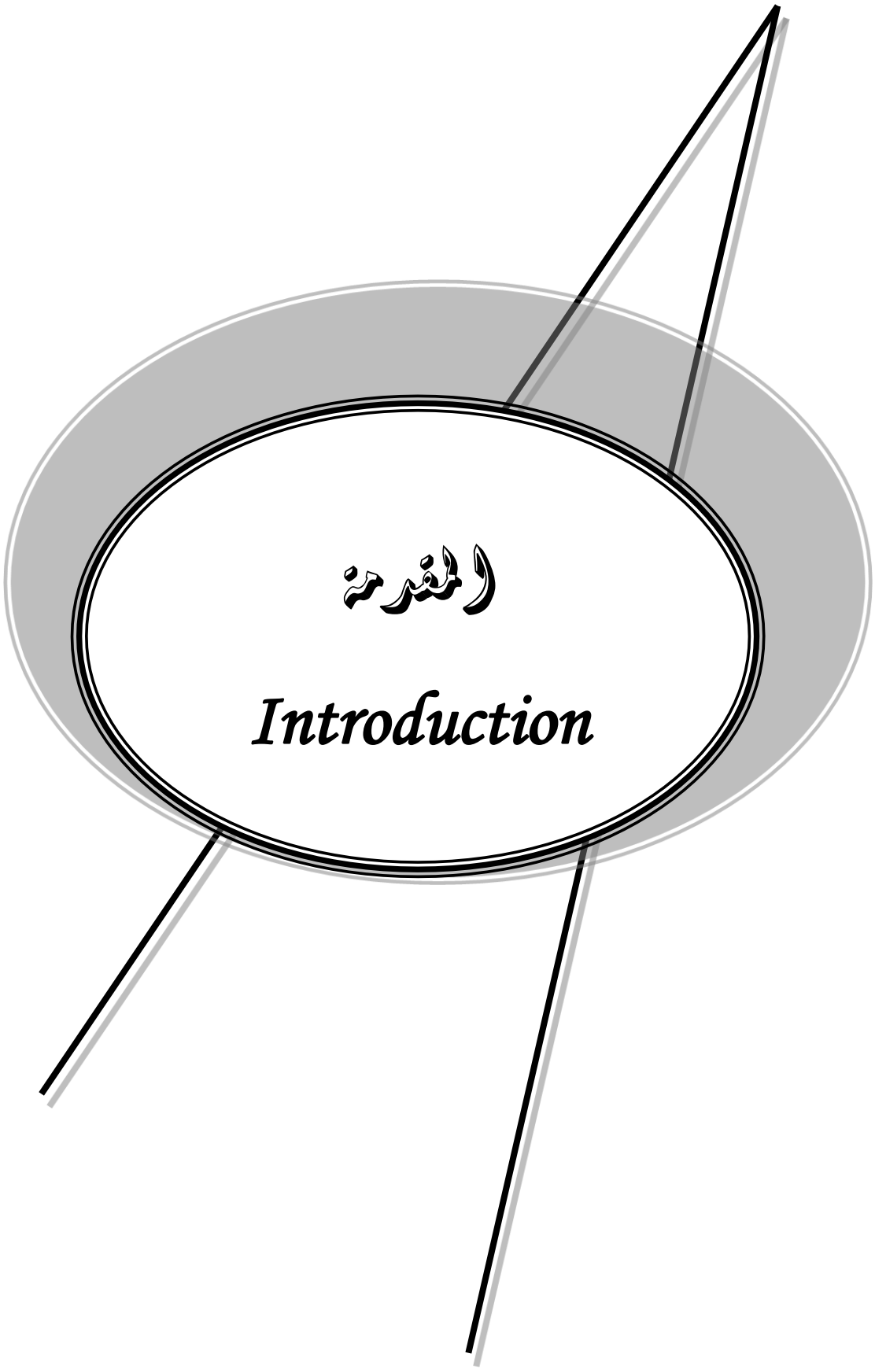
قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1	المنحنى القياسي للبارانيتروفينول (pNP)	39
2	المنحنى القياسي للبروتين بطريقة برادفورد	42
3	تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *B. bassiana*	55
4	تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز و من الفطر *B. bassiana*	58
5	تأثير تركيز المصدر الكاربوني في إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *B. bassiana*	60
6	تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج إنزيمي : البروتييز (A) و الكايتينيز (B) من الفطر *B. bassiana*	62
7	تأثير تركيز كبريتات الأمونيوم في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana*	63
8	تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز و من الفطر *B. bassiana*	65
9	تأثير نوع الأملاح المعدنية في إنتاج إنزيمي : البروتييز (A) و الكايتينيز(B) من الفطر *B. bassiana*	67
10	تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *B. bassiana*	69
11	تأثير نسبة مساحة سطح الوسط / حجمه في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana*	71
12	تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana*	72
13	كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم البروتييز من الفطر *B.bassiana* باستخدام عمود DEAE-Cellulose (1.8×18) سم الذي تمت موازنته بمحلول منظم الترس (0.005 مولر ، برقم هيدروجيني8.0) تم الاسترداد بمحلول تدرج ملحي من كلوريد الصوديوم (0.0–0.3) مولر بسرعة جريان 1 مل / دقيقة وبواقع 3 مل / جزء	78

14	منحنى لاينويفر–بورك لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana* باستخدام الكازائين مادة تفاعل	80
15	منحنى لاينويفر–بورك لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana* باستخدام الجيلاتين مادة تفاعل	82
16	منحنى لاينويفر–بورك لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana* باستخدام البومين المصل البقري مادة تفاعل	83
17	الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana*	86
18	الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana*	87
19	الثبات الحراري لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana*	89

المختصرات الواردة في الرسالة

Bsa	Bovine serum albumin
DEAE-Cellulose	Diethyl amino ethyl-cellulose
Dtt	Dithiothreitol
Edta	Ethylene diamine tetra acetic acid
EPF	Entomopathogenic fungi
GlcNAc	N-acetylglucosamine
IAA	Iodoacetamide
K_m	Michaelis-Menten Constant
PDA	Potato dextrose agar
PMSF	Phenyl methyl sulfonyl fluoride
pNP	p-Nitrophenol
pNP-GlcNAc	p-Nitrophenyl N-acetyl β-D-glucosaminide
TCA	Tri chloro acetic acid
V_{max}	Maximum velocity


المقدمة
Introduction

المقدمة (Introduction)

إن ظهور العديد من المشاكل البيئية والصحية للإنسان في العقود الأخيرة جراء الإستخدام المفرط للمبيدات الكيميائية أعطى دافعاً قوياً لتطوير عوامل السيطرة الحيوية المايكروبية (Microbial Biocontrol Agents , MBCAs) لإستخدامها في مجال السيطرة المتكاملة (Integrated control) على الحشرات الضارة .

وتمثل الفطريات الممرضة للحشرات (Entomopathogenic Fungi, EPF) المجموعة الأكثر أهمية من بين الـ MBCAs نظراً لسهولة إطلاقها إلى الطبيعة وتوفر عدد كبير من السلالات الممرضة منها وإمكانية تطويعها وراثياً من خلال زيادة تعبير البروتينات الداخلية (Endogenous proteins) أو السموم الخارجية (Exogenous toxins) (Khan *et al.* ,2012) .

يتميز كيوتكل الحشرات (Insects cuticle) بتركيب معقد يتكون بشكل رئيس من البروتين و الكايتين المحاطين بطبقة من الشمع والدهن أو الأحماض الدهنية . ويمثل البروتين الغالبية العظمى من هذا التركيب ، إذ يشكل حوالي(50–80) % يليه الكايتين بنسبة (25–40) % (Nevill ,1975 ; Khan *et al.* ,2012) .

تمتلك الفطريات الممرضة للحشرات آليات متنوعة لتحطيم كيوتكل الحشرات لعل في مقدمتها إمكانية إفرازها للعديد من الإنزيمات المحللة للكيوتكل مثل إنزيمات البروتييز(Proteases) والكايتينيز(Chitinases) واللايبيز(Lipases) (Inglis *et al.* ,2001) ، التي لها القابلية على تحليل البروتين والكايتين والدهن المكونة للكيوتكل على التوالي ، فضلاً عن إنتاجها للعديد من مواد الأيض الثانوي ذات التاثير السمي على الحشرات .

تصنف أنزيمات البروتييز ضمن انزيمات التحلل المائي (Hydrolases) وتؤلف مجموعة كبيرة من الإنزيمات التي تقوم بتحليل البروتينات إلى ببتيدات صغيرة وأحماض أمينية . وتختلف تلك الإنزيمات فيما بينها في العديد من الخصائص خاصة فيما يتعلق بتخصصية مادة التفاعل

(Substrate specificity) والموقع الفعال وآلية الحفز الإنزيمي ودرجتي الحرارة والرقمين الهيدروجينيين للفعالية والثبات (Nirmal *et al.* ,2011) .

ونظراً لتخصصها الواسع حيال مواد التفاعل فقد تميزت هذه الإنزيمات بالعديد من التطبيقات خاصة في المجالات الغذائية والطبية والصيدلانية والصناعية الأخرى مما جعلها تتبوأ موقع الصدارة بين مجاميع الإنزيمات الأخرى لتحتل 60 % من السوق العالمي للإنزيمات (Muthulakshmi *et al.* ,2011 ; Nirmal *et al.* ,2011) .

ينتمي الفطر *Beauveria bassiana* إلى مجموعة الفطريات الممرضة للحشرات ويتميز بقابليته على إصابة أنواع مختلفة من الحشرات الضارة . وقد أستخدم الفطر بشكل واسع في إبادة العديد من الآفات التي تصيب المحاصيل المهمة إقتصادياً في العالم وأدخل ضمن الإدارة المتكاملة لمكافحة الحشرات (Integrated Pest Management , IPM) (Prasad & Syed,2010) .

تتمثل عوامل الضراوة لهذا الفطر بإنتاجه للنظام الإنزيمي المحلل للكيوتكل والتي تقع في مقدمتها إنزيمات البروتييز فضلاً عن إنتاجه لمواد الأيض الثانوي السامة مثل 2-Pyridone tenellin وBeauvericin و Bassianolide و Beauverolides و Oosporin (Xu *et al.* ,2007) .

وقد أظهرت دراسات عدة أن الفطر *B.bassiana* لا يشكل عاملاً ملوثاً للبيئة والإنسان ، وغير ممرض للأعداء الطبيعيين وحشرات التربة النافعة مما شجع العديد من الباحثين في مختلف دول العالم على دراسة إمكانية إستخدامه في السيطرة الحيوية بديلاً للمبيدات الكيميائية (Kooyman *et al.* ,1997 ; Thungrabeab & Tongma ,2007) .

و نظراً لأهمية النظام الإنزيمي المنتج من الفطر *B.bassiana* في إحداث الإصابة بالحشرات لذا فأن أهداف هذه الدراسة تنحصر بما يأتي :

1- التحري عن أهم الإنزيمات المحللة للكيوتكل المنتجة من الفطر *B.bassiana* .

2- تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر قيد الدراسة .

3- تنقية إنزيم البروتييز بالطرائق المتاحة .

4- توصيف إنزيم البروتييز .

الفصل الأول

استعراض المراجع

Literature Review

1-استعراض المراجع

1-1 الفطريات الممرضة للحشرات (Entomopathogenic Fungi, EPF) :

تعد الفطريات الممرضة للحشرات العوامل التنظيمية المفتاح (Key Regulatery Factors) في مكافحة الحشرات في الطبيعة حيث جذبت تلك الفطريات الإهتمام إليها لأسباب عدة أهمها كونها بدائل واعدة لمبيدات الحشرات الكيميائية سواءً أستخدمت لوحدها أو بمزجها مع مبيدات الحشرات المختلفة وبالتالي إمكانية إستخدامها بنجاح في مكافحة آفات المحاصيل الزراعية ، فضلاً عن كونها تعد المجموعة الوحيدة من عوامل السيطرة الحيوية التي تكون فعالة ضد كل من الحشرات الماصة للعصارات النباتية والحيوانية ، والحشرات التي تتغذى على أنسجة الأوراق وكذلك الجراد ، إضافة إلى الآفات الحشرية التابعة لرتبة Coleoptera والمسؤولة عن أمراض بكتيرية أو فايروسية غير معروفة تصيب الإنسان والحيوان(Zhang *et al.* ,2008 ; Ambethgar ,2009 ; Safavi ,2010) .

وذكر Sun *et al.* (2008) أن معظم الأمراض الفطرية التي تصيب الحشرات سببها الفطريات التي تعود إلى مجموعة الـ (EPF) والتي تضم مايقارب 750 نوع موجودة ضمن كل الرتب التابعة للفطريات الحقيقية Eumycota (Mccoy & Tigano-Milani ,1992) ، ومن أهم هذه الأنواع التي أمكن توظيفها بنجاح للقضاء على تشكيلة مختلفة من الآفات الحشرية وفي أنظمة بيئية مختلفة *Beauveria bassiana* و *Metarhizium anisopliae* و *Verticillium lecanii* (Zayed ,2003) . إضافة إلى *Hirsutella thompsonii* و *Nomuraea rileyi* و *Paecilomyces* spp. (Ambethgar ,2009) و *Aschersonia aleyrodis* و *Lagenidium giganteum* (Mccoy &Tigano-Milani ,1992) .

ولكون هذه الفطريات على خلاف الممرضات الأخرى من البكتريا والفايروسات التي تصيب الحشرات لا تحتاج إلى أن تستهلك من قبل المضيف (الحشرة) وإنما من خلال إفرازها لبعض الإنزيمات المهمة مثل البروتييز والكايتينيز واللايبيز كذلك التراكيب الفطرية التي تخترق مباشرة جدار الحشرة (الكيوتكل) ; (Pirali-Kheirabadi *et al.* ,2007 Lekimme *et al.* ,2008) فإن لها مدى مضيفي واسع مثل الفطر*B. bassiana* والفطر *M. anisopliae* أوقد تكون متخصصة لمضيف معين (Thungrabeab & Tongma ,2007) . وتكون هذه الفطريات بضمنها الفطر *B. bassiana* قادرة على إصابة مراحل الحشرة جميعها (البيض واليرقات والعذارى والبالغات) (العبيدي وسمير، 2011 ; 2007 , Pirali-Kheirabadi *et al.*) .

وقد أمكن في الوقت الحاضر تعديل بعض الخصائص الوراثية للفطريات الممرضة للحشرات من خلال تقنيات البايولوجي الجزيئي لإنتاج سلالات محسنة من هذه الفطريات (Roberts,1989).

1-2 الجنس *Beauveria* :

هو أحد الفطريات الممرضة للحشرات المعروفة عالمياً والذي يتواجد طبيعياً في التربة ، وينتج مواد أيضية فعالة بايولوجياً (Rehner & Buckley ,2005) .

ينتمي الجنس *Beauveria* إلى تحت قسم الفطريات الناقصة Deuteromycotina وصنف Hyphomycetes ورتبة Entomophthorales وعائلة Cordycipitaceae (Roberts ,1989 ; Rehner *et al.* , 2011) .

على الرغم من الإهتمام المتزايد بتطوير إستخدام هذا الجنس كبديل للمبيدات الكيميائية إلا أن التقدم نحو هذا الهدف أعيق نوعاً ما بسبب الصعوبات التي واجهت الباحثين في تشخيص وتصنيف الأنواع التابعة لهذا الجنس والتي تعتمد على معايير شكلية (Morphological) (Rehner & Buckley ,2005 ; Safavi , 2010) .

يتصف الجنس *Beauveria* تركيبياً بوجود الخلايا المولدة للأبواغ(Conidiogenous cells) الكروية او المخروطية الشكل تنشأ منها الأبواغ (Conidia) والتي تمتاز بكونها شفافة كروية إلى بيضوية الشكل ذات أبعاد تتراوح بين (1.5 -5.5) مايكروميتر، وتتوالد من الحامل الكونيدي بشكل متعاقب (Sympodial (Rehner *et al.* , 2011) succession) . كما أن وجود Denticulate rachis يعد صفة مميزة للأنواع العائدة للجنس *Beauveria* De (Hoog ,1972) .

تتغاير الأنواع التابعة لهذا الجنس من حيث إنتاجها للإنزيمات ومعدل نموها على أوساط زرعية مختلفة وأبعاد الكونيديا وعوامل الضراوة (Sosa-Gomez *et al.* ,1994) ويضم هذا الجنس الأنواع الآتية *B.bassiana* و *B.brongniartii* و*B.alba* (De Hoog ,1972) ، و *B.velata* و *B.amorpha* (Samson & Evans , 1982) ، و *B.caledonica* (Glare *et al.* ,2008) ، كما وصف Liu *et al.* (2001) نوع جديد لهذا الفطر

وهو *B.sobolifera* ، بالإضافة إلى ستة أنواع أكتشفت مؤخراً هي *B.varroae* و *B.kipukae* و *B.pseudobassiana* و *B.sungii* و*B.australis* و *B.asiatica* (Rehner *et al.* , 2011) .

إن جميع أنواع الفطر *Beauveria* spp. قادرة على إنتاج إنزيمات خارج خلوية محللة للكيوتكل تشمل (Proteases و Chitinases و Lipase و β-1,3 glucanase) والتي لها دور مهم في الإمراضية الفطرية (Pathogenecity) من خلال عملها مع القوى الميكانيكية في إختراق كيوتكل الحشرة (Campos *et al.* ,2010 ; Safavi , 2010) كما أن لها القابلية على إنتاج العديد من المواد الأيضية (Metabolites) والتي لها تأثير سمي على المضيف وأثبتت فاعليتها كمبيدات كيميائية ضد الآفات الحشرية منها Beauvericin و Bassianolide و Oosporein (Khan *et al.* ,2012 ; Roberts *et al.* ,1992) .

1-2-1 الفطر *Beauveria bassiana* :

يمثل هذا الفطر أول كائن مجهري وصف كعامل مسبب للأمراض المعدية (Contagious diseases) (Zayed , 2003) ، حيث وصفه لأول مرة العالم الإيطالي Agostino Bassi عام 1835 بأنه العامل المسبب لمرض الموسكاردين الأبيض (White muscardin disease) في دودة القز(Silk worm) في فرنسا وإيطاليا والذي سبب آنذاك خسائر إقتصادية في جنوب أوروبا في القرنين الثامن والتاسع عشر (Rehner & Buckley ,2005) .

يعد واسع الإنتشار في كل مناطق العالم ويمكن عزله من الحشرات ، والعث (Mites) والتربة (Safavi ,2010) كما عزل من الأفراد الميتة لأنواع مختلفة من المفصليات في الحقول الزراعية والغابات (Draganova *et al.* ,2011) وقد يتواجد الفطر بشكل طبيعي داخل الأنسجة النباتية دون ظهور أي أعراض ويدعى حينئذ Endophyte (Vega ,2008) .

وقد لوحظ وجود إختلافات وراثية كبيرة بين العزلات المختلفة لهذا الفطر، كما وتتفاوت في إمراضيتها وعوامل الضراوة ضد حشرات مختلفة ، إضافة إلى خصائص الـ DNA والإنزيمات (Safavi ,2010) مما يجعل هذه العزلات تقتصر على مضيف محدد (Zayed , 2003) .

يرتبط الفطر تطورياً (Phylogenetically) بالنوع الجنسي *Cordyceps bassiana* والذي ينتمي إلى شعبة الفطريات الكيسية Ascomycota ، صنف Hypocreales (Rehner & Buckley ,2003) .

تنمو مستعمرات الفطر بشكل بطيء على طبق أگار ديكستروز البطاطا (PDA) وبدرجة حرارة الغرفة ، وتكون كثيفة صوفية المظهر تشبه الدقيق لونها أبيض في البداية ثم يصبح أصفر باهت وأحياناً وردي ، ويتراوح قطرها بين (25-30) مايكروميتر، والغزول الفطرية شفافة مقسمة ومتفرعة تحمل عناقيد (clusters) من الخلايا المولدة للأبواغ (Conidiogenous cells) والتي تنشأ منها الكونيدات المميزة بشكلها الكروي أو الأسطواني أوالكلوي .

إن مايميز هذا الفطر هو توزيع الأبواغ بشكل متعاقب (الكونيدات كاذبة المحور Sympodial spore) على حامل الأبواغ مما يعطيه الشكل المسنن ويكَون مايعرف بـ Synnemata (De Hoog ,1972 ; Liu *et al.* ,2001 ; Rehner & Buckley ,2005) .

ومما يجدر الإشارة إليه أن إمراضية الفطر تتأثر بعوامل غير حيوية عدة أهمها الرطوبة والحرارة (Hastuti *et al.* ,1999) كما ذكر Cagáň & Švercel (2001) أن هناك عوامل أخرى ربما تتداخل مع خصائص الفطر الشكلية والفسيولوجية والكيموحيوية لتؤثر على إمراضية الفطر منها التعرض للأشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet) .

3-1 المكونات الرئيسية لجدار الحشرة (Insect cuticle) :

يمثل جدار الحشرة (الكيوتكل) تركيباً معقداً جداً له خواص ميكانيكية مميزة تنسب إلى مكوناته الرئيسة من البروتين والكايتين إضافةً إلى الأحماض الدهنية . ويختلف تركيب وخصائص الكيوتكل في المراحل المختلفة للحشرات إعتماداً على مصدر الحشرة وحتى في مناطق مختلفة من الكيوتكل للحشرة نفسها (Suderman *et al.* ,2010 ; Gupta *et al.* ,1992 ; Kang *et al.* ,1999) .

يتكون الكيوتكل بشكل رئيس من ألياف كايتينية (Chitin fibrils) مطمورة ضمن مادة بروتينية (Protein matrix) ودهنية وصبغات وN-acylcatecholamines والتي تكون حاجزاً ضد غزو المايكروبات (Suderman *et al.* ,2010) .

وقد كشف Vincent & Wegst (2004) عن وجود بعض الفلزات مثل (الحديد Fe والمنغنيز Mn والزنك Zn) والأيونات إضافةً إلى الماء وكاربونات الكالسيوم في تركيب الكيوتكل . إن الإرتباطات التساهمية بين مكونات الكيوتكل كالبروتين والكايتين تجعل البروتين غير قابل للأستخلاص (Suderman *et al.* ,2006) .

ويتألف الكيوتكل من طبقات عدة ، إذ تتمثل هذه الطبقات من الخارج :

Cement and wax layer : تقع مباشرة فوق طبقة الـ Epicuticle مؤلفة بصورة رئيسة من مواد دهنية .

الطبقة الخارجية Epicuticle : طبقة رقيقة تفتقر إلى الكايتين وتتكون بشكل رئيس من بروتينات.

الطبقة الداخلية Procuticle : طبقة سميكة تمثل معظم الكيوتكل تتألف من ليبفات كايتينية مطمورة ضمن مادة بروتينية ، وفينولات متعددة ، وماء مع كميات صغيرة من الدهون وتقسم بدورها إلى قسمين : Exocuticle و Endocuticle (Dennell ,1946 ; Vincent & Wegst ,2004) .

للكيوتكل وظائف عدة فهو يقوم بدور رئيس في حماية الحشرات ضد المفترسات (Predators) والممرضات (Pathogens) كما إنه يسند الحشرة ويعطيها شكلها إضافةً إلى قابليته على الإلتصاق ومقاومة الأحتكاك وحماية الحشرة من الأشعة فوق البنفسجية والجفاف فضلاً عن إمكانية عمله كمجس (Sensor) ومساعدته للحشرة على المشي والطيران (Suderman *et al.* ,2010 ; Vincent & Wegst,2004) .

1-3- 1 البروتين (Protein) :

يشكل البروتين ما يقارب 70 % من الكيوتكل (Roberts ,1989) . من المحتمل أنه يصنع ويفرز من البشرة (Epidermis) وهو يكون مادة ذات خصائص ميكانيكية مختلفة ، ويرتبط مع الكايتين في منطقة ضيقة تسمى طبقة Schmidt بوجود كمية كبيرة من الماء (بحدود 90 %) والتي تعد ضرورية للإرتباطات بين الكايتين و البروتين و التي تمنح الصلابة والقوة للكيوتكل (Vincent & Wegst ,2004) .

1-3- 2 الكايتين (Chitin) :

يعد الكايتين ثاني أهم سكر متعدد طبيعي إنتشاراً على سطح الكرة الأرضية بعد السليلوز (Sudhakar & Nagaragan ,2010).

يتكون من وحدات متماثلة من سكر N-اسيتل كلوكوز أمين (N-acetylglucosamine (GlcNAc, مرتبطة مع بعضها بروابط كلايكوسيدية من نوع β (1-4) والتي تجعل سلسلة الكايتين مستقيمة تشبه الشريط (Vincent & Wegst ,2004) وبذلك فأن التركيب الكيميائي للكايتين يشابه التركيب الكيميائي للسليلوز مع استبدال إحدى مجاميع الهيدروكسيل في ذرة الكاربون الثانية للسليلوز بمجموعة acetamide ($-NHCOCH_3$) (Dutta *et al.* ,2004) .

وقد ذكر Zhao *et al.* (2010) أن الكايتين يحتوي على نيتروجين بنسبة 7 % ونسبة نيتروجين / كاربون مقدارها 0.146 بدرجة أستلة (Acetylation) مقدارها 0.9 % . وقد يتواجد الكايتين بشكل كايتوزان عندما تزال منه مجاميع الاسيتل بعملية(Deacetylation) بفعل إنزيم Chitin deacetylase وبذلك يصبح الكايتوزان بوليمر غير متجانس من GlcNAc مع ثمالات D-glucosamine (Hartl *et al.* ,2012) . يوجد الكايتين في الطبيعة بصور بلورية مختلفة (Stawski *et al.* ,2008 ; Dahiya *et al.* ,2006) تشمل :

α-chitin : وهو الأكثر شيوعاً وثبوتيةً ويتواجد في كيوتكل الحشرات والسرطان (Crabs) والروبيان (Shrimps) ويتكون من سلاسل غير متوازية .

β-chitin : وهو نادر تقريباً ويتكون من سلاسل متوازية مرتبطة بأواصر هيدروجينية يتواجد في الهياكل الخارجية للدايتومات (Diatomes) .

γ-chitin : ويتكون من اتحاد سلاسل غير متوازية (α-chitin) مع سلاسل متوازية (β-chitin) .

يشكل الكايتين نسبة 20 % من الهيكل الخارجي للحشرة (الكيوتكل) (Bhagya *et al.* ,2010) بالإضافة إلى وجوده في كيوتكل مفصلية الأرجل وجدران الخلايا لمعظم الفطريات والهيكل الخارجي للقشريات ، كذلك يوجد في بعض التراكيب الداخلية للافقريات (Dutta *et al.* ,2004 ; Stawski *et al.* ,2008) .

1-4 الإنزيمات المحللة لكيوتكل الحشرة :

تبدي الفطريات الممرضة للحشرات(EPF) أساليب ضراوة مختلفة تجاه مضائفها من أهمها إنتاج الإنزيمات الخارج خلوية (Extracellular enzymes) المحللة للكيوتكل (Dias *et al.* ,2008) وتعد هذه الإنزيمات عاملاً مهماً في الأصابة الفطرية وتبدأ من وقت إنبات الكونيديا (Conidial germination) على غلاف الحشرة (Insect integument) وحتى إختراق الفطر لكيوتكل المضيف (Zhang *et al.* ,2008) . وقد أشارت معظم الدراسات إلى أن

هناك علاقة بين إفراز الإنزيمات الخارج خلوية من الفطر والإمراضية (Pathogenecity) (Mustafa & Kaur ,2010) .

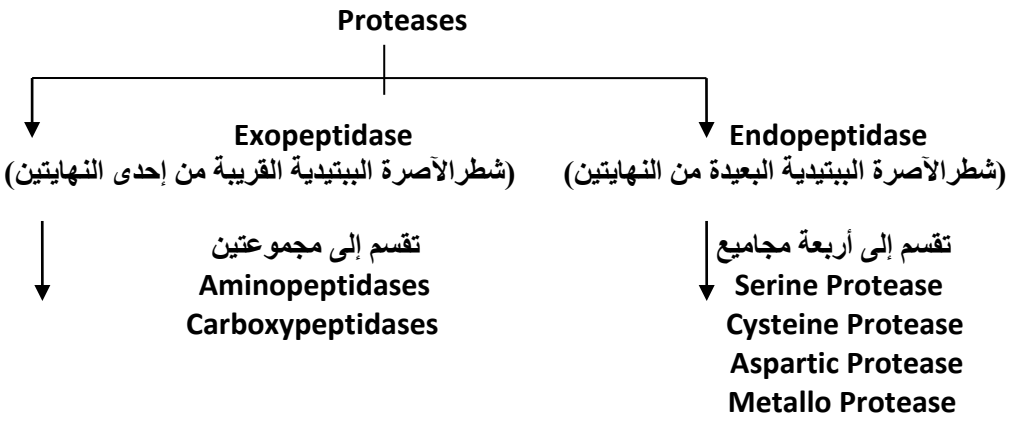
وقد أثبت Gupta *et al.* (1992) فعالية ستة إنزيمات في تحليل كيوتكل الحشرات ثلاثة منها تعود إلى مجموعة الإنزيمات المحللة البروتين (Proteases) وهي (Trypsin وChymotrypsin وElastase) إضافة إلى إنزيمات Endochitinase و N-acetylglucosaminidase و Esterase . وإن أهمية أي واحد من هذه الإنزيمات يعتمد على خصائص الكيوتكل والآلية التي يعتمدها الفطر لإصابة الحشرة العائل (Ali *et al.* ,2010 b) .

وينتج من إختلاف السلالات التابعة للفطر*Beauveria* إختلافاً في إنتاج الإنزيمات المحللة للكيوتكل وكمياتها (Gupta *et al.* ,1992) .

1-4-1 إنزيم البروتييز (Protease) :

يعد إنزيم البروتييز (EC 3.4.21-24) والذي يعرف أيضاً بال Proteinase أو Proteolytic enzymes من إنزيمات التحلل المائي (Hydrolases) التي تعمل على تحليل الأواصر الببتيدية في جزيئة البروتين عن طريق إدخال جزيئات ماء محرراً أحماض أمينية حرة و ببتيدات قصيرة (Devi *et al.* ,2011; ; Ahmed *et al.* ,2011 ; Akcan ,2012) (Krishna *et al.* ,2009; Guangrong *et al.* ,2006 .

يتم تصنيف الإنزيمات المحللة للبروتين على أساس موقع عملها على البروتين بعيداً عن النهايات الطرفية (الأمينية والكاربوكسيلية) بحسب ماهو موضح في المخطط (1) .



مخطط (1) : تصنيف إنزيمات البروتييز على أساس موقع عملها على البروتين بعيداً عن النهايات الطرفية (Verma *et al.* ,2011) .

ويتم تصنيفها أيضاً إستناداً إلى موقع الآصرة التي يعمل عليها الإنزيم (Rao *et al.* ,1998) :

Aminopeptidase : يعمل على النهاية الأمينية (N) من سلسلة متعدد الببتيد ويحرر ثمالات أحماض أمينية مفردة وببتيدات ثنائية (dipeptides) أو ببتيدات ثلاثية (tripeptides) .

Carboxypeptidase : يعمل على النهاية الكاربوكسيلية (C) من سلسلة متعدد الببتيد ويحرر أحماض أمينية مفردة أو ببتيدات ثنائية (dipeptides) .

كما وتصنف هذه الإنزيمات إعتماداً على آلية عملها إلى :

- Serine Protease : يتميز بوجود الحامض الأميني Serine في الموقع الفعال وتنتشر في البكتريا والفطريات والفيروسات وتتواجد ضمن مجموعة Endopeptidase .
- Aspartic Protease : يعرف بأنه بروتييز حامضي نظراً لأنه يبدي أقصى فعالية إنزيمية عند رقم هيدروجيني من (3-4) ويتميز بوجود الحامض الأميني Aspartic acid في موقعه الفعال .

- **Cysteine Protease : يتطلب عمل هذا النوع من البروتييز وجود الحامض الأميني Cysteine و Histidine في الموقع الفعال .**
- **Metallo Protease : يتطلب عمل هذه الإنزيمات وجود أيون معدني ثنائي التكافؤ وتتضمن إنزيمات من مصادر متنوعة مثل إنزيمات الكولاجينيز(Collagenases) من الكائنات الراقية .**
- **Glutamic acid Protease : مجموعة متقاربة من الإنزيمات المحللة للبروتين تتواجد بصورة رئيسة في الفطريات ، تتميز بإستخدامها لزوج من الأحماض الأمينية في العملية الحفزية هما Glu / Gln (Yike ,2011).**
- **Threonine Protease : لم يتم وصفها حتى عام 1995 ، وإن المجموعة المدروسة منها هي التي تمثل مكونات نظام Proteasome (Yike ,2011) .**

كذلك تم تصنيف البروتييز على أساس مدى الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعاليته إلى حامضي (acid) و متعادل (neutral) و قاعدي (alkaline) (Murthy & Nadiu ,2010) .

2-4-1 إنزيم الكايتينيز (Chitinase) :

يعد إنزيم الكايتينيز من إنزيمات التحلل المائي حيث يعمل على تحليل الآصرة الكلايكوسيدية (β 1-4) التي تربط وحدات الكايتين (Hartl *et al.* ,2012) .

وبالإعتماد على آلية عمل الإنزيم أمكن تقسيمه إلى نوعين (Dahiya *et al.* ,2006) :

- **Endochitinase (EC 3.2.1.14) : يعمل هذا الإنزيم على شطر الأواصر الكلايكوسيدية في بوليمر الكايتين بصورة عشوائية و في مواقع داخلية ليحرر وحدات متعددة من سكر GlcNAc واطئة الوزن الجزيئي مثل chitotriose و chitotetroase مع وحدات من السكر الثنائي diacetylchitobiose والتي تعد الناتج النهائي الأساسي .**
- **Exochitinase : الذي بدوره يقسم إلى مجموعتين هما :**

1- β-chitobiosidases (EC 3.2.1.29) chitin 1,4 أو chitobiosidases : تحفز هذه الإنزيمات الإزالة المتكررة لسكر diacetylchitobiose من النهاية غير المختزلة لسلاسل الكايتين منتجةً سكرdiacetylchitobiose بشكل منفرد دون ظهور أي من السكريات الأحادية أو قليلة الوحدات .

2- Chitobiases (EC 3.2.1.30) أو β-(1,4)-N-acetylglucosaminidases: تقوم بشطر سكر diacetylchitobiose وبوليمرات الكايتين العالية (higher chitin polymer) التي تتضمن chitotriose و chitotetroase إلى وحدات GlcNAc .

5-1 تأثير الظروف البيئية والمزرعية في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز :

تتأثر العمليات الأيضية للأحياء المجهرية بالعديد من العوامل مثل الرقم الهيدروجيني للوسط و درجة الحرارة و مصدر الكاربون وتركيزه ومصدر النيتروجين العضوي و اللاعضوي ..الخ وتختلف هذه الظروف من كائن مجهري لآخر، لذا أصبح من الضروري معرفة الظروف البيئية المثلى لنمو الكائنات الحية المجهرية للحصول على أقصى إنتاج (Kuberan *et al.* ,2010).

1- تأثير مدة الحضن :

إن لمدة الحضن دوراً مهماً في إنتاج المواد الأيضية المايكروبية وخصوصاً الإنزيمات وتختلف مدة الحضن المثلى للإنتاجية القصوى من الإنزيمات الخارج خلوية بإختلاف نوع الوسط الزرعي (Reddy *et al.* ,2011; Qadar *et al.* ,2009 ; Ito *et al.* ,2007) .

أظهرت عزلات الفطر *B. bassiana* تفاوتاً في إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز بإختلاف مدة الحضن ، فقد أظهرت إحدى الدراسات أن أعلى فعالية للبروتييز كانت باليوم الثامن لكل عزلات الفطر *B. bassiana* المستخدمة في تلك الدراسة بينما كانت أعلى فعالية للكايتينيز باليوم الرابع من حضن الوسط الزرعي (Mustafa & Kaur ,2010) ويعود تكوين الأنزيم في مراحل النمو المختلفة إلى الإختلاف في الطبيعة الكيميائية للإنزيم (Ire *et al.* ,2011) .

وأشار Agrawal *et al.* (2005) إلى أن إنتاج إنزيم البروتييز القاعدي من الفطر *Beauveria felina* وصل أعلى مستوى له بعد سبعة أيام من تنمية الفطر في وسط يحوي نخالة الحنطة . وكانت مدة حضن 15 يوماً كافية

لأقصى إنتاج من البروتييز من الفطر *Malbranchea gypsea* (Singh ,1999) . وبإستخدام تخمرات الحالة الصلبة بلغ أعلى إنتاج للبروتييز من الفطر *Paecilomyces marquandii* بعد خمسة أيام من الحضن وبإستخدام نخالة الحنطة كمادة ساندة (Soares *et al.* ,2010) .

وذكر(2010) Ghanem *et al.* وحيدر، (2011) أن أعلى إنتاج لإنزيم الكايتينيز كان في بداية الطور اللوغارتمي للنمو أي بعد 96 ساعة من حضن الفطر*Aspergillus terreus* والفطر *T. fertile* ، على التوالي . في حين لوحظت أعلى فعالية لإنزيم الكايتينيز بعد (18-20) يوم من حضن الفطرين *Verticillium chlamydosporium* و *V. Suchlasporium* (Tikhonov *et al.* ,2002) .

2- تأثير سرعة الرج :

لنجاح عملية التخمر الهوائي من الضروري تجهيز الكائنات الحية المجهرية بالأوكسجين الكافي لكونه عاملاً محدداً للنمو وتخليق الإنزيم فضلاً عن أنه يعمل مستلماً نهائياً للألكترون في التفاعلات التأكسدية لتجهيز الطاقة للنشاطات الخلوية . وقد وجد أن تغير سرعة الرج يؤثر في درجة المزج في الدوارق المهتزة ، فضلاً عن تأثيره في توزيع المواد الغذائية في الوسط (VijayAnand *et al.* ,2010 ; Kumar &Takagi ,1999)

وتختلف سرع الرج المستخدمة بإختلاف الأحياء المجهرية ، فقد أستخدمت سرعة الرج 200 دورة / دقيقة لإنتاج إنزيمات البروتييز(التربسين والكيموتربسين) إضافة إلى الكايتينيز الداخلي (Endochitinase) من الفطر *B. bassiana* (Gupta *et al.* ,1992) وإنتاج الكايتينيز من الفطر *T. flavus* (Duo-Chuan *et al.* ,2005) . بينما أستخدمت سرعة رج 120 دورة / دقيقة لإنتاج البروتييز من سلالات الفطر *Mucor* (Alves *et al.* ,2005) وإنتاج الكايتينيز من الفطر *Trichoderma virens* UKM1 (Abd-Aziz *et al.* ,2008) . وأستخدم (2011) Cuervo-Parra *et al.* الحاضنة الهزازة بسرعة رج مقدارها 250 دورة / دقيقة لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *T. harzianum* VSL297 .

وأشار Thiagarajan *et al.* (2011) إلى أن سرعة الرج التي تعطي أعلى حصيلة إنزيمية للكايتينيز من البكتريا *Streptomyces sp.* PTK19 بلغت 300 دورة / دقيقة .

3- تأثير المصدر الكاربوني :

يزود الوسط الزرعي المستخدم لإنتاج الإنزيمات بمصدر للطاقة و الكاربون ومواد محفزة للإنتاج ، وتؤكد معظم الدراسات أن المصدر الكاربوني يحفز النمو ويتباين تأثيره على إنتاج الأنزيمات فقد يكون محفزاً (Inducer) أو كابحاً (Repressor) للأنتاج (Muthulakshmi *et al.* ,2011 ; Wang *et al.* , 2005 ; Haq *et al.* ,2008) .

وقد أستخدمت مصادر كاربونية مختلفة لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من أحياء مجهرية مختلفة ، فكان الوسط الحاوي على الكازائين بتركيز 1 % قد حفز إنتاج إنزيم البروتييز (Pr1) و(Pr2) من الفطر *B.bassiana* (Dhar & Kaur,2010 a) . وتعد الكاربوهيدرات المصدر الرئيسي لتحرير الطاقة التي تحتاجها الأحياء المجهرية للنمو(Haq *et al.* ,2008) ، فكان الكلوكوز بتركيز 1% المصدر الكاربوني الأفضل لإنتاج البروتييز من الفطر *Mucor mucedo* DSM 809 (Yegin *et al.* ,2010) وبتركيز 0.9% لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Alternaria alternata* (Ghanem *et al.* ,2011) .

و لوحظت أعلى فعالية لأنزيم البروتييز (Pr1) و(Pr2) من الفطر *M. anisopliae* بوجود 1 % من كل من الكلوكوز وكيوتكل العث (Diamand moth cuticle) كمصدر كاربوني (Ali *et al.* ,2011) . وكان الجدار الخلوي للفطر *Moniliophthora roreri* المصدر الكاربوني الأفضل لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *Trichoderma harzianum* VSL291 بعد 24 ساعة من الحضن (Cuervo-Parra *et al.* ,2011) .

وحصل Duo-Chuan *et al.* (2005) على إنتاج عالي من إنزيم الكايتينيز باستخدام الكايتين الغروي والسكروز كمصدر كاربون في وسط نمو الفطر *Talaromyces flavus* . بينما أستخدمت خميرة الخبز وبتركيز 1.5% كمصدر كاربون وحيد لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. fertile* (حيدر، 2011) . كما لوحظت أعلى فعالية للكايتينيز في الوسط الحاوي على الكايتين الغروي كمصدر كاربوني وحيد في الوسط الإنتاجي للفطر *B. bassiana* (Dhar & Kaur,2010 b) والفطر *Trichoderma virens UKM1* (Abd-Aziz *et al.* ,2008) .

4- تأثير المصدر النيتروجيني :

إن ضرورة توفر المصدر النيتروجيني لمعظم الأحياء المجهرية يكمن في أهمية النيتروجين في بناء الحوامض الأمينية وبالتالي بناء البروتين إضافة إلى الحوامض النووية ومكونات جدران الخلايا. إن إنتاج الإنزيمات وخصوصاً إنزيم البروتييز القاعدي يعتمد على توفر المصادر الكاربونية والنيتروجينية حيث تبلغ نسبة النيتروجين في تركيب

البروتييز مايقارب 15.6% ، وعلى الرغم من أن المصادر النيتروجينية المعقدة عادة ماتستخدم لإنتاج البروتييز القاعدي إلا أن الحاجة إلى مصادر نيتروجينية خاصة تختلف من كائن مجهري لآخر (Kumar & Takagi ,1999) .

أستخدمت المصادر النيتروجينية العضوية في العديد من الدراسات وكان لها دوراً مهماً في تحفيز النمو وإنتاج الإنزيم ، فقد أوضح Bidochka & Khachatourians (1988) أن الفطر *B.bassiana* GK2016 ينتج البروتييز السيريني الخارج خلوي عند تنميته في الوسط السائل الحاوي على الجيلاتين كمصدر نيتروجين . ولوحظ تفوق الكازائين على الكلوكوز في تحفيز إنتاج البروتييز و نمو الفطر *M. anisopliae* (Braga *et al.* ,1999) . وكانت بيكاربونات الأمونيوم (NH_4HCO_3) من بين ثمانية مصادر نيتروجينية لاعضوية هي الأفضل لإنتاج البروتييز المتعادل من الفطر *Rhizopus microsporum* NRRL3671 و باستخدام سحالة الرز(Rice bran) كمادة ساندة (Sumantha *et al.* ,2006 b) .

ويزداد إنتاج الكايتينيز من الفطر *T. harzianum* عند إستخدام مستخلص الخميرة (yeast extract) بتركيز 2 % وبإستخدام تخمرات الحالة الصلبة (Nampoothiri *et al.* ,2004) .

وأختبر Thiagarajan *et al.* (2011) تأثير خمسة مصادر نيتروجينية عضوية في إنتاج الكايتينيز من البكتريا *Streptomyces* sp. PTK19 وأتضح أن الببتون بتركيز 0.1% هو المصدر النيتروجيني الأفضل لإنتاج الإنزيم .

5- تأثير درجة الحرارة :

تعد درجة حرارة الحضن من العوامل الحرجة المهمة التي تؤثر في معظم النشاطات الأيضية للأحياء المجهرية خصوصاً النشاطات الإنزيمية في الخلية (RaviKumar *et al*. ,2012 ; Kuddus & Ramteke ,2011) .

قد تختلف درجة الحرارة المثلى لنمو الكائن المجهري عن الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج الإنزيم إذ تكون أحياناً درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيم أوطأ من الدرجة الحرارية المثلى لنمو الكائن المجهري المنتج له ، فمثلاً تنمو البكتريا *Serratia marcescens* بشكل جيد بدرجة حرارة 37 مْ بينما بلغ أقصى إنتاج لإنزيم البروتييز عند درجة حرارة 30 مْ (Ustariz *et al*. ,2008) .

و في دراسة لإنتاج الإنزيمات المحللة للكيوتكل من الفطر *B. bassiana* حضنت الأوساط الزرعية بدرجة حرارة 26 مْ لمدة 96 ساعة (Gupta *et al*. ,1992) . و في دراسة أخرى ، وجد Ali *et al*. (2011) إن الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج إنزيمات البروتييز من الفطر *M. anisopliae* بلغت 35 مْ . وبلغت درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من البكتريا *S. marcescens* sp.7 وبإستخدام التخمرات الصلبة 40 مْ(Joseph & Palaniyandi ,2011).

بينما حضن الوسط الزرعي لإنتاج إنزيمات البروتييز والكايتينيز من الفطر*Trichoderma* sp. بدرجة حرارة 28 مْ (DeMarco *et al*. ,2003) . كذلك كانت تلك الدرجة هي المثلى لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطريات RD101 *B. felina* و *M. anisopliae* (Kang *et al*. ,1999; Patidar *et al*. ,2005) ، على التوالي .

6- تأثير الأملاح المعدنية :

تحتاج الأحياء المجهرية إلى كميات قليلة من الأملاح المعدنية لنموها ولإنتاج الإنزيمات إذ يمكن إضافة هذه الأملاح للأوساط الزرعية على شكل أيونات موجبة لأملاح غير عضوية مثل Ca^{+2} و Fe^{+2} وCo^{+2} وCu^{+2} وMg^{+2} وMn^{+2} وBa^{+2} ...إلخ . وتختلف الحاجة إلى هذه المعادن بإختلاف مصدر الإنزيم ، وإن أهمية هذه المعادن في الفعاليات الايضية يرجع إلى دورها الرئيس في تحفيز إنتاج الإنزيمات ، و دورها في زيادة ثباتية بعض الإنزيمات مثل البروتييز ، فضلاً عن دورها كمحاليل منظمة تعمل على المحافظة على الرقم الهيدروجيني للوسط (Tambekar & Tambekar ,2011 ; Sevinc & Demirkan ,2011; Kumar & Takagi ,1999) .

قام Gupta *et al*. (1994) بإستخلاص الإنزيمات (الكيموتربسين والكايتينيز الداخلي) من الفطر *B. bassiana* بأستخدام الوسط الحاوي على أملاح كبريتات المغنيسيوم 0.06 % وكلوريد الصوديوم 0.05 % و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 1.5 % و0.001 % من كل من كبريتات الحديد المائية و كبريتات الخارصين .

وكانت كبريتات المغنيسيوم و كلوريد الكالسيوم وكلوريد الصوديوم و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية وبالتراكيز(0.1 و 2 و 0.5 و 2 و 4) غم /لتر ، على التوالي من مكونات الوسط الإنتاجي لإنزيم البروتييز من الفطر*T. reesei* (Zambara ,2010) .

بينما إستخدم Sumantha *et al.* (2006 b) نترات الأمونيوم 0.5 % وفوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية 0.2 % و(كلوريد الصوديوم وكبريتات المغنيسيوم) 0.1 % في الوسط الإنتاجي لإنزيم البروتييز من الفطر *Rhizopus microsporus* NRRL 3671 .

وتمكن (2010) Ghanem *et al.* من إنتاج الكايتينيز من الفطر *Aspergillus terreus* بأستخدام كبريتات (المغنيسيوم والحديد والمنغنيز والخارصين) المائية وكلوريد الكوبلت وبالتراكيز (0.3 و 5 و1.6 و 1.4 و2) غم /لتر ، على التوالي . وقد أحتوى الوسط الزرعي لإنتاج الكايتينيز من الفطر *Verticillium chlamydosporium* والفطر *V. suchlasporium* على كلوريد الصوديوم وكبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات ثنائي البوتاسيوم بتركيز(0.03 %) (Tikhonov *et al*. ,2002) .

7- تأثير حجم اللقاح :

يعد حجم اللقاح أحد العوامل الحيوية المهمة التي تحدد إنتاج الكتلة الحيوية في التخمر، لذا فأن تحقيق التوازن بين إنتشار الكتلة الحيوية وتوفر المواد الغذائية والأوكسجين الذائب سوف يعطي إنتاجية عالية للإنزيم Abdul-Rauf *et al*. ,2010) .

أستخدمت حجوم لقاح مختلفة في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الأحياء المجهرية ، فقد أستخدم Gupta *et al.* (1994) حجم لقاح مقداره 2 × 10^7 سبور/ مل لإنتاج الإنزيمات المحللة للكيوتكل (الكيموتربسين والكايتينيز الداخلي) من الفطر *B. bassiana* . كما أستخدم حجم اللقاح ذاته لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *T. harzianum* (DeMarco & Felix ,2002) .

وكان حجم اللقاح 10 % هوالأفضل لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Rhizopus oligosporus* والبكتريا *Cellulosimicrobium cellulans* (Ferracini-Santos *et al.* ,2009; Irfan *et al.* ,2011) ، على التوالي .

وتمكن Patidar *et al.* (2005) من إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *B. felina* RD101 بأستخدام حجم لقاح مقداره 1 × 10^{10} كونيديا / غم نخالة حنطة .

وفي دراسة أخرى أستخدم Kang *et al.* (1999) لإنتاج لإنزيم الكايتينيز من الفطر *M. anisopliae* حجم لقاح مقداره 1 × 10^8 كونيديا / مل .

8- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي :

إن للرقم الهيدروجيني للوسط تأثيراً في نمو الأحياء المجهرية وقابليتها على إنتاج إنزيمات البروتييز وذلك بسبب تأثيره التنظيمي على التعبير الجيني ، إذ يساعد التحكم بالرقم الهيدروجيني للوسط في تنظيم التعبير الجيني لجينات عدة مما يساعد في الحصول على معدل عالي لإنتاج البروتين (Wang *et al.* ,2005) .

إستخدم Dhar & Kaur (2010b) أوساط زرعية مختلفة برقم هيدروجيني 5.6 لإنتاج إنزيم البروتييز من عزلات الفطر *B. bassiana* . وذكر Abdul-Rauf *et al*. (2010) أن أعلى إنتاج لإنزيم البروتييز من الفطر *Rhizopus oligosporus* تحقق بإستخدام وسط برقم هيدروجيني 3 .

بينما كان الرقم الهيدروجيني الأبتدائي 5 هو الأفضل لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *B. felina* RD101 (Patidar *et al.* ,2005) . و بأستخدام وسط الإنتاج برقم هيدروجيني 4 حصل Liu *et al.* (2003) وحيدر (2011) على أعلى فعالية لإنزيم الكايتينيز من الفطرFO91 *Verticillium lecanii* والفطر *T. fertile* ، على التوالي . و في دراسة أخرى عُدِّل الرقم الهيدروجيني لوسط النمو و إنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Alcaligenes faecalis* إلى 8 (Annamalai *et al.* ,2011) .

6-1 تنقية إنزيم البروتييز :

إن تنقية الإنزيمات هي سلسلة متتابعة من الطرائق الغرض منها فصل بروتين الإنزيم عن بقية بروتينات المستخلص الإنزيمي الخام بهدف الحصول على حصيلة عالية (High recovery) وناتج عالي النقاوة (Highly purified end product) ، فضلاً عن تحقيق الإنتاجية التكرارية (Reproducibility) . وتعتمد طرائق الفصل إما على الحجم متمثلة بطرائق الطرد المركزي الفائق (Ultracentrifugation) والفرز الغشائي (Dialysis) والترشيح الهلامي (Gel permeation chromatography) أو إنها تعتمد على الشحنة كما في التبادل الأيوني (Ion exchange chromatography) ، أو الألفة (Affinity chromatography) ، وهناك طرائق أخرى للفصل كالترسيب بالأملاح و المذيبات العضوية مثل كبريتات الأمونيوم والأسيتون والإيثانول (Ali *et al*. ,2010b ; Sumantha *et al*. ,2006 a ; Holme & Peck ,1998) .

لقد قام العديد من الباحثين بتنقية إنزيمات البروتييز من الأحياء المجهرية المنتجة لها بإستخدام طرائق مختلفة . فقد قام Shimizu *et al*. (1992) بتنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Beauveria bassiana* F18 بعدة خطوات متعاقبة

هي الترسيب بكبريتات الأمونيوم والتبادل الأيوني خلال عمود CM-Toyopearl والترشيح الهلامي خلال عمود Sephacryl S-100 وتم الحصول على عدد مرات تنقية مقدارها 87.1 مرة بحصيلة إنزيمية 20.5 % .

وتمكن كل من Bidochka & Khachatourians (1987) من تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *B. bassiana* GK2016 بواسطة الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة تشبع (60-75)% والتجزئة بالترشيح الهلامي مرتين بإستخدام عمود الفصل Bio-Gel P-60 والعمود Bio-Gel P-10 وأسفرت عملية التنقية عن الحصول على عدد مرات تنقية 17.8 مرة وبحصيلة مقدارها 20.9 % .

وفي دراسة عن إنزيم البروتييز المنتج من البكتريا *Streptomyces avermectinus* أستخدمت طرائق مختلفة للترسيب في تنقية الإنزيم جزئياً وإتضح أن الأسيتون 50 % هو ألأفضل من بينها لإعطائه عدد مرات تنقية 4.10 مرة بحصيلة إنزيمية 21.02 % (Ahmed *et al.* ,2008) .

ونقي إنزيم البروتييز الحامضي من الفطر *Mucor pusillus* بسلسلة من الخطوات المتعاقبة أولها الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 85 % والترسيب بالكحول الأثيلي ثم التجزئة خلال عمود الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G-75 و أخيراً كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE- Sephadex A-50 و تم الحصول من خطوة التنقية الأخيرة على حصيلة إنزيمية مقدارها 55 % (Somkuti & Babel ,1968) .

وأجرى Suarez *et al.* (2004) خطوات متسلسلة لفصل إنزيم البروتييز (Trypsin like-protease) من الفطر *T.harzianum* CECT 2413 وذلك بثلاث خطوات تنقية شملت الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 90 % ثم Acidic chromatofocusing وأخيراً الترشيح الهلامي ومنها تم الحصول على عدد مرات تنقية مقدارها 12.2 مرة بحصيلة إنزيمية 12 % .

وقام Demarco & Felix (2002) بتنقية إنزيم البروتييز من الفطر *T. harzianum* بخطوتين ، الأولى الترسيب بكبريتات الامونيوم بنسبة إشباع 60 % والثانية بإستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي خلال عمود الفصل Phenyl - Sepharose حيث بلغت الحصيلة الإنزيمية 27 % وعدد مرات التنقية 4.06 مرة .

وأوضح Yang *et al.* (2008) أن تنقية إنزيم البروتييز السيريني من الفطر *Monacrosporium cystosporium* تمت بالترشيح الهلامي خلال عمود الفصل Hi Load 16/60 Superdex ثم التنقية بكروماتوغرافيا التبادل الأيوني خلال عمود الفصل Resource Q أعقبتها كروماتوغرافيا التآثر الهيدروفوبي (Hydrophobic interaction) خلال عمود الفصلHi Prep 16/10 Phenyl FF وبلغت عدد مرات التنقية 13.6 مرة بحصيلة إنزيمية مقدارها 2.5 % .

7-1 توصيف إنزيم البروتييز :

1- تعيين قيم ثابت ميكالس (K_m) و السرعة القصوى (V_{max}) :

إن دراسة الثوابت الحركية مهمة بالنسبة للتفاعلات الإنزيمية ، فقيمة السرعة القصوى (V_{max}) ترتبط بكمية الإنزيم المستخدمة ، أما قيمة ثابت ميكالس (K_m) فهي خاصة بالإنزيم وقياس ألفته تجاه مادة التفاعل.

فالإنزيمات التي تمتلك قيمة K_m عالية (أي الألفة نحو المادة قليلة) تبدي نشاطاً أقل من تلك التي تمتلك قيمة K_m واطئة . فضلاً عن ذلك ، فأن تركيز مادة التفاعل المطلوبة لتقدير فعالية إنزيم ما تكون مرتبطة بثابت ميكالس لذا من الضروري تحديد قيمة هذا الثابت (Holme & Peck ,1998) .

ذكر Dienes *et al.* (2007) أن قيمة الثوابت الحركية K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *T. ressei* QM 9414 تساوي 0.3 ملي مولر و2.7 وحدة / دقيقة ، على التوالي وبإستخدام مادة التفاعل (BApNA (Benzoyl-Arginyl-p-NitroAmide, . أما إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر*R. microsporum* فقد بلغت قيم K_m و V_{max} له (2.6 و19.9) ملغم/ دقيقة ، على التوالي وبإستخدام الكازائين كمادة تفاعل (Sumantha *et al.* ,2006 b) .

وفي دراسة قام بها Yang *et al.* (2008) لتوصيف إنزيم البروتييز السيريني من الفطر *Monacrosporium cystosporium* بلغت قيمة K_m وبإستخدام الببتيد N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA كمادة تفاعل 1.67×10^{-4} مولر والـ V_{max} 0.6071 OD_{410} per 30s . وفي دراسة أخرى بلغت قيمة K_m 0.16 ملي مول و الـ V_{max} 0.60 مايكرومول(دقيقة.ملغم)$^{-1}$ لإنزيم البروتييز (Trypsin-like protease) المنقى من الفطر *Fusarium oxysporum* وبأستخدام BApNA كمادة تفاعل (Barata *et al.* ,2002) .

2- تخصص الإنزيم حيال مادة التفاعل :

من المعروف أن معظم الإنزيمات محفزات بروتينية متخصصة جداً ، وهذا التخصص لا ينطبق فقط على نوع التفاعل المحفز وإنما أيضاً على طبيعة مادة التفاعل (Koolman & Roehm ,2005) .

وتبدي البروتييزات القاعدية مدىً واسعاً من التخصص تجاه مواد التفاعل المختلفة سواءً كانت صناعية أو طبيعية (Nirmal *et al.* ,2011) . إن درجة التخصص التي تبديها الإنزيمات مع مواد التفاعل تكون متفاوتة ، حيث أن هناك إنزيمات تكون فعالة (متخصصة) مع مادة تفاعل واحدة أو عدد قليل (محدود) من مواد تفاعل معينة بينما هناك إنزيمات تتفاعل مع مدى واسع لمواد التفاعل (فليح ، 1987) .

أوضح Bidochka & Kachatourians (1987) أن إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana* GK2016 له القابلية على تحليل بروتينات الـ(الإيلاستين و الكازائين والجيلاتين) وبدرجة أقل مع البومين المصل البقري (Bovine Serum Albumin, BSA) والكولاجين .

وأشار(2008) Yang *et al.* إلى تخصصية إنزيم البروتييز المعزول من الفطر *Monacrosporium cystosporium* تجاه بروتينات مختلفة طبيعية إضافة إلى الببتيدات المتعددة ، حيث بلغت الفعالية النسبية حيال الكازائين والببتيد(N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) 100% بينما بلغت الفعالية النسبية حيال البومين المصل البقري والكولاجين والكولاجين الممسوخ وكيوتكل النيماتودا (81.8 و3.8 و23.5 و 8.1)% على التوالي . وكان لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Clonostachys rosea* القابلية على تحليل الكازائين والجيلاتين والـ Azocoll والببتيد Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA إضافة إلى كيوتكل النيماتودا (Zhao *et al.* ,2005) .

وفي دراسة لتوصيف إنزيم البروتييز المعدني القاعدي المفرز من البكتريا *Photorhabdus* sp. EK1 أوضحت(2009) Soroor *et al.* أن الإنزيم يبدي تخصصية 100% حيال الكازائين كما إنه فعال تجاه الألبومين والهيموغلوبين والفايبرين والكولاجين والجيلاتين ، إذ بلغت الفعالية النسبية (54.6 و74.3 و75 و37.1 و67.1) %، على التوالي . كما وجد Yang *et al.* (2007a) أن إنزيم البروتييز المنقى من الفطر*Dactylellina varietas* يستطيع تحليل مدىً واسعاً من مواد التفاعل إشتملت على الكازائين والبومين المصل البقري والجيلاتين وكيوتكل النيماتودا والكولاجين بفعالية نسبية (100 و32 و10 و20 و3)% ، على التوالي .

3- تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية الإنزيم :

لكون الإنزيمات جزيئات بروتينية لذا فهي تمتلك خصائص تجعلها حساسة لتغيرات الـ pH والذي يؤثر في عدة عوامل (Voet & Voet ,2010) ، ومنها :

1. إرتباط الإنزيم بمادة التفاعل .
2. النشاط الحفزي للإنزيم .
3. تأين مادة التفاعل .
4. تغير تركيب البروتين (خاصة عند قيم الـ pH المتطرفة) .

وبهذا فأن لكل إنزيم رقم هيدروجيني معين يدعى الرقم الهيدروجيني الأمثل والذي تكون عنده فعالية الإنزيم بدرجتها القصوى والذي يعتمد على القوة الأيونية ونوع المحلول المنظم ، كما يتأثر بدرجة الحرارة وتركيز كل من مادة التفاعل والمرافق الإنزيمي (Coenzyme) (Aehle ,2004).

في دراسة أجريت لمعرفة صفات إنزيم البروتييز المنقى من الفطر*B. bassiana* F18 وجد Shimizu *et al.* (1992) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم كان 9.5 .

وأشار كل من Namasivayam *et al.* (2010) و Yang *et al.* (2007 a) و DeMarco & felix (2002) إلى أن الفعالية المثلى لإنزيم البروتييز المنتج والمنقى من فطريات السيطرة الحيوية *B. bassiana* و *Dactylellina varietas* و *T. harzianum* ، على التوالي كانت عند الرقم الهيدروجيني 8 . وبلغت أقصى فعالية لإنزيم البروتييز المتعادل والمنقى جزئيا من الفطر *R. microsporus* عند الرقم الهيدروجيني 7 (Sumantha *et al.* 2006 b,) . وبلغت عند الرقم الهيدروجيني 6.5 أعلى فعالية لإنزيم البروتييز المنقى جزئيا من الفطريات *Talaromyces flavus* و*Trichoderma harzianum* (Haggag *et al.* ,2006) والفطر *Neurospora crassa* (Abirami *et al.* ,2011) .

4- تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيم :

تعد الإنزيمات حساسة جداً لتغيرات الرقم الهيدروجيني لكونه يؤثر على الحالة الأيونية لثمالات الأحماض الأمينية التي تدخل في تركيب الإنزيم فضلاً عن الحالة الأيونية لجزيئات مادة التفاعل وبالتالي سوف يؤثر في إرتباط مادة التفاعل بالإنزيم وبالتالي في سرعة التفاعل (Holme & Peck ,1998) .

ذكر Shankar *et al.* (2011) أن إنزيم البروتييز القاعدي المنقى من الفطر *Beauveria sp.* يكون ثابتاً تجاه رقم هيدروجيني يتراوح بين (3-11) . و في دراسة أخرى وجد Yang *et al.* (2008) أن إنزيم البروتييزالسيريني يحتفظ بفعالية عالية عند الرقم الهيدروجيني (7- 9) لمدة 30 دقيقة . أما إنزيم البروتييزالقاعدي المنقى جزئياً من

البكتريا *Nocardiopsis* sp. فكان ثابتاً بالظروف القاعدية وإحتفظ بأكثر من 75 % من فعاليته بعد حضنه لمدة 120 دقيقة عند رقم هيدروجيني يتراوح بين (8-10.5) (Moreira *et al.*, 2003) .

بينما كان إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Monascus purpureus* ثابتاً بمدى رقم هيدروجيني يتراوح بين (5 - 9) (Liang *et al.*, 2006) . وذكر Hattori *et al.* (2005) أن إنزيم البروتييز (Trypsin like-protease) المنتج من الفطر *Cordyceps militaris* كان ثابتاً عند رقم هيدروجيني يتراوح بين (8.5-12) . وبينت نتائج دراسة Yang *et al.* (2007 a) أن ثباتية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Dactylellina varietas* تكون بمدى رقم هيدروجيني يتراوح بين (6-11) .

5- تأثير درجة الحرارة في ثبات الإنزيم :

إن لدرجة الحرارة دوراً مهماً في تنشيط أوعدم تنشيط الإنزيمات ، حيث إن لكل إنزيم درجة حرارة مثلى لأقصى فعالية له ، وتزداد الفعالية الإنزيمية كلما إزدادت درجة حرارة التفاعل (Abu Sayem *et al.*, 2006) ، لكن قد تصل إلى الدرجة الحرارية التي تسبب مسخ البروتين (الإنزيم) والذي لا يعتمد فقط على درجة الحرارة العالية وإنما على زمن التعرض لتلك الدرجة (Copeland, 2000 ; Bisswanger, 2008) .

عند دراسة الثبات الحراري لإنزيم البروتييز المحلل للكيوتكل والمنتج من الفطر *B. bassiana* F18 لوحظ أن هذا الإنزيم يكون ثابتاً لغاية درجة الحرارة 40 مْ بينما يفقد 80 % من فعاليته بعد حضنه 30 دقيقة بدرجة حرارة 50 مْ ، ويفقدها تماماً عند حضنه بدرجة حرارة 60 مْ لمدة 15 دقيقة (Shimizu *et al.*, 1992) .

وفي دراسة أخرى لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *Thermoascus auranticus* أوضح Merheb-Dini *et al.* (2009) أن الإنزيم كان ثابتاً حرارياً لغاية 65 مْ لمدة ساعة حيث أحتفظ بأكثر من 75 % من فعاليته . بينما أثبتت Soroor *et al.* (2009) أن إنزيم البروتييز المفرز من البكتريا *Photorhabdus* sp. يكون ثابتاً حرارياً لغاية درجة الحرارة 45 مْ ويفقد (45 و85) % من فعاليته بعد حضنه 30 دقيقة بدرجتي حرارة (50 و60) مْ ، على التوالي . في حين كان إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Dactylellina varietas* ثابتاً تحت درجة حرارة 40 مْ ويفقد نشاطه عند درجة 70 مْ لمدة 20 دقيقة (Yang *et al.*, 2007 a) .

6- تأثير بعض الأيونات والمواد الكيميائية في فعالية الإنزيم :

إن التفاعلات المحفزة بالإنزيمات تتطلب توفر مجاميع كيميائية إضافية لتحقيق تفاعل سريع وهذا لا يمكن أن يتحقق بوجود الإنزيم لوحده وإنما يتطلب إضافة مجاميع غير بروتينية ترتبط بشكل مباشر بالموقع الفعال أو مع المرافق الإنزيمي (Coenzyme) (وغالباً ما ترتبط بروابط غير تساهمية كالأواصر الهيدروجينية والتفاعلات الهايدروفوبية) أو قد يكون جزءاً من الإنزيم وفي هذه الحالة يرتبط بشكل تساهمي إلى متعدد الببتيد في الإنزيم حيث يعمل كمثبت لتركيب الإنزيم (Copeland, 2000 ; Aehle, 2004) .

ومن الضروري دراسة مثبطات الإنزيمات المحللة للبروتين لكونها تعطي الفهم الدقيق عن طبيعة الإنزيم ومتطلباته للعوامل المساعدة (Co-factors) وطبيعة الموقع الفعال (Usharani & Muthuraj, 2010) .

وجد Namasivayam *et al.* (2010) أن إنزيم البروتييز المنتج والمنقى من الفطر *B. bassiana* يثبط بالكامل بوجود كبريتات المنغنيز وبالتراكيز (1 و2 و3 و4 و5) ملي مولر وعند التركيزين (4 و5) ملي مولر من كلوريد الكالسيوم بينما إتضح أن وجود الـ EDTA وبكل التراكيزالمستخدمة لم يكن له تأثير ملحوظ في فعالية الإنزيم .

وفي دراسة لتأثير بعض المركبات والأيونات الفلزية إضافة إلى بعض المثبطات في فعالية البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana* GK2016 وجد Bidochka & Kachatourians (1987) أن لمادة الـ Dithiothreitol (DTT) تأثيراً حاثاً للإنزيم بنسبة 17 % عند التركيز 10 ملي مولر، بينما لم يكن لمركبات الـ Mercaptoethanol والـ EDTA و الـ Iodoacetamide و الـ Cysteine hydrochloride أي تأثير يذكر في الفعالية الإنزيمية ، في حين كان لمادة الـ(Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride, PMSF) تأثيراً تثبيطياً قوياً إذ بلغت الفعالية المتبقية 5.7 % .

وفي دراسة أخرى ذكرت Soroor *et al.* (2009) أن الـ EDTA كان مثبطاً قوياً على الإنزيم بنسبة 80% عند التركيز 20 ملي مولر مما يدل على إن الإنزيم المنقى من البكتريا *Photorhabdus* sp. EK1 يعود إلى عائلة البروتييز المعدني (Metalloproteases) بينما لم تؤثر مثبطات الأنواع الأخرى من البروتييز في الفعالية بشكل ملحوظ أما الأيونات المعدنية فقسم منها كان محفزاً قوياً للإنزيم كما في أيونات الكالسيوم (Ca^{+2}) بنسبة 83% وبدرجة أقل أيونات المغنيسيوم (Mg^{+2}) والباريوم (Ba^{+2}) والحديد (Fe^{+3}) بنسبة تحفيز (37 و33 و26)% ، على التوالي . في حين أبدى قسماً منها تثبيطاً قوياً كما في أيونات المنغنيز (Mn^{+2}) بنسبة تثبيط 90% وبدرجة أقل أيونات الكوبلت (Co^{+2}) والنيكل (Ni^{+2}) والزئبق (Hg^{+2}) بنسبة تثبيط (84 و48 و67)% ، على التوالي .

ووجد Sumantha *et al.* (2006 b) لدى دراسته تأثير بعض الأيونات الفلزية والمثبطات في نشاط إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *R.microsporum* NRRL3671 أن الإنزيم يثبط تماماً ويفقد فعاليته بالكامل بوجود 0.1 مول /لتر من الـ DTT وكبريتات الحديد ، أما كبريتات المنغنيز فقد كان لها تأثيراً تحفيزياً قوياً في الفعالية الإنزيمية وهذا يدل على أن الإنزيم هو بروتييز معدني يتطلب وجود أيون المنغنيز (Mn^{+2}) لنشاطه التحفيزي .

الفصل الثاني
المواد وطرائق العمل
Materials and

2 – المواد و طرائق العمل

2-1 المواد والأجهزة المستخدمة :

2-1-1 المواد الكيميائية المستخدمة والشركات المصنعة لها :

اسم المادة	الشركة المصنعة
الكلوكوز ($C_6H_{12}O_6$)	AFCO / India
خميرة الخبز (Baker's yeast)	Aldanamaya ,China
المركابتوايثانول وكاربونات الصوديوم (Na_2CO_3)	BDH
كبريتات المغنيسيوم المائية ($MgSO_4.7H_2O$) و كلوريد الامونيوم (NH_4Cl) وحامض البوريك (H_3BO_3) وكبريتات الامونيوم $(NH_4)_2SO_4$ و كلوريد الزئبق ($HgCl_2$) و كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) و كلوريد المنغنيز($MnCl_2$) والـEDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$) واليوريا (Urea)	CARLO ERBA
مادة بارانيتروفينول (pNP)	Fluka-UK
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH_2PO_4) والترس القاعدي (Tris-base) والـPMSF ($C_7H_7ClO_2S$)	Fluka-Switzerland
حامض الهيدروكلوريك (HCl)	GFS-chemicals-Germany
حامض الخليك الثلجي (CH_3COOH) و حامض الفسفوريك (H_3PO_4) و الايثانول المطلق (C_2H_5OH)	HAZARD-UK
أكار ديكستروز البطاطا(PDA) وألبومين المصل البقري(BSA) والبومين البيض (Ovalbumin) والببتون (Pepton) ومستخلص الخميرة (Yeast extract) والجيلاتين (Gelatin) وكلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$) والـ Iodoacetamide (C_2H_4INO) ومادة p -Nitrophenyl N-acetyl β-D-glucosaminide ($C_{14}H_{18}N_2O_8$)	HIMEDIA / India
المبادل DEAE-Cellulose	Pharmacia / Sweden
Trichloroacetic acid ($C_2HCl_3O_2$)	Sd fine-Chem limited / Mumbai
صبغة الكوماسي الزرقاء(Coomasie Brilliant Blue G-250)	SIGMA-ALDRICH
هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) و كلوريد الصوديوم (NaCl)	THOMAS BAKER
الكازائين	WINLAB-LIMITED-UK

2-1-2 الأجهزة المستخدمة و الشركات المصنعة لها :

اسم الجهاز	الشركة المصنعة
جهاز المطياف الضوئي ذو الأشعة المرئية وفوق البنفسجية (UV-Visible Spectrophotometer)	Chromtech- Taiwan
حاضنة (Incubator)	Fisher Scientific-Germany
جهاز تقطير (Distiller)	GFL-Germany
حمام مائي مبرد بالماء الدائر (Cooling Circulating Water Bath)	HAAKE -Germany
جهاز طرد مركزي [6000 دورة/دقيقة] (Centrifuge)	Hettich-Germany
جهاز طرد مركزي مبرد (Cooling Centrifuge)	Hettich-Germany
ماصات دقيقة (Micropipettes)	Human-Germany
مضخة تفريغ (Vacuum pump)	Japan
هود بايولوجي (Laminar flow cabinet)	Jeio-Tech-Korea
حمام مائي هزاز (Reciprocal Shaker Water Bath)	Julabo SW23-Germany
حاضنة هزازة (Shaker Incubator)	Labtech-Korea
جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة (Hot-Plate Magnetic Stirrer)	Labtech-Korea
ثلاجة (Refrigerator)	LG-Korea
شريحة العد المجهري (Haemocytometer)	Marienfeld-Germany
جهاز قياس الرقم الهيدروجيني (pH-meter)	Mauritius-Germany
مجهر ضوئي (Microscope)	Motic-Germany
ميزان حساس (Sensitive Balance)	Sartorius-Germany
حمام مائي (Water Bath)	Tafesa-Germany
جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer)	Tudor-Korea
موصدة (Autoclave)	YX-280B-China

2-2 طرائق العمل :

2-2-1 العزلة الفطرية المستخدمة في الدراسة :

تم الحصول على عزلة من الفطر *Beauveria bassiana* من جامعة بابل/ كلية العلوم للبنات، وأستخدمت هذه العزلة في إنتاج وتنقية وتوصيف إنزيم البروتييز. نشطت العزلة الفطرية على طبق بتري يحتوي على أگار ديكستروز البطاطا (PDA) بدرجة حرارة (28) مْ ولمدة (7-10) أيام.

2-2-2 تحضير اللقاح « البذرة » :

a) تم تحضير وسط اللقاح « البذرة ، Seed culture » حسب الطريقة الموصوفة من قبل Dhar & Kaur (2010) مع بعض التحوير وذلك بإذابة 2 غم كلوكوز و1 غم ببتون و 1 غم مستخلص الخميرة في كمية من الماء المقطر، وبعد إتمام الأذابة أكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر، وتم تعقيمه بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ لمدة 15دقيقة . لقح الوسط المحضر أعلاه بقرص واحد من عزلة الفطر *B.bassiana* [يحتوي القرص الواحد على 2 × 10 ^{7} سبور/ مل من الوسط ، إذ تم حساب عدد السبورات بأستخدام شريحة العد المجهري (Haemocytometer)] وحضن الوسط في الحاضنة الهزازة بسرعة رج 150 دورة/ دقيقة وعلى درجة حرارة 30 مْ لمدة 72 ساعة .

2-2-3 تحضير وسط الإنتاج :

أستخدم وسط الإنتاج الموصوف من قبل De La Cruz *et al.* (1995) والمحور من قبل حيدر، (2011) في التحري عن إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana* . إذ تم تحضير الوسط الأنتاجي على النحو الآتي :

أستخدمت خميرة الخبز (Baker's Yeast) بنسبة 1 % كمصدر كاربوني وحيد للوسط و أضيف إليها 0.1 % (وزن / حجم) من كل من كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية

الهيدروجين و بعد إتمام عملية الإذابة لهذه المواد عُدِّل الرقم الهيدروجيني إلى 6.5 أعقبه عملية غليان للوسط لمدة ثلاث دقائق و من ثم ترشيحه بواسطة أوراق ترشيح ، وزع بعدها الوسط في دوارق زجاجية سعة 250 مليلتر بواقع 50 مليلتر / دورق وعقم بجهاز المؤصدة على درجة حرارة 121 مْ لمدة 15 دقيقة ، وبعد إنتهاء عملية التعقيم أخرجت الدوارق و بردت إلى درجة حرارة الغرفة لتهيئتها لعملية التلقيح .

2-2-4 تلقيح وسط الإنتاج :

لقح وسط الإنتاج الموصوف سابقا باللقاح المتحصل عليه في الخطوة السابقة (البذرة) بنسبة مقدارها 2% من حجم الوسط (تم إستخدام هذه النسبة لغاية تجربة تحديد حجم اللقاح الأمثل للإنتاج حيث تم تغييرها بعد ذلك على وفق النتيجة المستحصلة من تلك التجربة) وتم الحضن بالحاضنة الهزازة بسرعة رج 150 دورة / دقيقة و بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 72 ساعة ، وبعد إنتهاء مدة الحضن تم ترشيح الوسط لفصل الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الفطرية الذي أستخدم في تقدير فعالية إنزيمي البروتييز والكايتينيز فضلاً عن تقدير البروتين لحساب الفعالية النوعية التي أعتمدت مقياساً لتحديد أفضل إنتاج من الإنزيمين في مراحل الدراسة كلها .

2-2-5 تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *Beauveria bassiana* :

تم دراسة عدد من العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B.bassiana* إشتملت هذه العوامل على مدة الحضن و سرعة الرج وتركيز المصدر الكاربوني و نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه ودرجة الحرارة و نوع الأملاح المعدنية وحجم اللقاح ونسبة مساحة السطح إلى حجم الوسط والرقم الهيدروجيني الإبتدائي لوسط الإنتاج .

1- تأثير مدة الحضن :

لقح وسط الإنتاج بنسبة لقاح 2% لكل دورق وتمت متابعة إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر قيد الدراسة لمدة 120 ساعة وذلك بسحب مكررين كل 24 ساعة لتقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين و قياس الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج حيث حضن الوسط في الحاضنة الهزازة بالظروف السابقة نفسها .

2- تأثير سرعة الرج :

حضن وسط إنتاج الإنزيمين الموصوف سابقاً و الملقح بالفطر *B.bassiana* لمدة 72 ساعة في حاضنة هزازة بأستخدام سرع رج مختلفة هي (50 و 100 و 150 و200) دورة / دقيقة .

3- تأثير تركيز المصدر الكاربوني :

استخدمت خميرة الخبز كمصدر كاربوني لوسط الإنتاج إذ أضيفت بتراكيز متدرجة (0.5 و 1 و 1.5 و 2)% إلى وسط إنتاج الإنزيمين لمدة 72 ساعة و بسرعة رج 150 دورة /دقيقة .

4- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه :

أ- نوع المصدر النيتروجيني :

لغرض دراسة تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز في الوسط الإنتاجي تم أختيار أربعة مصادر نيتروجينية هي (الجيلاتين و كلوريد الأمونيوم و كبريتات الأمونيوم واليوريا) حيث أضيفت الى الوسط الإنتاجي بنسبة 0.3 % وتركت إحدى المعاملات بدون إضافة مصدر نيتروجيني لغرض المقارنة ، وحضن الوسط الإنتاجي الحاوي على خميرة الخبز بتركيز 1.5 % تحت الظروف السابقة نفسها .

ب- تركيزالمصدر النيتروجيني :

أستخدمت تراكيز متدرجة من كبريتات الأمونيوم (0.1 و 0.3 و 0.5 و0.7 و1)% لغرض تحديد التركيز الأمثل للمصدر النيتروجيني المستخدم و تمت إذابتها في وسط الإنتاج الموصوف سابقاً .

5- تأثير درجة الحرارة :

درس تأثير درجة الحرارة بحضن وسط الإنتاج الملقح بالفطر *B.bassiana* على درجات حرارة (25و 30 و 35) مْ .

6- تأثير نوع الأملاح المعدنية وتركيزها :

درس تأثير كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (الموجودتين أصلاً في وسط الإنتاج) ، حيث حضر الوسط بوجود كبريتات المغنيسيوم المائية و بعدم وجودها و بوجود فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و بعدم وجودها إضافةً إلى المعاملة الحاوية على كلا الملحين و تركت إحدى المعاملات بدون إضافة أملاح معدنية لغرض المقارنة ، وحضن الوسط الإنتاجي الحاوي على خميرة الخبز 1.5 % لمدة 72 ساعة و بدرجة حرارة 30 مْ .

7- تأثير حجم اللقاح :

لقح وسط إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز بحجوم لقاح مقدارها (4 و 8 و 12 و 16 و20)% من لقاح الفطر *B. Bassiana* وذلك لتحديد حجم اللقاح الأمثل لإنتاج الإنزيمين .

8- تأثير نسبة مساحة سطح الوسط إلى حجمه :

لمعرفة تأثير نسبة مساحة سطح الوسط إلى حجمه في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B.bassiana* أستخدم الوسط الإنتاجي بحجوم مختلفة هي (25 و 50 و 75 و 100 و 125) مل/ دورق ، حيث أستخدمت الدوارق الزجاجية سعة 250 ملليتر ثم لقح الوسط بحجم لقاح مقداره 16% وحضن بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 72 ساعة وبسرعة رج 150 دورة / دقيقة .

9- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي :

عُدِّل الرقم الهيدروجيني لوسط إنتاج الإنزيمين إلى (6.0 و 6.5 و 7.0 و 7.5 و 8.0) باستخدام 0.2 مولر هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) و حامض الهيدروكلوريك (HCl) ولقح 50 مل من الوسط الإنتاجي بحجم لقاح مقداره 16% وحضن بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 72 ساعة و بسرعة رج 150 دورة / دقيقة .

2-2-6 تقدير فعالية إنزيم البروتييز :

تم تقدير فعالية إنزيم البروتييز من الفطر *B. bassiana* تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Sirisha *et al.* (2010) مع بعض التحوير .

وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتييز بأنها (كمية الإنزيم التي تسبب زيادة في الامتصاص مقدارها 0.001 على طول موجي 280 نانوميتر وتحت ظروف التقدير) .

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (0.5) مولاري هيدروكسيد الصوديوم

حضر بإذابة 0.2 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 10 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - محلول الكازائين الخزين

حضر بإذابة 2 غم من الكازائين في 90 مل من الماء المقطر مع التسخين إلى 90 مْ ثم أضيف 5 مل من محلول رقم 1 ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (3) - (1) مولاري منظم الترس (pH 8.5)

حضر بإذابة 12.11 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 8.5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (4) – محلول مادة التفاعل

حضر بمزج حجم واحد من محلول رقم 2 و حجمين من الماء المقطر و حجم واحد من محلول رقم 3 .

محلول رقم (5) – محلول Trichloroacetic acid (TCA) 10 %

حضر بتخفيف 10 مل من TCA في 90 مل من الماء المقطر .

وتم تقدير الفعالية الإنزيمية على درجة حرارة 37 مْ كما يأتي :

1- أضيف 0.2 مل من المستخلص الإنزيمي إلى 2 مل من محلول رقم 4 في أنابيب اختبار و أجري التفاعل لمدة 20 دقيقة .

2- أوقف التفاعل بإضافة 3 مل من محلول رقم 5 بعدها طردت الأنابيب مركزياً بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة .

3- عمل محلول صفري (Blank) بإضافة 3 مل من محلول رقم 5 إلى 2 مل من محلول رقم 4 ثم أضيف 0.2 مل من المستخلص الإنزيمي إلى مزيج التفاعل .

4- تمت قراءة الامتصاص على طول موجي 280 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي (UV-visible spectrophotometer) .

2-2-7 تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز :

تم تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز من الفطر *B.bassiana* تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Park *et al*. (2000) مع بعض التحوير بالاعتماد على كمية البارانيتروفينول (p-Nitrophenol, pNP) المتحررة من تحلل مادة

. (p-Nitrophenyl N-acetyl β-D-glucosaminide , pNP-GlcNAc)

وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكايتينيز بأنها (كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من مادة pNP في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التقدير) .

1- عمل المنحنى القياسي لمادة البارانيتروفينول (pNP) :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (2.5×10^{-4}) مولاري بارانيتروفينول

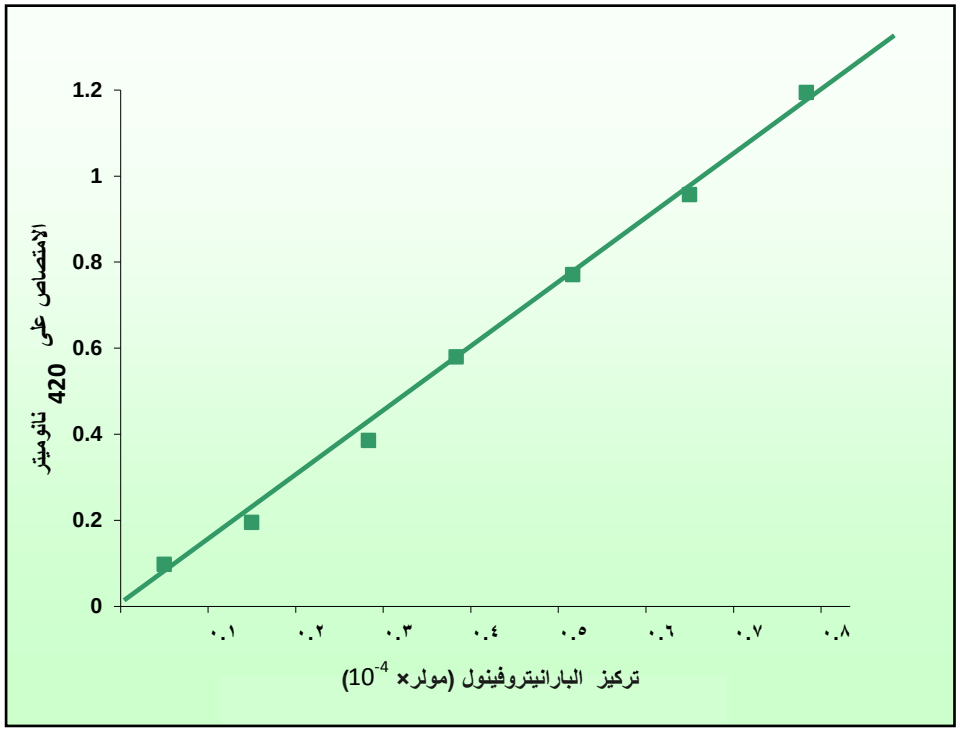
حضر بإذابة 0.0348 غم من مادة pNP في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - (0.5) مولاري كاربونات الصوديوم

حضر بإذابة 5.299 غم من كاربونات الصوديوم (Na_2CO_3) في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر . أضيفت الحجوم المبينة في الجدول التالي في أنابيب اختبار و بواقع مكررين لكل حجم (duplicate)

رقم الأنبوب	مل من محلول رقم (1)	مل من الماء المقطر	مل من محلول رقم (2)	التركيز النهائي للبارانيتروفينول(مولاري)
1	0.00	4.00	1	(Blank) 0.00
2	0.125	3.875	1	$10^{-4} \times 0.0652$
3	0.25	3.75	1	$10^{-4} \times 0.125$
4	0.50	3.50	1	$10^{-4} \times 0.25$
5	0.75	3.25	1	$10^{-4} \times 0.375$
6	1.00	3.00	1	$10^{-4} \times 0.50$
7	1.25	2.75	1	$10^{-4} \times 0.625$
8	1.50	2.50	1	$10^{-4} \times 0.75$

وتمت قراءة الامتصاص على 420 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي و أستحصل المنحنى القياسي للبارانيتروفينول برسم العلاقة بين الامتصاص و تركيز الـ pNP (الشكل 1) .



الشكل (1) : المنحنى القياسي للبارانيتروفينول (pNP)

2- تقدير الفعالية :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (0.1) مولاري منظم الخلات (pH 5.0)

حضر بتخفيف 0.58 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر و بعد تعديل الـ pH إلى 5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - محلول مادة التفاعل pNP-GlcNAc بتركيز 4 ملي مولر

حضر بإذابة 0.136 غم من مادة pNP-GlcNAc في كمية من محلول رقم 1 وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 100 مل بمحلول رقم 1 ذاته .

محلول رقم (3) – 1 مولاري كاربونات الصوديوم

حضر بإذابة 10.59 غم من كاربونات الصوديوم في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

وتم تقدير الفعالية الإنزيمية على درجة حرارة 37 مْ كما يلي :

1- أضيف 0.2 مل من المستخلص الإنزيمي إلى 0.2 مل من محلول رقم 2 مع 0.6 مل من محلول رقم 1 و أجري التفاعل لمدة 30 دقيقة .

2- أوقف التفاعل بإضافة 1 مل من محلول رقم 3 .

3- عمل محلول صفري (Blank) بإضافة 1 مل من محلول رقم 3 إلى 0.2 مل من محلول رقم 2 مع 0.6 مل من محلول رقم 1 ثم أضيف 0.2 مل من المستخلص الإنزيمي إلى مزيج التفاعل .

4- تمت قراءة الإمتصاص على 420 نانوميتر بإستخدام جهاز المطياف الضوئي .

2-2-8 تقدير البروتين :

تم تقدير البروتين حسب طريقة (Bradford ,1976) بإستخدام البومين المصل البقري (BSA) كبروتين قياسي .

- عمل المنحنى القياسي :

المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) – محلول صبغة كوماسي الزرقاء (Coomasie Brilliant Blue G250)

أذيب 100 ملغم من صبغة الكوماسي الزرقاء في 50 مل من الكحول الأثيلي 95 % ، ثم أضيف إلى هذا المحلول 100 مل من حامض الفسفوريك 85 % مع التبريد ، بعدها أكمل الحجم إلى لتر بإضافة الماء المقطر .

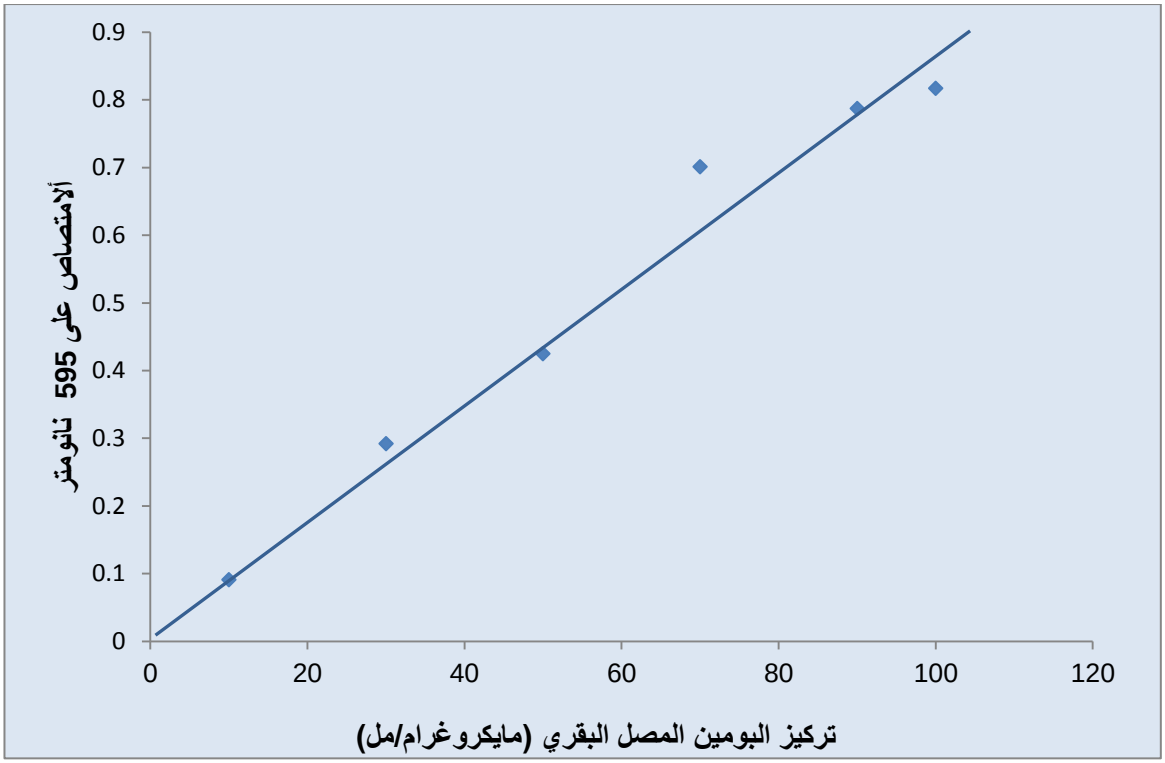
محلول رقم (2) – محلول البومين المصل البقري القياسي (100مايكروغرام / مل)

حضرت تراكيز متدرجة من البومين المصل البقري حسب الجدول الآتي :

المحلول الخزين (مايكروليتر)	الماء المقطر (مايكروليتر)	الحجم الكلي (مايكروليتر)	تركيز البروتين (مايكروغرام)
100	900	1000	10
300	700	1000	30
500	500	1000	50
700	300	1000	70
900	100	1000	90
1000	0.0	1000	100

أضيفت 2.5 مل من محلول رقم (1) إلى 500 مايكروليتر من كل تركيز ، ثم مزج المحلول بصورة جيدة و ترك لمدة خمس دقائق بعدها تمت قراءة الإمتصاص (لكل تركيز مكررين) على طول موجي 595 نانوميتر ، بعد أن صفر جهاز المطياف بمحلول صفري (Blank) الذي يتكون من 0.5 مل منظم الخلات (pH 5.0) و 2.5 مل من محلول رقم 1 .

أستحصل المنحنى القياسي برسم العلاقة بين الإمتصاص عند الطول الموجي 595 نانوميتر مقابل تركيز ألبومين المصل البقري (الشكل 2) .



الشكل (2) : المنحنى القياسي للبروتين بطريقة برادفورد .

2-2-9 تنقية إنزيم البروتييز المنتج من الفطر *B.bassiana* :

بعد تثبيت الظروف المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *B.bassiana* ، حضر وسط الإنتاج المكوّن من خميرة الخبز بتركيز 1.5 % و 0.3 % من كبريتات الأمونيوم و بعد إتمام الإذابة لهذه المكونات عدل الرقم الهيدروجيني إلى 6.5 و عقم بالمؤصدة ثم لقح بحجم لقاح مقداره 16% وحضن في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة 30 مْ بسرعة رج 150 دورة/ دقيقة لمدة 72 ساعة ، بعدها فصلت الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الحاوي على الإنزيم و ذلك للحصول على الإنزيم بشكل رائق . وجرت جميع مراحل التنقية تحت ظروف مبردة بحسب الخطوات الآتية :

1- الديلزة :

– محلول (0.005) مولاري منظم الترس (pH 8.0)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 8.0 أكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر .

و قد أجريت عملية الديلزة بإستخدام أكياس الديلزة حيال محلول 0.005 مولر منظم الترس بإبداله ثلاث مرات خلال 6 ساعات و بعد إنتهاء العملية تم تقدير الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتييز فضلاً عن تقدير البروتين .

2– الترسيب بالايثانول بنسبة 70 % :

أجريت عملية الترسيب للمستخلص الإنزيمي المديلز في الخطوة السابقة بوساطة الإيثانول المبرد بنسبة 70 % ثم طرد مركزياً بإستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4 مْ ، ثم أذيب الراسب في كمية من محلول منظم الترس (pH 8.5) وقدرت الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتييز إضافة إلى تقدير البروتين .

3– التبادل الأيوني بإستخدام المبادل DEAE-Cellulose :

– المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) – (0.25) مولاري هيدروكسيد الصوديوم – (0.25) مولاري كلوريد الصوديوم

حضر بإذابة 2.5 غم من هيدروكسيد الصوديوم و 3.625 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 250 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) – (0.25) مولاري محلول حامض الهيدروكلوريك

حضر بتخفيف 5.38 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 250 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (3) – (0.005) مولاري منظم الترس (pH8.0)

حضر بذات الطريقة الواردة في خطوة الديلزة .

محلول رقم (4) – (0.6) مولاري كلوريد الصوديوم

حضر بإذابة 17.55 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من محلول رقم 3 ثم أكمل الحجم إلى 500 مل بالمحلول رقم 3 ذاته .

–تحضير عمود التبادل الأيوني :

حضر المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بحسب الطريقة الموصوفة من قبل Whitaker (1972) و ذلك بإتباع الخطوات الآتية :

1- خلط 20 غم من المبادل الأيوني مع 1 لترمن الماء المقطر و ترك ليركد ثم أزيل السائل العلوي و كررت هذه الخطوة مرات عدة الى أن أصبح السائل العلوي رائقاً ثم رشح تحت التفريغ بإستخدام قمع بخنر .

2- نشط المبادل بإضافة 250 مل من محلول رقم 1 لمدة 30 دقيقة و غسل في قمع بخنر بالماء المقطر، بعدها أضيف 250 مل من محلول رقم 2 ولمدة 30 دقيقة وغسل مرات عدة بالماء المقطر .

3- علق المبادل في محلول رقم 3 و تم تعبئة المبادل في عمود زجاجي بأبعاد (1.8×18) سم وأجريت له الموازنة بإستخدام المحلول رقم 3 بسرعة جريان مقدارها 1 مل/ دقيقة .

– إضافة النموذج :

أضيف 16 مل من النموذج المتحصل عليه من خطوة الترسيب بالإيثانول 70 % إلى سطح العمود بهدوء وغسل العمود بمحلول منظم الترس بتركيز 0.005 مولر وبرقم هيدروجيني 8.0 وجمعت الأجزاء المنفصلة من العمود في أنابيب إختبار بواقع 3 مل لكل أنبوب و بسرعة جريان ثابتة 1 مل / دقيقة . وتمت متابعة تركيز البروتين في الأجزاء المنفصلة (والتي لم ترتبط بالمبادل الأيوني) وذلك

بمتابعة الامتصاص لكل جزء من هذه الأجزاء عند طول موجي 280 نانوميتر لحين التأكد من نزول جميع الأجزاء التي لم ترتبط بالمبادل .

- إسترداد الإنزيم (Enzyme elution):

أجريت عملية الاسترداد بإستخدام 150 مل من محلول رقم 4 مقابل 150 مل من محلول رقم 3 وتم متابعة تركيز البروتين للأجزاء المنفصلة (بعد إجراء الإسترداد) عند الطول الموجي السابق نفسه . وقد قدرت الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتييز في القمم البروتينية المنفصلة ثم قدرت الفعالية الإنزيمية في الأجزاء التابعة للقمة التي أظهرت فعالية إنزيمية ، ثم جمعت الأجزاء التابعة لهذه القمة وتم قياس حجمها وقدرت فيها الفعالية الأنزيمية لإنزيم البروتييز فضلاً عن تقدير البروتين . ورسمت العلاقة بين الامتصاص وعدد الأجزاء وكذلك العلاقة بين الفعالية الإنزيمية (وحدة / مل) وعدد الأجزاء .

2-2-10 توصيف إنزيم البروتييز :

1- تقدير الثوابت الحركية للإنزيم :

قدرت قيم ثابت ميكالس (K_m) و السرعة القصوى (V_{max}) بوساطة المنحنى المقلوب (Reciprocal plot) لتركيز مادة التفاعل مقابل السرعة الأولية تبعاً لطريقة Lineweaver & Burk (1934) .

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (1) مولاري منظم الترس (pH 8.5)

حضر بإذابة 12.11غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 8.5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) – محلول مادة التفاعل

حضرت مادة التفاعل (الكازائين) بتراكيز (0.05–5) % إذ حضرت التراكيز (3 و4 و5)% كلاً على إنفراد بينما حضر المحلول 2% و عدّ محلول خزين وتم عمل التخافيف منه وكما هو موضح بالجدول الآتي :

التركيز النهائي %	الحجم النهائي (مللتر)	مللتر من 1 مولاري محلول منظم الترس	مللتر من 2% كازائين
0.05	40	39	1
0.1	40	38	2
0.25	40	35	5
0.5	40	30	10
1	40	20	20
2	40	0.0	40

وتم تقدير الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتيز بإستخدام محاليل مادة التفاعل أعلاه ، وأستحصلت قيم K_m و V_{max} بإستخدام المنحنى المقلوب لتركيز مادة التفاعل مقابل السرعة الأولية .

2– تخصص الإنزيم حيال مادة التفاعل (Substrate Specificity):

أ– الفعالية النسبية للإنزيم بإستخدام مواد تفاعل مختلفة

– المحاليل المستخدمة :

حضرت محاليل مواد التفاعل لبروتينات الكازائين (Casien) والبومين المصل البقري (BSA) والبومين البيض (Ovalbumin) والجيلاتين (Gelatin) بإذابة 2 غم من كل بروتين على إنفراد

في كمية من محلول منظم الترس 1 مولاري و رقم هيدروجيني 8.5 وبعد الإذابة التامة للبروتين أكمل الحجم إلى 100 مل بمحلول الترس نفسه .

- طريقة العمل :

أختبرت أربعة أنواع من مواد التفاعل في تحديد تخصص إنزيم البروتييز حيال مادة التفاعل شملت الكازائين والجيلاتين والبومين البيض والبومين المصل البقري، وتم تقدير الفعالية الإنزيمية للبروتييز وتم إعتبار الفعالية الإنزيمية بإستخدام الكازائين كمادة تفاعل 100% وحسبت الفعالية النسبية لبقية مواد التفاعل وفق المعادلة الآتية :-

$$\text{الفعالية النسبية لإنزيم البروتييز بإستخدام أي مادة تفاعل \%} = \frac{\text{الفعالية الإنزيمية للبروتييز بإستخدام أي مادة تفاعل}}{\text{الفعالية الإنزيمية بإستخدام الكازائين كمادة تفاعل}} \times 100$$

ب-تقدير الثوابت الحركية للإنزيم بإختلاف مادة التفاعل

تم حساب قيمة ثابت ميكالس والسرعة القصوى للإنزيم ولكن بإستخدام مواد التفاعل الجيلاتين و البومين المصل البقري وبتراكيز(0.05 – 5)% وبإتباع طريقة تقدير الثوابت الحركية للإنزيم نفسها عند إستخدام الكازائين كمادة تفاعل والموصوفة سابقاً .

3- تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (0.1) مولاري منظم الفوسفات بمدى pH من (7.0 -7.5)

حضر بإذابة 0.34 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى الرقم الهيدروجيني المطلوب أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) – (1) مولاري منظم الترس بمدى pH من (8.0– 10.5)

حضر بإذابة 0.3029 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـpH الى الرقم الهيدروجيني المطلوب أكمل الحجم الى 25 مل بالماء المقطر.

محلول رقم (3) – محلول مادة التفاعل 2% كازائين

حضر بمزج حجم واحد من محلول الكازائين الخزين (المحضر سابقاً) مع حجمين من الماء المقطر وحجم واحد من المحاليل المنظمة المحضرة سابقاً بمدى الأرقام الهيدروجينية (7.0–10.5) .

– طريقة التقدير :

قدرت الفعالية لإنزيم البروتييز في كل محلول من محاليل مادة التفاعل المحضرة في الخطوة السابقة بالأسلوب نفسه المتبع في تقدير الفعالية الإنزيمية و رسمت العلاقة بين الـ pH و الفعالية الإنزيمية لتحديد الـ pH الأمثل للفعالية .

4– تحديد الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم :

حضرت محاليل منظمة ذات قوة أيونية واحدة 0.2 مولاري على مدى قيم pH بين (5.0– 10.5) وعلى النحو الآتي :

محلول رقم (1) – منظم الخلات (pH 5.0)

حضر بتخفيف 0.29 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.107 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) – منظم الخلات (pH 5.5)

حضر بتخفيف 0.29 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.045 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 5.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (3) – منظم الخلات (pH 6.0)

حضر بتخفيف 0.29 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.016 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 6 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (4) – منظم الفوسفات (pH 6.5)

حضر بإذابة 0.68 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.109 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 6.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (5) – منظم الفوسفات (pH 7.0)

حضر بإذابة 0.68 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.066 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 7 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (6) – منظم الفوسفات (pH 7.5)

حضر بإذابة 0.68 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 7.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (7) – منظم الترس (pH 8.0)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.13 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 8 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (8) – منظم الترس (pH 8.5)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.223 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 8.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (9) – منظم الترس (pH 9.0)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.259 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 9 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (10) – منظم الترس (pH 9.5)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.259 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 9.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (11) – منظم الترس (pH 10.0)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.259 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 10 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (12) – منظم الترس (pH 10.5)

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.259 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 10.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

– طريقة التقدير :

حضن 2 مل من إنزيم البروتييز مع 2 مل من كل من المحاليل المنظمة [محلول رقم 1 ولغاية محلول رقم 12] في أنابيب اختبار في حمام مائي على درجة حرارة 37 مْ ولمدة 30 دقيقة ثم بردت الأنابيب في حمام مائي ثلجي وقدرت فعالية إنزيم البروتييز المتبقية في كل نموذج بالأسلوب نفسه الذي سبق وصفه في تقدير الفعالية الإنزيمية ورسمت العلاقة بين النسبة المئوية للفعالية المتبقية و الـ pH لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم .

5– تقدير الثبات الحراري للإنزيم :

حضن 2 مل من إنزيم البروتييز في حمام مائي على درجات حرارة (20 و 25 و 30 و 35 و 40 و 45 و 50 و 55 و 60 و 65 و70) مْ لمدة 30 دقيقة . وبردت الأنابيب في حمام مائي ثلجي مباشرة ثم قدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية .

6– تأثير بعض الأيونات المعدنية والمواد الكيميائية في فعالية الإنزيم :

حضرت محاليل كلوريدات الفلزات والمواد الكيميائية أدناه بتراكيز 10 ملي مولاري كمحلول خزين كالآتي :

محلول رقم (1) – محلول كلوريد المنغنيز

حضر بإذابة 0.063 غم من كلوريد المنغنيز ($MnCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (2) – محلول كلوريد الزئبق

حضر بإذابة 0.135 غم من كلوريد الزئبق ($HgCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (3) – محلول كلوريد النيكل

حضر بإذابة 0.065 غم من كلوريد النيكل ($NiCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (4) – محلول كلوريد المغنيسيوم

حضر بإذابة 0.048 غم من كلوريد الفضة ($MgCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (5) – محلول كلوريد الكالسيوم

حضر بإذابة 0.055 غم من كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (6) – محلول (Iodoacetamide , IAA)

حضر بإذابة 0.092 غم من مادة IAA في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (7) – محلول (Ethylene Diamine Tetra acetic acid , EDTA)

حضر بإذابة 0.186 غم من مادة EDTA في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (8) – محلول المركابتوايثانول

حضر بتخفيف 0.035 مل من المركابتوايثانول في كمية من الماء الخالي من الأيونات ثم أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (9) – محلول حامض البوريك

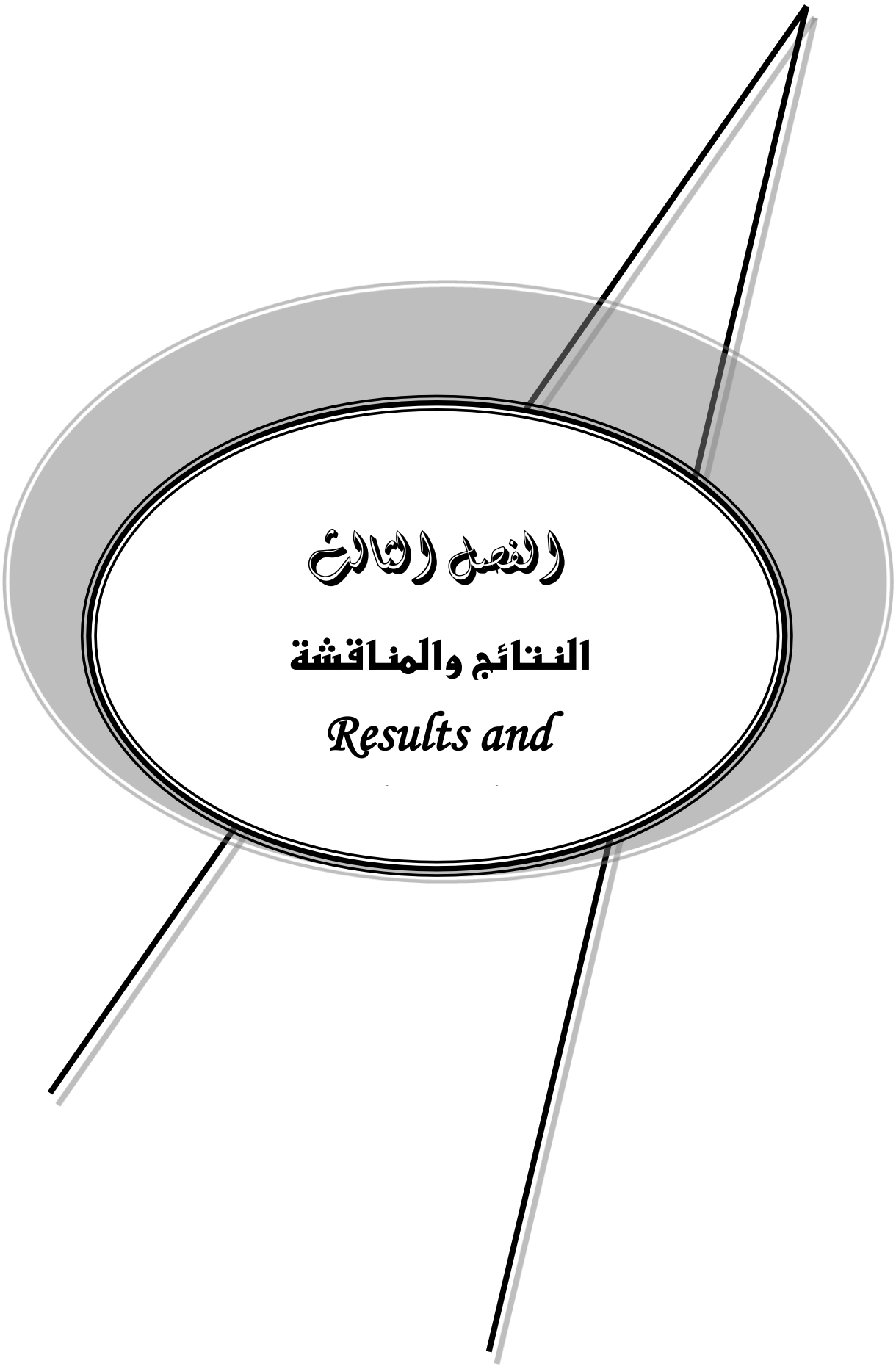
حضر بإذابة 0.031 غم من حامض البوريك في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

محلول رقم (10) – محلول (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride ,PMSF)

حضر بإذابة 0.095 غم من مادة PMSF في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

– طريقة التقدير :

مزج محلول إنزيم البروتييز مع حجم مماثل لكل من المحاليل آنفة الذكر للحصول على تركيز 5 ملي مولر لكل محلول ثم حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 10 دقائق ، أعقبها تقدير الفعالية الإنزيمية فضلاً عن تقدير الفعالية الإنزيمية للسيطرة (المحلول الإنزيمي دون معاملة بأي من محاليل كلوريدات الفلزات والمواد الكيمياوية) وذلك لتحديد نسبة الفعالية المتبقية . وللحصول على تركيز 1 ملي مولر للمحاليل آنفة الذكر ، أضيف 0.1 مل من كل محلول من المحاليل ذات التركيز 10 ملي مولر إلى 0.4 مل من الماء الخالي من الأيونات فأصبح الحجم 0.5 مل الذي مزج مع 0.5 مل من المحلول الإنزيمي للبروتييز وتم الحضن وقياس الفعالية الإنزيمية كما هو الحال عند استخدام التركيز 5 ملي مولر السابق وصفه .


الفصل الثالث
النتائج والمناقشة
Results and

3 – النتائج و المناقشة

3-1 تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *Beauveria bassiana* :

لايوجد وسط محدد للإنتاج الأمثل للإنزيم من مصادر مايكروبية مختلفة ، إذ أن لكل كائن مجهري ظروف خاصة للإنتاج الأقصى من الإنزيم (Ire *et al.* , 2011) ، وهذا الإنتاج لا يعتمد فقط على الطبيعة الوراثية للكائن نفسه فحسب وإنما يتأثر بشكل كبير بمكونات الوسط خصوصاً مصادر الكاربون والنيتروجين ، إضافة إلى عوامل أخرى مثل درجة حرارة الحضن و الرقم الهيدروجيني للوسط و مدة الحضن وحجم اللقاح وسرعة الرج (RaviKumar *et al.* , 2012 ; Reddy *et al.* , 2011) .

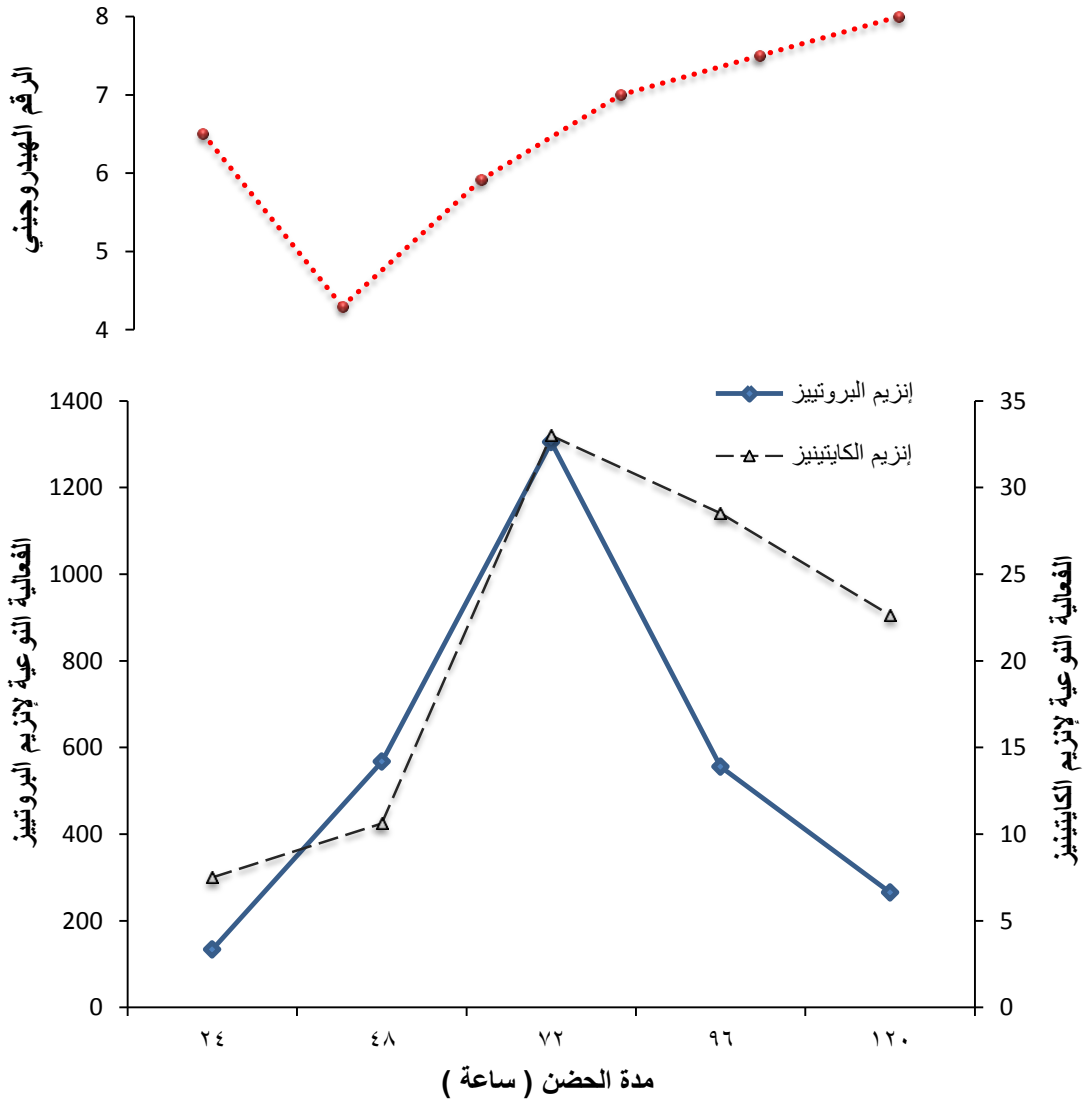
1- تأثير مدة الحضن :

تم متابعة إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana* خلال خمسة أيام من التخمر وذلك بسحب كمية من وسط التخمر يومياً لتقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين ، كما تمت متابعة تغيرات الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر .

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل 3 أن إنتاج الإنزيمين يبدأ بعد 24 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 133.3 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم البروتييز و 7.5 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز ليصل إلى أقصاه بعد 72 ساعة من التخمر بفعالية نوعية (1304.34 و33) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز، على التوالي .

وتتفق هذه النتيجة مع ما وجده Ito *et al.* (2007) الذي ذكر أن 80 % من فعالية إنزيم البروتييز المنتج من الفطر *B. bassiana* بدأت بعد 24 ساعة من الحضن ووصلت أقصاها بعد 120 ساعة . إن الإفراز المبكر لإنزيم البروتييز يدل على وجود وسط غني يحوي متطلبات النمو للكائن المجهري المنتج فضلاً عن إنتاج الإنزيم (Qureshi *et al.* ,2011) .

بعد مدة الحضن المثالية يبدأ إنتاج الإنزيمين بالانخفاض تدريجياً حتى تصل الفعالية النوعية في اليوم الخامس إلى (265.15 و22.64) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز، على التوالي .



الشكل (3) : تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana*

إن إنخفاض إنتاج الإنزيمين في مدة الحضن الطويلة يعزى إلى انخفاض مستوى المواد الغذائية في الوسط وإنتاج مواد الأيض السامة (Muthulakshmi *et al.* , 2011) أو بسبب التحلل الذاتي للإنزيم بفعل الإنزيمات المحللة للبروتين الأخرى (Ferracini-Santos & Sato , 2009) .

وفي ضوء هذه النتائج فقد تم تثبيت مدة حضن قدرها 72 ساعة لأفضل إنتاج من الإنزيمين وتم إستخدامها في التجارب كافة، وتتفق هذه النتيجة مع ما أشار إليه Campos *et al.* (2005) إذ بلغ أقصى إنتاج لإنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B.bassiana* و *B.amorpha* بعد ثلاثة أيام من التخمر . كما كانت الفترة ذاتها هي المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Trichoderma atroviride* (Šimkovič *et al.* , 2012) والفطر *Penicillium griseoroseum* (Haq *et al.* ,2006) . كما ذكر كل من Lopez-(2012) Mondejar *et al.* و Kim & Jo (2010) أن مدة الحضن 72 ساعة هي الأفضل للحصول على الكايتينيز من الفطرين *T. harzianum* و *B.bassiana* ، على التوالي .

في حين أشارت دراسات أخرى إلى إستخدام فترات حضن أطول لإنتاج الإنزيمين من الفطريات ، فقد كانت مدة حضن مقدارها 5 أيام هي المثلى لإنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *T.* L1 *harzianum* (Jayalakshmi *et al.* ,2009) وإنتاج الكايتينيز من الفطر *B.bassiana* (Sassá *et al.* ,2009) . وأشارت Sharaf (2005) إلى أن مدة الحضن اللازمة لإنتاج الكايتينيز من الفطر *Alternaria alternata* كانت (7) أيام . وبلغ أقصى إنتاج لإنزيم البروتييز من الفطر *Nomuraea rileyi* بعد 10أيام من الحضن (Nunes *et al.* ,2010) . بينما أوضح *et al.* Wang (2009) أن إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Hirsutella rhossiliensis* قد إزداد بعد 12 يوم من الحضن . إن الإختلاف في مدة الحضن لكلا الإنزيمين يعكس الإختلاف في إنتاج الإنزيمين على أوساط مختلفة (Ito *et al.* ,2007) .

وبالرجوع إلى الشكل 3 يلاحظ إنخفاض الرقم الهيدروجيني عن الرقم الهيدروجيني الأبتدائي 6.5 لوسط التخمر إلى 4.3 بعد 24 ساعة من التخمر ثم إزدادت قيمته تدريجياً ليصل إلى 7.0 بعد 72 ساعة حيث يصل إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز إلى أقصاه ، و بلغت أعلى قيمة للرقم الهيدروجيني في اليوم الخامس 7.9 . وتتفق هذه النتيجة مع ما ذكره (Ire *et al.* ,2011) حيث إنخفض الرقم الهيدروجيني للوسط بعد 24 ساعة من التخمر عن الرقم الهيدروجيني الأبتدائي 6.0 ليصبح 4.0 . إن إنخفاض قيمة هذا الرقم ربما يعزى إلى تراكم نواتج الأيض الثانوي الحامضية في الوسط مثل حامض الأوكزاليك (Oxalic acid) (Dias *et al.* ,2008) .

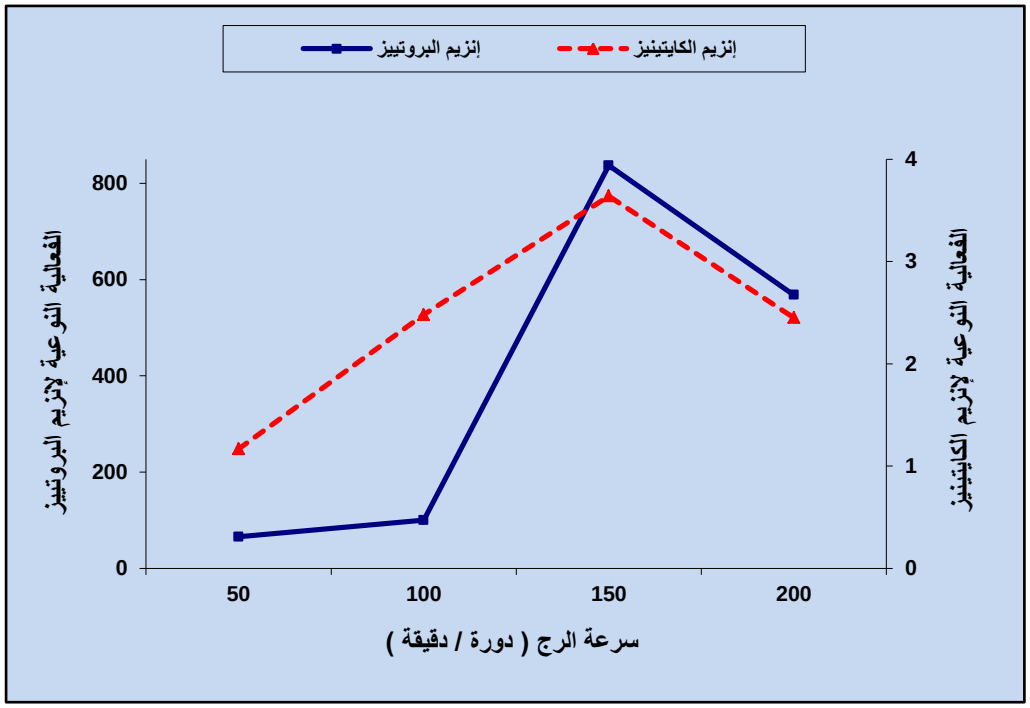
ويمكن تفسير ارتفاع الرقم الهيدروجيني خلال مدة التخمر في هذه الدراسة إلى وجود خميرة الخبز في وسط التخمر التي يمكن أن تكون مصدراً نيتروجينياً عضوياً لنمو الفطر *B. bassiana* ، حيث انه في حالة استخدام الكائنات المجهرية الحية للمركبات الأمينية العضوية لغرض النمو فأن ذلك يؤدي إلى ارتفاع في الرقم الهيدروجيني بسبب أن هذه المركبات ستفقد مجموعة الأمين مما يؤدي إلى ارتفاع الرقم الهيدروجيني (الحيدري و المصلح ،1989) .

2- تأثير سرعة الرج :

لقح وسط إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana* ثم حضن بالحاضنة الهزازة بسرع رج (50 و 100 و 150 و200) دورة / دقيقة . و يوضح الشكل 4 أن أعلى فعالية نوعية لإنزيمي البروتييز والكايتينيز والتي بلغت (836.84 و3.64) وحدة /ملغم بروتين ، على التوالي كانت عند سرعة رج 150 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 للإنزيمين عند سرعة رج 50 دورة / دقيقة ، إذ بلغت 65.57 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم البروتييز و 1.17 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز ، ويعزى ذلك إلى عدم كفاية التهوية والمواد الغذائية والتي تؤدي إلى عدم قدرة الفطر للنمو بشكل كفوء (Sepahy & Jabalameli ,2011) .

كذلك يبين الشكل 4 إنخفاض الفعالية النوعية للإنزيمين بزيادة سرعة الرج حيث بلغت 567.8 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم البروتييز و 2.45 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز عند سرعة رج 200 دورة / دقيقة .

إن السرع العالية للرج تؤدي إلى مسخ الإنزيم وتحطيم الخلايا مما يقلل إنتاج الإنزيم أو إنها تؤدي إلى تحلل الخلايا و زيادة نفاذيتها نتيجة الإحتكاك بفعل قوى القص (Shear forces) (Sepahy & Jabalameli ,2011) .



الشكل (4) : تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana*

و في ضوء هذه النتيجة تم تثبيت الحاضنة الهزازة على سرعة رج 150 دورة / دقيقة لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana* و أعتمدت في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها . وتتفق النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة مع ما ورد في دراسات سابقة عدة إذ أستخدمت سرعة الرج 150 دورة / دقيقة لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز الداخلي (Endochitinase) من الفطر *B.*

B. bassiana و *B. amorpha* (Campos *et al.* ,2005) وإنتاج البروتييز من الفطر *bassiana* (Ito *et al.* ,2007 ; Rao *et al.* ,2006) كذلك إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Alternaria alternata* (Sharaf ,2005) .

تختلف مستويات الأوكسجين الذائب في الوسط خلال عملية التخمر نتيجة الإختلافات في معدل التهوية وسرعة الرج والتي تؤثر بشكل كبير على نمو خلايا الفطر وبالتالي إنتاج الإنزيمات الخارج خلوية (Chi *et al.* ,2007) .

كذلك أستخدمت سرع رج مختلفة في دراسات عدة لإنتاج الإنزيمين ، فقد إستخدم (Silva *et al.* (2011 سرعة رج مقدارها 180 دورة / دقيقة لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *T. asperellum* . وإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *B. bassiana* (Donatii *et al.* ,2008) . في حين إستخدم Ike *et al.* (2006) سرعة الرج 220 دورة / دقيقة لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. reesei* PC-3-7 . وتم إنتاج إنزيم البروتييز من الفطرين *Lacanicillium psalliotae* و *B. bassiana* باستخدام الحاضنة الهزازة بسرعة رج 200 دورة / دقيقة (Kim *et al.* ,1999 ; Yang *et al.* ,2005) ، على التوالي .

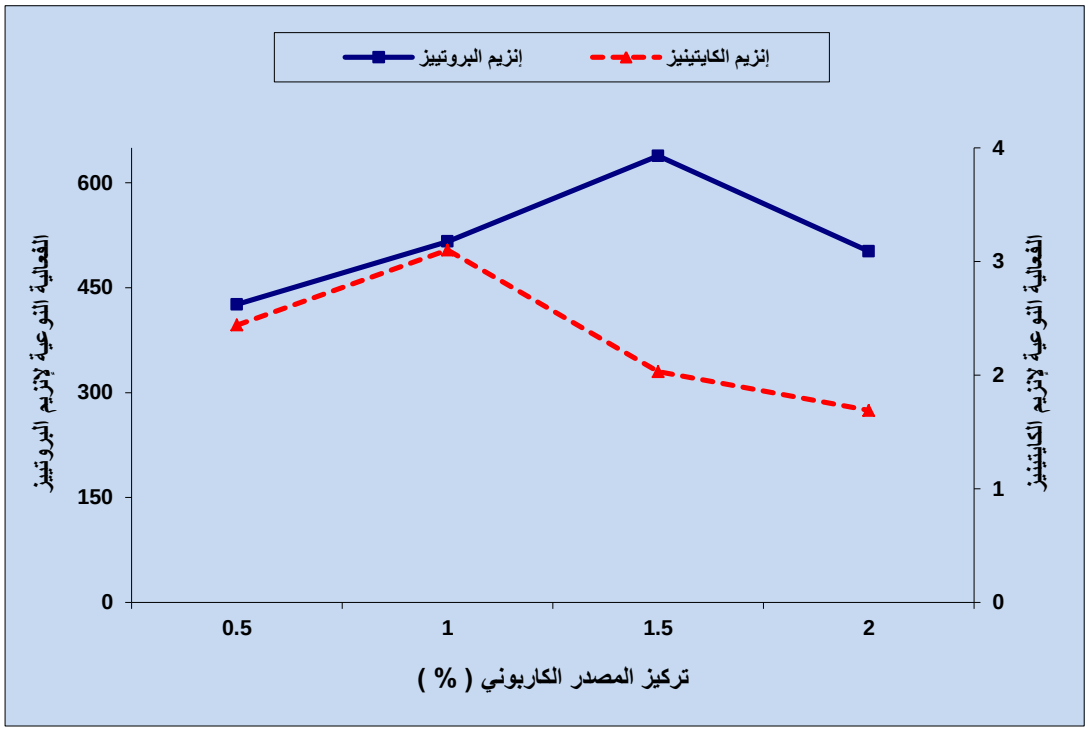
إن حاجة الأحياء المجهرية لسرع رج مختلفة يعزى إلى الإختلافات في فسيولوجية الكائن المنتج للإنزيم ومكونات الوسط وحجمه بالدورق (Ghanem *et al.* ,2011) .

3- تأثير تركيز المصدر الكاربوني :

أستخدمت خميرة الخبز في هذه الدراسة كمصدر كاربوني وحيد لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana* ،إذ تم إستخدامها بتراكيز متدرجة (0.5 و 1 و 1.5 و 2) %. إن قيم الفعالية النوعية لكلا الإنزيمين والموضحة في الشكل 5 تبين أن أفضل تركيز لخميرة الخبز لإنتاج إنزيم البروتييز هو 1.5% إذ بلغت الفعالية النوعية 638.2 وحدة /ملغم بروتين ، بينما كان التركيز 1 % من خميرة الخبز قد أعطى أعلى فعالية نوعية لإنزيم الكايتينيز والتي بلغت 3.1 وحدة /

ملغم بروتين . وفي ضوء هذه النتائج تم استخدام خميرة الخبز بتركيز 1.5 % لإنتاج كلا الإنزيمين في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها.

إن توفر مصدر كاربون في الوسط ضروري لتحرير الطاقة التي تحتاجها الأحياء المجهرية للنمو وإن قلة تجهيزها بالوسط يقلل من نموها ، لذا فهي تؤثر بشكل كبير في إنتاج الإنزيم من تلك الأحياء المجهرية (Haq *et al.* ,2008) وتتباين المصادر الكاربونية وتراكيزها المطلوبة لتنمية الأنواع المختلفة من الأحياء المجهرية وإنتاج الإنزيم (Jaswal *et al.* ,2008) .



الشكل (5) : تأثير تركيز المصدر الكاربوني في إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *B. bassiana*

هناك دراسات عدة قارنت كفاءة مصادر كاربونية مختلفة وبتراكيز مختلفة لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من أحياء مجهرية مختلفة ، فقد حصل Donatii *et al.* (2008) على أعلى فعالية لإنزيمي البروتييز (Pr1) و(Pr2) عند تنمية الفطر *B. bassiana* في وسط يحوي كيوتكل الجراد كمصدر كاربون . وحصل Dias *et al.* (2008) على نتيجة مماثلة ومن الفطر نفسه ولكن بأستخدام

Coffe berry borer cuticle . بينما إستخدم Silva *et al.* (2011) الكلوكوز والكايتين بتركيز (0.02 و0.5) % ، على التوالي كمصدرين كاربونيين لإنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *T.asperellum* . وذكرت Sharaf (2005) أن أفضل مصدر كاربوني لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Alternaria alternata* هو الكايتين الغروي بتركيز 1.5 % .

بينما كان الكايتين بتركيز 2 % أفضل مصدر كاربوني لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *M.anisoplae* (St.Leger *et al.* ,1986) . و كان أعلى إنتاج لإنزيم البروتييز من الفطر *Penicillium chrysogenum* بإضافة الكلوكوز 0.5 % كمصدر كاربوني في الوسط (Haq *et al.* ,2008) .

4- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه :

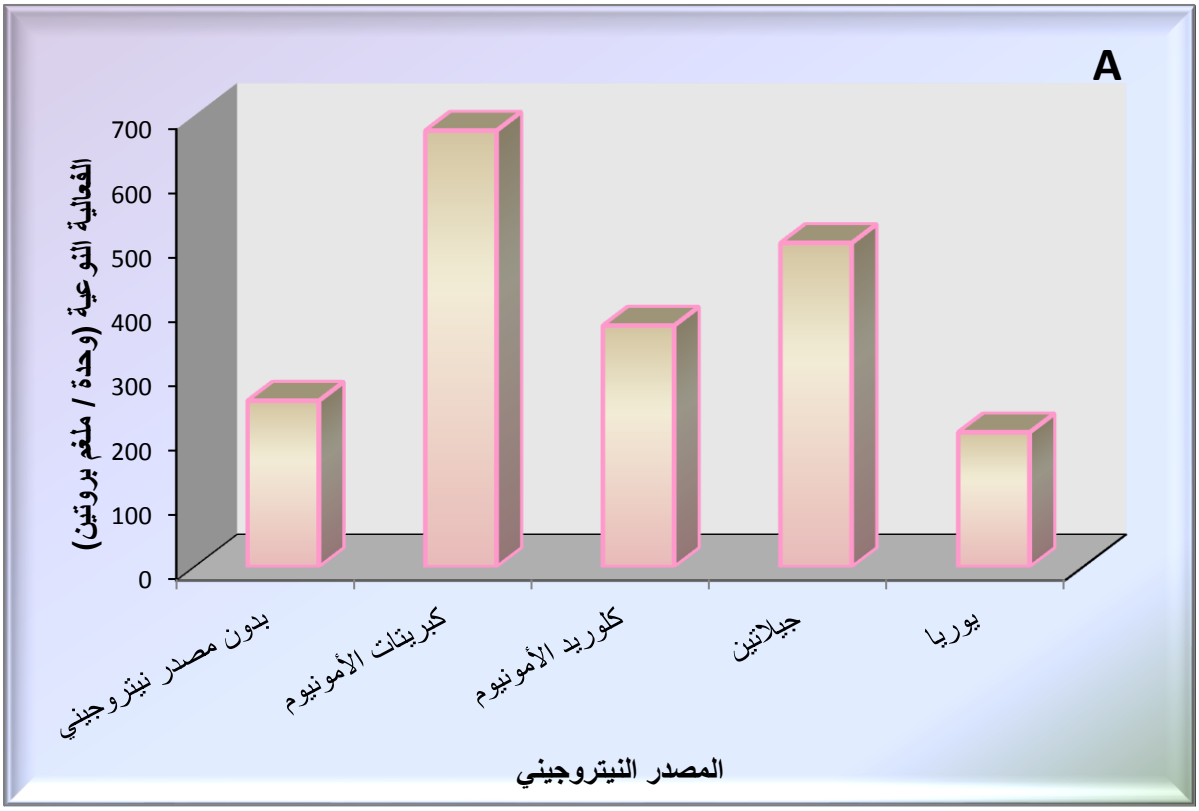
تم دراسة تأثير أربعة مصادر نيتروجينية في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana* وهي (الجيلاتين و اليوريا و كبريتات الأمونيوم و كلوريد الأمونيوم) ، إضافة إلى المعاملة الخالية من المصدر النيتروجيني للمقارنة .

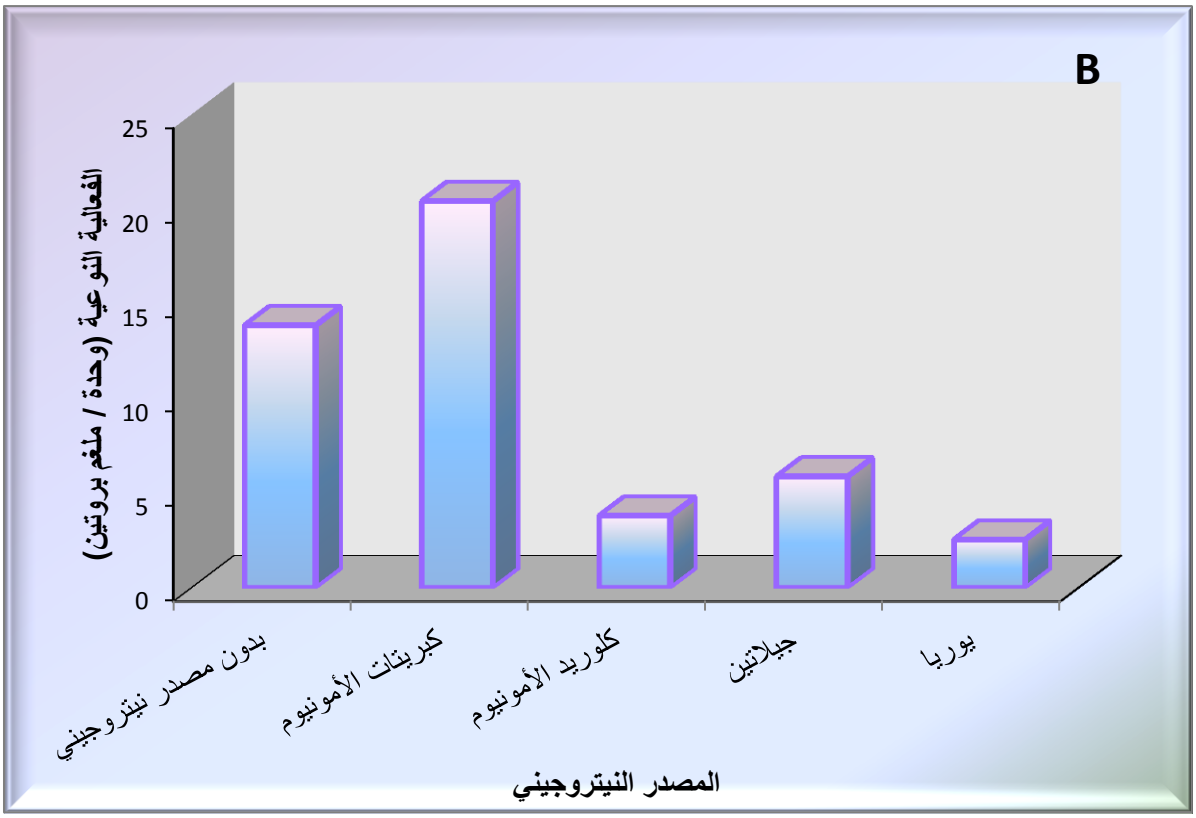
أظهرت النتائج الموضحة في الشكل 6 أن كبريتات الأمونيوم هي المصدر النيتروجيني الأكفأ في إنتاج الإنزيمين مقارنة بباقي المصادر النيتروجينية المستخدمة ، إذ بلغت الفعالية النوعية حدها الأقصى لإنزيمي البروتييز والكايتينيز (676.47 و20.43) وحدة / ملغم بروتين ، على التوالي . في حين ظهرت أوطأ فعالية نوعية للإنزيمين بوجود اليوريا حيث بلغت قيمتها (208.85 و2.55) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز ، على التوالي أيضاً .

وإستناداً لهذه النتائج تم إختيار كبريتات الأمونيوم مصدراً نيتروجينياً لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز وأستخدم في مراحل الدراسة اللاحقة كافة .

وبعد أن تم تحديد المصدر النيتروجيني الأمثل لإنتاج الإنزيمين درست تراكيز مختلفة من كبريتات الأمونيوم لتحديد التركيز الأمثل منها لإنتاج الإنزيمين ، وقد سجلت أعلى فعالية نوعية لكلا الإنزيمين عند إستخدام كبريتات الأمونيوم بتركيز 0.3 % وكما موضح في الشكل 7 . إذ بلغت الفعالية النوعية

(609.19 و8.37) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز، على التوالي. في حين إنخفضت الفعالية النوعية تدريجياً بزيادة تركيز المصدر النيتروجيني المستخدم في هذه الدراسة ، فظهرت أوطأ فعالية نوعية لإنزيم البروتييز 450.53 وحدة / ملغم بروتين ، ولإنزيم الكايتينيز3.83 وحدة / ملغم بروتين عند التركيز 1% من كبريتات الأمونيوم .

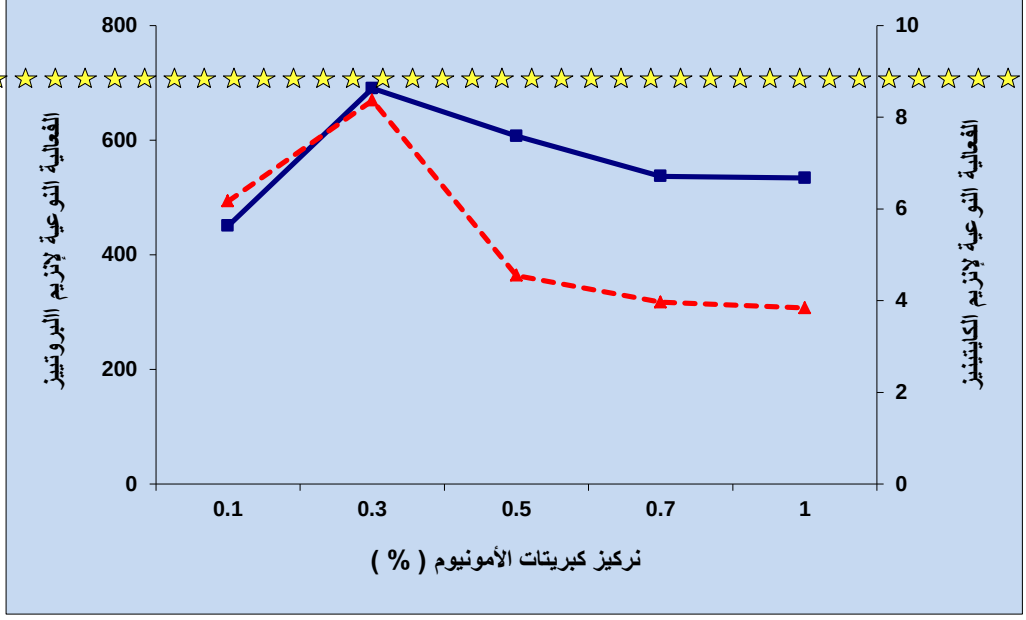




الشكل (6) : تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج إنزيمي : البروتييز (A) و الكايتينيز (B) من الفطر *B.bassiana*

وإعتماداً على النتائج أعلاه يتضح أن كبريتات الأمونيوم بتركيز 0.3 % كان فعالاً في إنتاج الإنزيمين وأستخدم في جميع التجارب اللاحقة .

إن مصدر النيتروجين المستخدم في وسط الإنتاج هو أحد العوامل الرئيسة المؤثرة في إنتاج الإنزيمات (Abd-Aziz *et al.* ,2008) والذي له دور تنظيمي في تصنيع الإنزيم ، إذ يتأيض هذا المصدر ليعطي أحماض أمينية تعد ضرورية لإنتاج الإنزيمات (Saurabh *et al.* ,2007) . ومما تجدر الإشارة إليه أن الأعفان تستطيع إنتاج هذه الأحماض الأمينية من مصادر نيتروجينية غير عضوية (Chutmanop *et al.* ,2008) .



الشكل (7) : تأثير تركيز كبريتات الامونيوم في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana*

تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Dienes *et al.* (2007) و الذي أشار إلى إستخدام كبريتات الأمونيوم كمصدر نيتروجيني لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *T. reesei* QM 9414 .

بينما كان لها تأثيراً سلبياً في إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Alternaria alternata* (Ghanem *et al.* ,2011) .

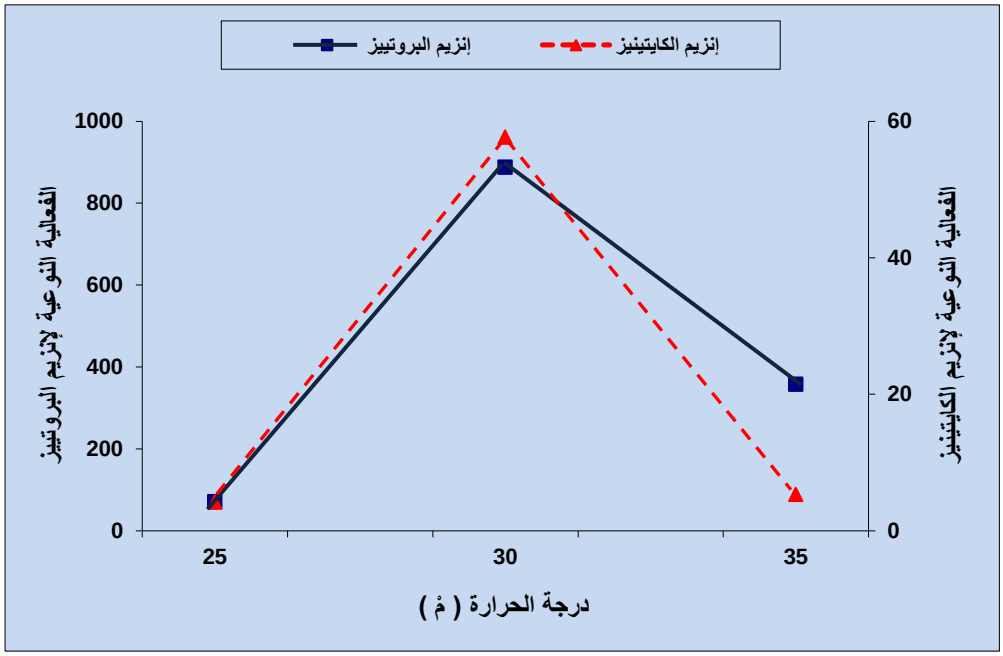
في حين أوضح Bidochka & Khachatourians (1988 , 1987) أن أستخدام الجيلاتين بتركيز 1 % أدى إلى زيادة إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *B.bassiana* . وكان الببتون (Pepton) أفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Penicillium chrysogenum* لإعطائه أعلى فعالية إنزيمية والتي بلغت 12.71 وحدة / مل (Haq *et al.* ,2008) .

وذكر Dhar & Kaur (2010b) أن إضافة مصدر نيتروجيني عضوي مثل مستخلص الخميرة (Yeast extract) بتركيز 1 % قد أدى إلى تغير ملحوظ في إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *B.bassiana*. كما أوضحت Sharaf (2005) أن أفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج إنزيم الكايتينيز

من الفطر *Alternaria alternata* هو نترات الصوديوم وبتركيز 0.3 % من بين عدة مصادر نيتروجينية مختلفة .

5- تأثير درجة الحرارة :

درس تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana* . وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل 8 إنخفاض إنتاج الإنزيمين عند درجة حرارة 25 مْ إذ بلغت الفعالية النوعية (70.2 و4.2) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز ، على التوالي . فيما إزدادت هذه الفعالية ووصلت إلى أقصاها عند الدرجة الحرارية 30 مْ حيث بلغت (887.66 و57.64) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز ، على التوالي ، مما يشير إلى أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج الإنزيمين هي30 مْ والتي أعتمدت في التجارب اللاحقة كافة. وبالرجوع إلى الشكل 8 يلاحظ إنخفاض الفعالية النوعية للإنزيمين بإزدياد درجة الحرارة إلى 35 مْ ويمكن تفسير ذلك بأن الحرارة العالية لها تأثير عكسي على العمليات الأيضية للأحياء المجهرية المنتجة للإنزيمات المحللة للبروتين مسببة تثبيط نمو الفطر وبالتالي إنتاج الإنزيم (Irfan *et al.* ,2011).



الشكل (8) : تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيمي البروتييز و الكايتينيز من الفطر *B. bassiana*

إن النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة تؤيد ما ورد في العديد من الدراسات فقد وجد Erlacher *et al.* (2006) أن درجة الحرارة 30 مْ هي المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *B. brongniartii* . كذلك كانت تلك الدرجة هي المثلى لإنتاج كلا الإنزيمين من الفطر *Isaria fumosorosea* (Ali *et al.* ,2010a) و إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. virens* (Abd-Aziz *et al.* ,2008).

بينما أستخدمت الدرجة الحرارية 27 مْ لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana* (Jayalakshmi *et al.* ,2009 ; Campos *et al.* ,2005) . و في دراسة قام بها Elad & Kapat (1999) أستخدمت درجة الحرارة 22 مْ لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *T. harzianum* . في حين كانت الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Nomuraea rileyi* هي 28 مْ (Nunes *et al.* ,2010) .

6- تأثير نوع الأملاح المعدنية و تركيزها :

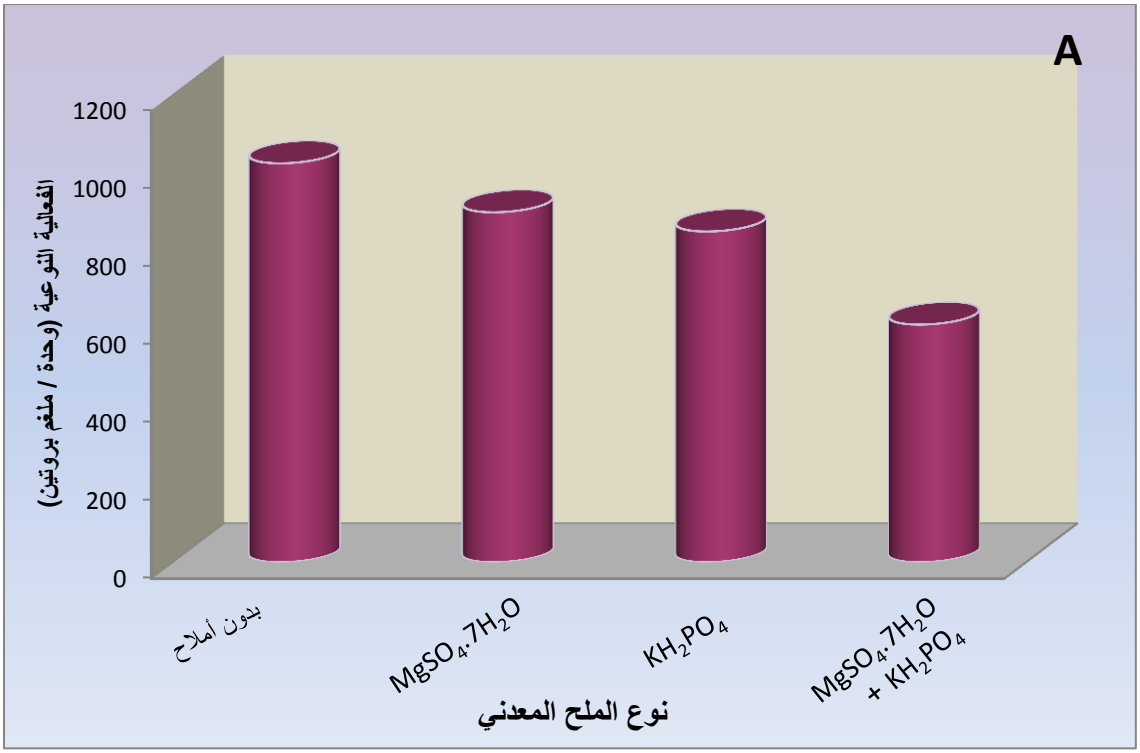
لدراسة تأثير نوع الأملاح المعدنية في إنتاج الإنزيمين من الفطر *B.bassiana* ، تم إستخدام الملحين كبريتات المغنيسيوم المائية وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين كلاًّ على انفراد، إضافة إلى المعاملة الحاوية على كلا الملحين ، كما و تركت إحدى المعاملات بدون إضافة أملاح معدنية لغرض المقارنة .

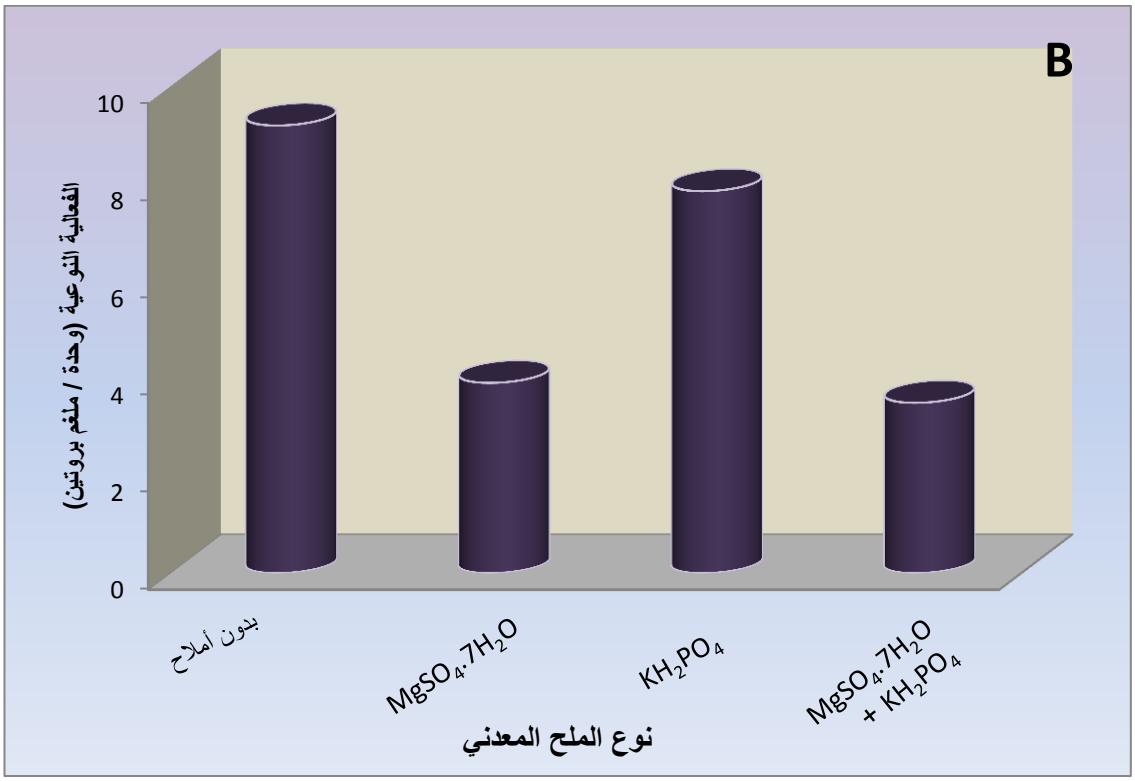
يظهرمن الشكل 9 إن لإستخدام الملحين معاً تأثيراً تثبيطياً واضحاً في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز مقارنة بالمعاملة الخالية من الأملاح ، إذ بلغت الفعالية النوعية (609.2 و3.5) وحدة /ملغم بروتين ، على التوالي . بينما أظهرت المعاملة الخالية من الملحين المذكورين أعلى فعالية

نوعية إذ بلغت 1021.9 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم البروتييز و 9.2 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز.

إن توفر الأيونات المعدنية في وسط التخمر يعد أحد المتطلبات الضرورية لإنتاج الإنزيمات وثبوتية وإستقرار بعضها لكنها تختلف بالإعتماد على مصدر الإنزيم (Ire *et al.* ,2011) وعلى الرغم من وجود بعض الأحياء المجهرية المنتجة للإنزيمات الثابتة حرارياً إلا إن وجود بعض هذه الأيونات يزيد من الثبات الحراري للإنزيمات ويجعلها فعالة حتى عند درجات الحرارة العالية (Haq *et al.* ,2006) .

هناك العديد من الدراسات التي أوضحت الدور الفعال للأملاح المعدنية في إنتاج الإنزيمين من الفطريات ، فقد قام Gupta *et al.* (1992) بإنتاج الإنزيمات المحللة للكيوتكل من الفطر *B.bassiana* بإستخدام وسط زرعي يحوي كبريتات المغنيسيوم المائية 0.06 % و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين 1.5 % وكلوريد الصوديوم 0.05 % . كما أستخدمت كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وبتركيز (4 و5) غم / لتر في إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *B. brongniartii* (Erlacher *et al*., 2006) .





الشكل (9) : تأثير نوع الأملاح المعدنية في إنتاج إنزيمي : البروتييز (A) و الكايتينيز (B) من الفطر *B. bassiana*

وفي دراسة أخرى أشار Elad & Kapat (1999) إلى إستخدام كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين وبالتراكيز (0.3 و2 و6.9) غم / لتر ، على التوالي لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *T. harzianum* .

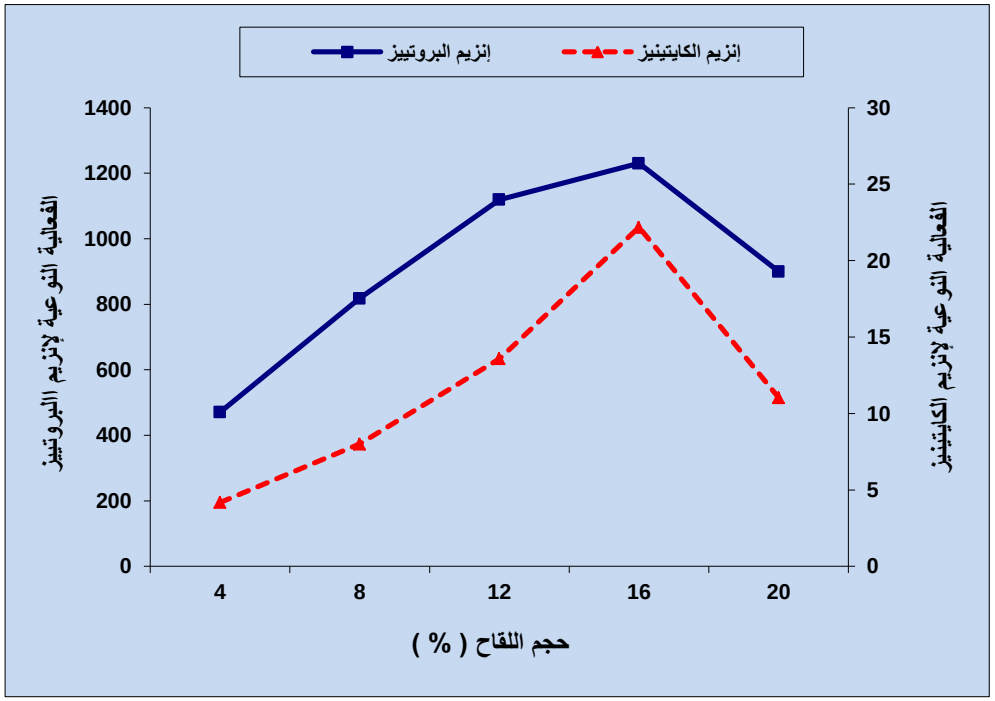
وقد أوضح Sassá *et al.* (2009) ضرورة وجود الأملاح في الوسط الإنتاجي لإنزيم الكايتينيز من الفطر *B.bassiana* والتي شملت كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و فوسفات الصوديوم الهيدروجينية إضافة إلى كلوريد البوتاسيوم وبالتراكيز (0.06 و0.036 و0.105 و0.1) % ، على التوالي . كما بينت حيدر (2011) ضرورة تدعيم الوسط لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. fertile* بـ 0.1 % من كل من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وكبريتات المغنيسيوم المائية .

7- تأثير حجم اللقاح :

لمعرفة تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. b*assiana تم تلقيح وسط الإنتاج بحجوم متدرجة من اللقاح (4 و 8 و 12 و 16 و20) % ، لوحظ زيادة تدريجية في إنتاج الإنزيمين مع زيادة أعداد الخلايا في كمية اللقاح المضافة إلى الوسط الزرعي حتى بلغت الفعالية النوعية أقصاها (1230.3 و22.2) وحدة / ملغم بروتين عند إضافة حجم لقاح مقداره 16% لإنزيمي البروتييز والكايتينيز ، على التوالي . إلا أنها إنخفضت بعد ذلك لتصل إلى (900.9 و11.04) وحدة /ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز ، على التوالي أيضاً عند إستخدام حجم لقاح 20 % وكما موضح في الشكل 10 .

إن حجم اللقاح العالي ليس بالضرورة أن يعطي حصيلة عالية من الإنزيم وإنما ينتج عنه فقدان الأوكسجين ونفاذ المواد الغذائية من الوسط الزرعي (Haritha *et al.* ,2011) كذلك فأن النمو السريع للمزرعة وتكتل الخلايا ممكن أن يؤدي إلى إنخفاض نسبة السكر والأوكسجين المستهلكين وبالتالي إنخفاض إنتاج الإنزيم (Muthulakshmi *et al.* ,2011) . فضلاً عن حالة التنافس لهذه الأعداد الكبيرة من الخلايا على تمثيل العناصر الغذائية الأساسية في الوسط وتغير الرقم

الهيدروجيني له والذي يؤثر سلباً في فعالية الإنزيم المنتج (سعود وآخرون، 2009) . وبالإعتماد على النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة تم إستخدام حجم لقاح 16 % لإنتاج الإنزيمين في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها .



الشكل (10) : تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر

B. bassiana

إن حجم اللقاح عامل حيوي مهم يحدد إنتاج الكتلة الحيوية خلال عملية التخمر (Murthy & Naidu ,2010) فقد أوضح Shankar *et al.*(2011) أن حجم اللقاح الأمثل لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *Beauveria* sp. هو 10% . بينما إستخدم Šimkovič *et al.* (2012) حجم لقاح مقداره 1×10^6 كونيديا / مل لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *T.atroviride* .

وأستخدم حجم لقاح مقداره 1×10^7 سبور/مل لإنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطرين *T.asperellum* و *Isaria fumosoroseae* (Silva *et al.* ,2011; Ali *et al.* ,2010a) .

في حين كان حجم اللقاح الأمثل لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *B. b*assiana هو 1 % (Sassá *et al.* ,2009) . وأستخدم Ike *et al.* (2006) حجم لقاح مقداره 10^6 كونيديا لكل 100 مل من وسط إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. reesie* PC-3-7 .

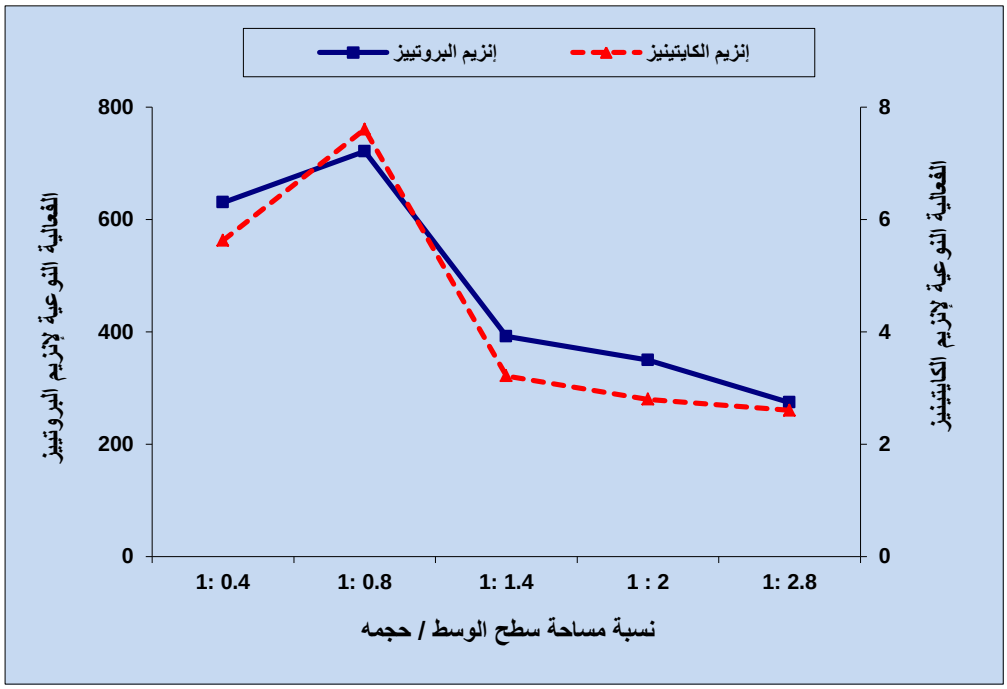
8- تأثير نسبة مساحة سطح الوسط إلى حجمه :

درس تأثير نسبة مساحة سطح الوسط إلى حجمه في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B.bassiana* حيث أستخدمت الحجوم المتدرجة (25 و50 و75 و100 و125) مل من الوسط الإنتاجي في دوارق زجاجية سعة 250 مل ولقحت بـ 16% من لقاح الفطر*B.bassiana*.

لوحظ من خلال النتائج المبينة في الشكل 11 أن أعلى إنتاج من الإنزيمين كان بإستخدام حجم وسط مقداره 50 مل والذي يعادل نسبة مساحة سطح إلى حجم مقدارها (0.86 : 1) ، إذ بلغت الفعالية النوعية أقصاها لإنزيمي البروتييز والكايتينيز (721.24 و7.16) وحدة /ملغم بروتين ، على التوالي . كما يلاحظ إنخفاض في إنتاج الإنزيمين عند إستخدام حجوم أعلى من وسط التخمر ، ويمكن أن يعزى ذلك إلى أن زيادة حجم الوسط يؤدي إلى نقصان الأوكسجين في الدورق الهزاز وإنخفاض كل من سرعة الرج وإعادة الدوران لمكونات الوسط والتي بالمقابل ينتج عنها قلة توفر المواد الغذائية التي تحتاجها الأحياء المجهرية ، وتحت ظروف التهوية والرج الغير صحيحة لا يتحقق التجانس المطلوب

في الوسط الزرعي والذي يعد عاملاً يعيق نمو الأحياء المجهرية والتصنيع الحيوي للإنزيم (; Haq *et al.* ,2008 Mukhtar & Haq ,2007) .

وإعتماداً على هذه النتيجة تم إستخدام 50 مل من وسط التخمر في كافة التجارب اللاحقة . وتتفق هذه النتيجة مع ما إستخدمه Shankar *et al.*(2011) الذي ذكر أن حجم الوسط 50 مل قد أعطى أعلى إنتاج لإنزيم البروتييز من الفطر *Beauveria* sp. . كما تم إستخدام حجم الوسط ذاته لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *T. harzianum* (Elad & Kapat ,1999) .



الشكل (11) : تأثير نسبة مساحة سطح الوسط / حجمه في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana*

بينما إستخدم Donatii *et al.* (2008) حجم وسط مقداره 20 مل لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *B.bassiana* . وقد أدى إستخدام حجم وسط مقداره 100 مل إلى زيادة في إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطريات *M.anisoplea* و *M. Flavoridie* و *B.bassiana* (St. Leger *et al.* ,1996) ، وإنتاج الإنزيم نفسه من الفطر *T.virens* UKM1 (Abd-Aziz

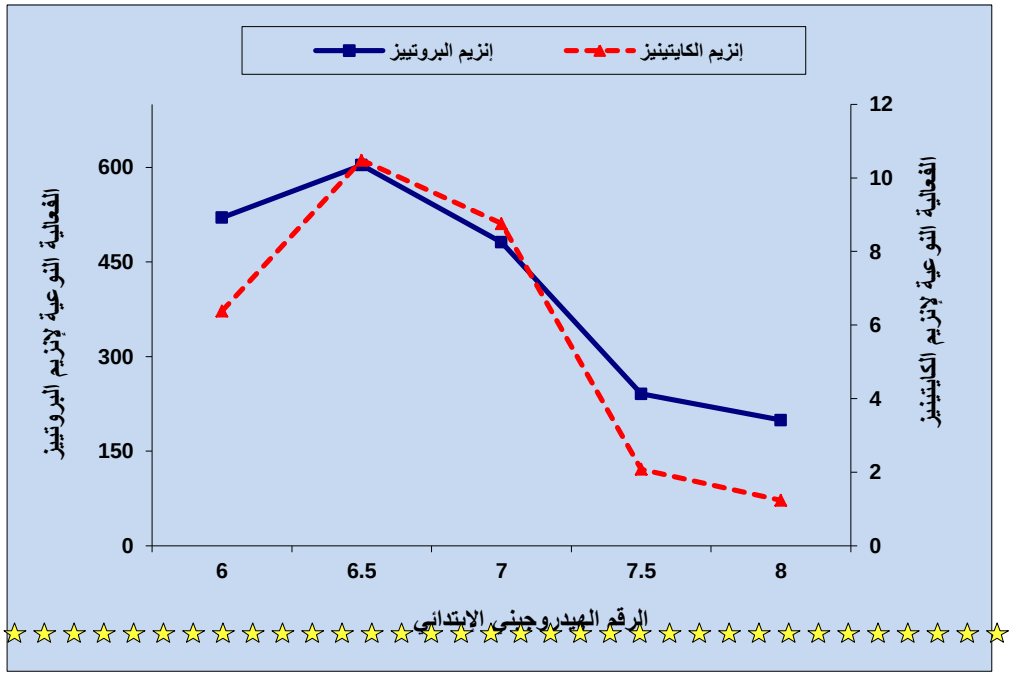
2008, *et al.*) . وتحقق أعلى إنتاج لإنزيم الكايتينيز من الفطر *Verticillium lecanii* بإستخدام حجم وسط 200 مل (Liu *et al.* ,2003) .

إن لحجم وسط التخمر أهمية في إنتاج الإنزيم إذ يؤثر في نمو الكائن المجهري وإنتاج الإنزيم من خلال تأثيره في سرعة الرج والتهوية للوسط الزرعي ، وإن درجة الأختلاف في سرعة الرج والتهوية في الحجوم الصغيرة من وسط التخمر مقارنة مع الحجوم الكبيرة هو أحد أسباب الإختلافات في إنتاج الإنزيم (Mukhtar & Haq ,2007) .

9- تأثير الرقم الهيدروجيني الإبتدائي :

إن تأثير الرقم الهيدروجيني الإبتدائي في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B.bassiana* موضح في الشكل 12 إذ يلاحظ أن الفطر قادر على إنتاج الإنزيمين بشكل أفضل في مدى رقم هيدروجيني (6 - 7) بيد أن أعلى إنتاج ولكلا الإنزيمين تحقق عند الرقم الهيدروجيني 6.5 حيث بلغت الفعالية النوعية لإنزيمي البروتييز والكايتينيز (603.3 و10.48) وحدة / ملغم بروتين ، على التوالي .

وبناءً على ما تقدم من نتائج فقد تم تعديل الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج إلى 6.5 في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها . كما يلاحظ بأن الفعالية النوعية أخذت بالإنخفاض تدريجياً حتى وصلت أوطأ قيمة لها عند الرقم الهيدروجيني 8.0 إذ بلغت (199.2 و1.23) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي البروتييز والكايتينيز، على التوالي .



الشكل (12) : تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيمي البروتييز والكايتينيز من الفطر *B. bassiana*

إن إنتاج الإنزيمات بوساطة الأحياء المجهرية يعتمد بشكل كبير على الرقم الهيدروجيني الإبتدائي للوسط الزرعي لكونه يؤثر على العديد من العمليات الإنزيمية ونقل مركبات مختلفة عبر الغشاء الخلوي والذي بالمقابل يدعم نمو الخلية وإنتاج الإنزيم (Akujobi *et al.*, 2012) .

إن القيمة المستحصلة من هذه الدراسة لا تتفق مع ما ذكره Erlacher *et al.* (2006) الذي إستخدم وسط زرعي برقم هيدروجيني إبتدائي 4 لإنتاج إنزيم البروتييز من الفطر *B.brongniartii* . بينما أوضح Wang *et al.* (2009) و Dienes *et al.* (2007) أن إنتاج إنزيم البروتييز من الفطرين *Hirsutella rhossiliensis* و*T.reesei* QM9414 ، على التوالي قد تم بتعديل الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط إلى 6 . كما أستخدم الرقم الهيدروجيني ذاته من قبل St. Leger *et al.* (1996) لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطريات *M.anisoplea* و *M. Flavoridie* و *B.bassiana* .

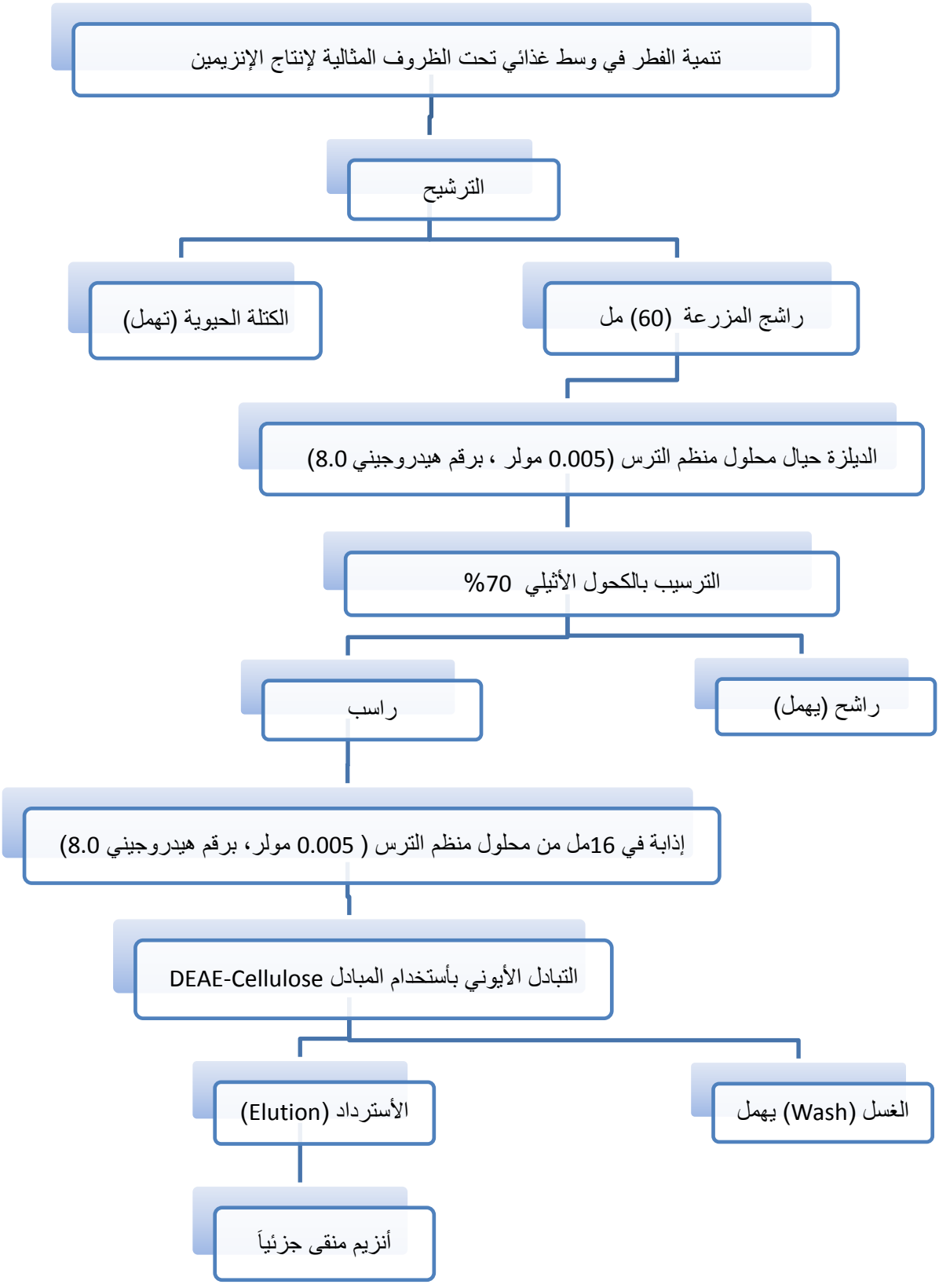
أما Sharaf (2005) فقد أثبتت أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Alternaria alternate* هو 5 . كما استخدم الرقم الهيدروجيني 5.5 لوسط إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T.virens* UKM1 (Abd-Aziz *et al.*, 2008) .

3-2 التنقية الجزئية لإنزيم البروتييز :

تم إنتاج 60 مل من إنزيم البروتييز وذلك بتنمية الفطر *B. bassiana* في وسط الإنتاج المكون من خميرة الخبز 1.5 % والمدعم ب 0.3 % من كبريتات الأمونيوم و تحت الظروف المثالية للإنتاج التي تم تحديدها من خلال التجارب السابقة ، لغرض استخدامه في تنقية الإنزيم .

خطوات التنقية :

جرت جميع خطوات تنقية الإنزيم تحت ظروف مبردة ، و يلخص المخطط 2 خطوات التنقية الجزئية لإنزيم البروتييز المنتج من الفطر *B. bassiana* .



مخطط (2) : تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *B.bassiana*

1- الديلزة :

أجريت عملية الديلزة للمستخلص الإنزيمي الخام حيال محلول منظم الترس (0.005 مولر برقم هيدروجيني 8.0) و لمدة 6 ساعات و عند درجة حرارة 4 مْ . و قد حققت هذه الخطوة تنقية جزئية لإنزيم البروتييز ، إذ بلغت عدد مرات التنقية 1.108 مرة وبحصيلة إنزيمية 91.29 % وكما موضح في (الجدول 1) .

تستخدم الديلزة لفصل البروتينات وذلك بالإعتماد على القوى الأوزموزية بين سائلين إذ تعمل على إزالة الجزيئات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة ، كما تعمل في الوقت نفسه على موازنة النموذج في محلول منظَم جديد ، فضلاً عن كونها طريقة لتركيز المحاليل المخففة (Ali *et al.* ,2010 b) .

أستخدمت الديلزة كأحدى خطوات تنقية إنزيم البروتييز من أحياء مجهرية مختلفة في دراسات عدة ، فقد إستخدمها Devi *et al.* (2008) كخطوة ثانية في تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Aspergillus niger* حيث بلغت عدد مرات التنقية 11.21مرة والحصيلة 57.92% .

كما أستخدمت من قبل RaviKumar *et al.* (2012) في تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Pleurotus sajor-caju* إذ تم الحصول على عدد مرات تنقية 1.08 مرة وبحصيلة إنزيمية 73.33 % .

وكانت الديلزة إحدى خطوات تنقية البروتييز القاعدي من الفطر *Penicillium expansum* بعدد مرات تنقية 8.1 مرة و حصيلة إنزيمية بلغت 87.09 % (Dahot ,1994) . وبلغت عدد مرات التنقية 2.53 مرة والحصيلة الإنزيمية 3.72 % في خطوة الديلزة المستخدمة لتنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Aspergillus flavus* (Muthulakshmi *et al.* ,2011) .

2- الترسيب بالكحول الأثيلي :

تم إستخدام الكحول الأثيلي المبرد لترسيب الإنزيمين بعد خطوة الديلزة . ولمعرفة التركيز الأفضل لترسيب الإنزيم أجريت تجربة أولية أستخدم فيها الكحول الأثيلي بنسب مختلفة تراوحت بين (20-

80)% وأظهرت النتائج أن 70 % هو التركيز الأمثل لترسيب إنزيم البروتييز وحققت هذه الخطوة تنقية جزئية لإنزيم البروتييز بعدد مرات تنقية مقدارها 1.728 مرة و حصيلة إنزيمية مقدارها 41.47 % و كما هو موضح في (جدول 1) .

يجري عادة تركيز الإنزيمات باستخدام الترسيب بالمذيبات العضوية مثل الإيثانول و الأسيتون حيث تؤثر تلك المذيبات في ذوبانية الإنزيمات بسبب خفض ثابت العزل الكهربائي (dielectric constant) للوسط حيث يتغير تأثير الإذابة لجزيئات الماء المحيطة بالإنزيم مما يؤدي إلى زيادة التداخل بين جزيئات البروتين وبالتالي تكتلها ثم ترسبها . ولأنه من الممكن أن يفقد الإنزيم فعاليته بسهولة بهذه المذيبات فقد وجبت السيطرة على تركيز المذيب ودرجة الحرارة . ويعتمد الترسيب على : 1- وقت المزج والذي يؤثر على تكوين التكتلات (Agglomerate) والفعالية الإنزيمية . 2- قوى القص (Shear forces) ئالمتولدة بواسطة المزج (Stirring) والتي تؤثر أيضاً على تكوين التكتلات (Agglomerate) (Aehle ,2004) .

جدول (1) : خطوات تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *B. bassiana*

خطوة التنقية	الحجم (مليلتر)	الفعالية (وحدة/مليلتر)	تركيز البروتين (ملغم/مليلتر)	الفعالية النوعية (وحدة/ ملغم بروتين)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة (%)
المستخلص الإنزيمي الخام	60	22	0.025	880	1320	1	100
الديلزة	61.8	19.5	0.020	975	1205.1	1.108	91.29
الترسيب بالكحول الأثيلي 70%	30	18.25	0.012	1520.83	547.5	1.728	41.47
التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose	41	5.25	0.0028	1875	215.25	2.13	16.3

أستخدمت طرائق الترسيب بالأملاح والمذيبات العضوية في تنقية إنزيم البروتييز من الفطريات المستخدمة في السيطرة الحيوية ، فقد قام Shankar *et al.* (2011) باستخدام الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسب إشباع (40- 70) % لتنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Beauveria* sp. وكانت الحصيلة الإنزيمية 69.5 % وعدد مرات تنقية 1.5 مرة .

في حين إستخدم Zanphorlin *et al.* (2011) الترسيب بالكحول الأثيلي كخطوة أولى في تنقية إنزيم البروتييز السيريني القاعدي من الفطر *Myceliophthora* sp. بعدد مرات تنقية 1.6 مرة وحصيلة إنزيمية 79.5 % .

وتمت تنقية إنزيم البروتييز المتعادل من الفطر *Hirsutella rhossiliensis.* بإستخدام كبريتات الأمونيوم 80 % كخطوة أولى في التنقية بعدد مرات تنقية 3.1 مرة وبحصيلة إنزيمية 51 % (Wang *et al.* ,2007; 2009) .

وإستخدم Namasivayam *et al.* (2010) الترسيب بكبريتات الأمونيوم 80 % لدى تنقيته لإنزيم البروتييز من الفطر *B.bassiana* .

كذلك تمت تنقية إنزيم البروتييز من الفطريات *Talaromyces flavus* و *T.harzianum* باستخدام كبريتات الامونيوم وتم الحصول على عدد مرات تنقية (3.8 و2.5) مرة وبحصيلة إنزيمية (68.1 و55.2) % ، على التوالي (Haggag *et al.* ,2006) .

3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني :

مرَر الإنزيم المنقى جزئياً الناتج من الخطوة السابقة في عمود التبادل الأيوني بإستخدام الهلام DEAE-Cellulose وبوجود محلول منظم الترس (0.005 مولر و برقم هيدروجيني8.0) حيث ظهرت قمم عدة عند قراءة الإمتصاص على الطول الموجي 280 نانوميتر في مرحلة الإسترداد والتي تمت بإستخدام المحلول المنظم ذاته و بوجود تدرج ملحي (0.0-0.3) مولر من كلوريد الصوديوم وكما مبين في (الشكل 13) .

وعند إجراء إختبار فعالية الإنزيم في القمم المذكورة ، سجلت الفعالية الإنزيمية في القمة البروتينية الواقعة في الأجزاء (34–49) (الشكل 13) . لذا فقد تم تقدير الفعالية الإنزيمية في الأجزاء التابعة للقمة الحاوية على فعالية إنزيم البروتييز ، كما جمعت الأنابيب الخاصة بهذه القمة ومزجها و حساب حجمها و تقدير الفعالية الإنزيمية و البروتين لغرض إستخراج الفعالية النوعية للإنزيم والتي بلغت 1875 وحدة / ملغم بروتين مقارنة مع الفعالية النوعية للراشح الإنزيمي الخام 880 وحدة / ملغم بروتين (جدول 1) . ولكون الإنزيم إرتبط بالمبادل في ظروف الفصل المستخدمة لذا فهو يحمل شحنة سالبة ، وتشير النتائج المدرجة في الجدول 1 إلى إن عدد مرات التنقية للإنزيم بلغت 2.13 مرة و الحصيلة الإنزيمية 16.3 % .

أستخدمت كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادلات الأيونية الموجبة في العديد من دراسات تنقية إنزيم البروتييز من الفطريات ، فقد استخدم Shankar *et al.* (2011) المبادل DEAE-Cellulose في تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *Beauveria* sp. و كان عدد مرات التنقية المستحصلة من هذه الخطوة 10.02 مرة بحصيلة إنزيمية 38.6 % . كما أستخدم المبادل المذكور في خطوات تنقية إنزيم البروتييز من الفطريات *Neurospora crassa* و *Penicillium janthinellum* بعدد مرات تنقية (3.1 و9.3) مرة ، على التوالي وبحصيلة إنزيمية (76 و28) % ، على التوالي أيضاً (Abirami *et al.* ,2011) .

كما وتمت تنقية إنزيم البروتييز القاعدي من الفطر *Trichoderma viride* باستخدام المبادل DEAE- Sephadex A-50 وكانت الحصيلة الإنزيمية بعد إجراء التنقية تتراوح بين (20–30)% . (Šimkovič *et al.* ,2008)

وأستخدم Erlacher *et al.* (2006) المبادل الكاتأيوني في تنقية إنزيم البروتييز من الفطر *B.brongriartii* وبلغت عدد مرات التنقية 6.3 مرة .

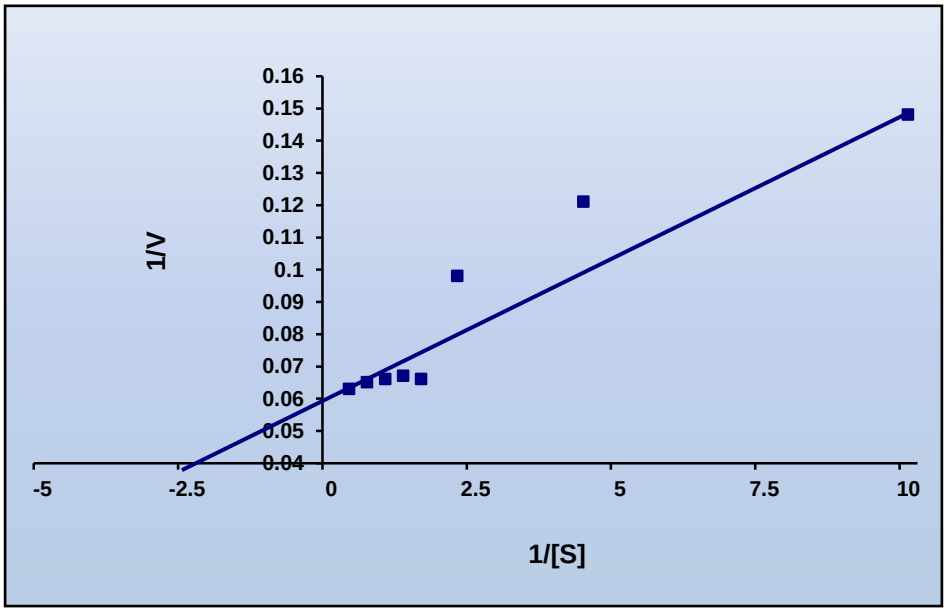
في حين أستخدم المبادل الأيوني السالب CM-Cellulose في تنقية إنزيم البروتييز القاعدي من الفطر *Aspergillus tamari* بعدد مرات تنقية 26 مرة وبحصيلة إنزيمية مقدارها 50% (Sharma & De ,2011) .

3-3 توصيف إنزيم البروتييز :

أستخدم المستخلص الإنزيمي المتحصل عليه من خطوة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني في دراسة بعض الصفات المهمة لإنزيم البروتييز .

1- الثوابت الحركية [ثابت ميكالس (K_m) و السرعة القصوى (V_{max})] :

أستخدمت طريقة لاينويفر-بورك لتقدير ثابت ميكالس و السرعة القصوى لإنزيم البروتييز بإستخدام مادة التفاعل الكازائين (Casein) و بتراكيز تراوحت بين (0.05-5) % . يتضح من خلال النتائج أن قيمة ثابت ميكالس لإنزيم البروتييز بلغت 4.34 ملغم/ مل بينما بلغت قيمة السرعة القصوى 16.13 ملغم / مل . دقيقة ، (الشكل 14).



الشكل (14) : منحنى لاينويفر-بورك لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana* بإستخدام الكازائين مادة تفاعل.

يعد ثابت ميكالس خاصية مهمة للتفاعلات المحفزة بالإنزيمات ، إذ يعد مقياساً لتركيز مادة التفاعل المطلوبة لحدوث التحفيز بشكل جيد ، كذلك هو مقياس لألفة الإنزيم لمادة التفاعل فكلما كانت قيمة K_m واطئة كلما زادت ألفة الإنزيم لمادة تفاعله ، وتعتمد قيمة K_m والسرعة القصوى V_{max} على تركيز مادة التفاعل والظروف المحيطة مثل درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني والقوة الأيونية (Voet & Voet ,2010). إن قيمة ثابت ميكالس تتفاوت إلى حد كبير من إنزيم لآخر وللإنزيم نفسه مع مواد تفاعل مختلفة (Copeland ,2000) .

وفي دراسة قام بها Shankar *et al.* (2011) لتوصيف إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Beauveria* sp. وجد إن قيمة K_m بلغت 5.1 ملغم/ مل و قيمة V_{max} تساوي 29.67 وحدة / مل وبإستخدام الكازائين كمادة تفاعل . وبإستخدام مادة التفاعل ذاتها بلغت قيمة K_m 3.0 ملغم/ مل و قيمة V_{max} 715 ملغم / مل . دقيقة لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Aspergillus oryzae* (Murthy & Naidu ,2010) .

كما أستخدمت مواد التفاعل المصنعة في تحديد الثوابت الحركية لإنزيم البروتييز ، فقد بلغت قيمة K_m 0.228 ملي مولر لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B.brongriartii* وبإستخدام الببتيد N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-$_p$NA كمادة تفاعل (Erlacher *et al.* ,2006).

وفي دراسة قام بها Zhao *et al.* (2005) وجد أن قيمة K_m لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Clonostachys rosea* بلغت 1.45 ملي مولر وبإستخدام الببتيد Suc-(Ala)$_2$-Pro-Phe-pNA كمادة التفاعل . وفي دراسة أخرى لتوصيف إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *T. harzianum* وجد Suarez *et al.* (2004) أن قيمة K_m تساوي 0.22 ملي مولر وبإستخدام الببتيد N-acetyl -Ile -Glu -Ala -Arg -$_p$NA كمادة تفاعل .

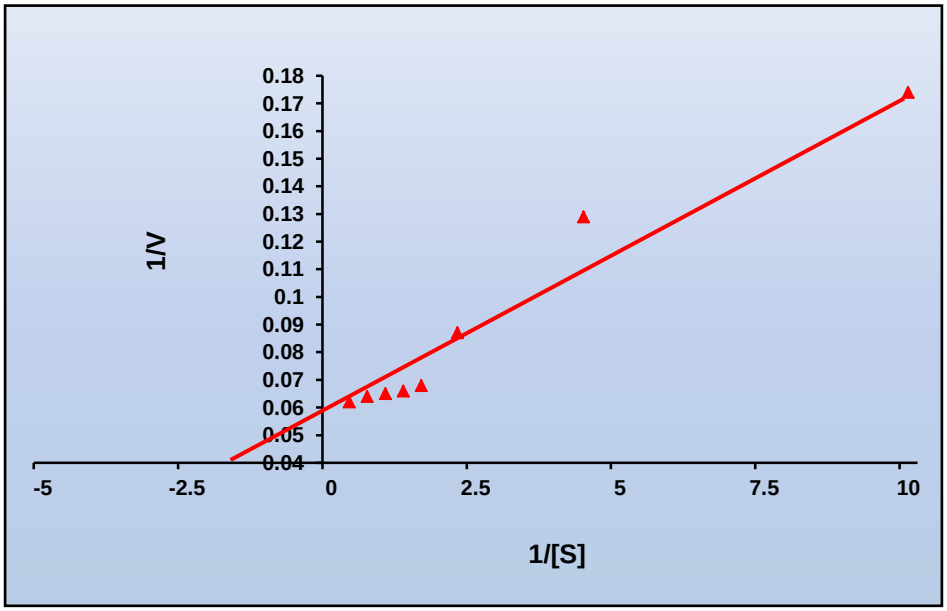
2- تخصص الإنزيم حيال مواد تفاعل مختلفة :

إن الميزة المهمة لإنزيم البروتييز القاعدي هو تخصصه الواسع حيال العديد من مواد التفاعل الصناعية والبروتينات الطبيعية (Gupta *et al.* ,2002) ، لذا تم التعرف على تخصص إنزيم

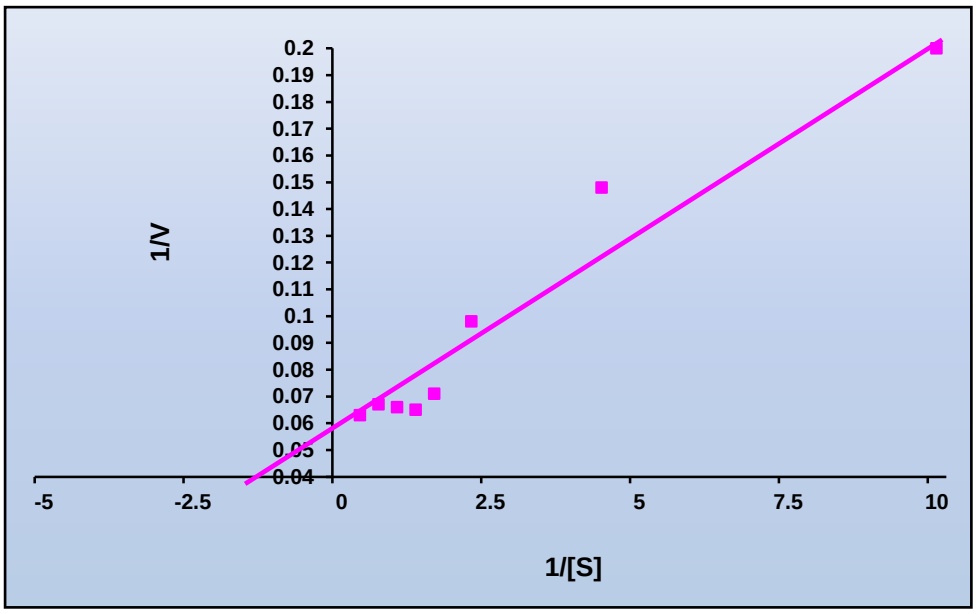
البروتييز المنقى من الفطر *B.bassiana* ودرجة ألفته حيال كل من الكازائين والجيلاتين والبومين المصل البقري والبومين البيض بإعتبارها مواد تفاعل يعمل عليها الإنزيم . كما تم تقدير الثوابت الحركية K_m و V_{max} بطريقة لاينويفر–بورك (الأشكال 14 و15 و16) . كما تم حساب نسبة السرعة القصوى إلى ثابت ميكالس V_{max} / K_m. أظهرت النتائج أن قيمة ثابت ميكالس كانت أقل بإستخدام الكازائين كمادة تفاعل مقارنة مع إستخدام الجيلاتين والبومين المصل البقري كمادتي تفاعل لإنزيم البروتييز ، إذ بلغت قيم K_m للإنزيم (4.34 و6.25 و6.66) ملغم/ مل حيال الكازائين والجيلاتين والبومين المصل البقري ، على التوالي . بينما بلغت قيم V_{max} (16.13 و16.66 و16.66) ملغم / مل دقيقة حيال البروتينات الثلاثة المذكورة ، على التوالي أيضاً .

وبلغت نسبة V_{max} / K_m لإنزيم البروتييز 3.72 حيال الكازائين و2.67 حيال الجيلاتين و2.51 حيال البومين المصل البقري ، (الجدول 2) .

يتبين من هذه النتائج أن الكازائين أفضل مادة تفاعل لإنزيم البروتييز قيد الدراسة مقارنة مع الجيلاتين والبومين المصل البقري . إن العلاقة بين سرعة التفاعل وتركيز مادة التفاعل تعتمد على ألفة الإنزيم لمادة تفاعله وهذا دائماً ما يعبر عنه بثابت ميكالس K_m للإنزيم (Ahmed *et al.* ,2011) .



الشكل (15) : منحنى لاينويفر–بورك لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana* باستخدام الجيلاتين مادة تفاعل.



الشكل (16) : منحنى لاينويفر–بورك لتقدير K_m و V_{max} لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana* باستخدام البومين المصل البقري مادة تفاعل.

كما قدرت الفعالية النسبية لإنزيم البروتييز حيال البروتينات المستخدمة في هذه الدراسة مقارنة مع الكازائين والذي تحسب فعاليته النسبية 100% . ويتضح من الجدول 3 أن لإنزيم البروتييز مقدرة أفضل لتحليل الكازائين مقارنة بمواد التفاعل الأخرى المستخدمة وتحت ظروف الإختبار نفسها ، إذ بلغت الفعالية النسبية لإنزيم البروتييز (91.9 و88.4 و86.5) % بإستخدام مواد التفاعل البومين البيض والجيلاتين والبومين المصل البقري ، على التوالي .

تتفق النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة مع ما توصلت إليه العديد من الدراسات السابقة ، فقد أظهر إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Beauveria* sp. أعلى فعالية نسبية حيال الكازائين كمادة

تفاعل حيث بلغت 100% مقارنة بالفعالية النسبية لكل من الهيموغلوبين والبومين المصل البقري والتي بلغت (47.38 و 5.06)% ، على التوالي (Shankar *et al.* ,2011) .

وفي دراسة أخرى قام بها Yang *et al.* (2007b) أوضح أن لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Arthrobotrys conoides* تخصصية عالية حيال الكازائين وبدرجة أقل حيال البومين المصل البقري والكولاجين الممسوخ . كما أشار Yang *et al.* (2005) إلى قابلية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Lacanicillium psalliotae* على تحليل مدى واسع من مواد التفاعل كان أفضلها الكازائين يليه البومين المصل البقري والجيلاتين والكولاجين ثم كيوتكل النيماتودا بفعالية نسبية (100 و 29 و20 و14 و12) % ، على التوالي .

بينما أظهرت دراسة أخرى أن إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Beauveria bassiana* F18 يبدى تخصصاً عالياً حيال بروتين الإيلاستين (Elastin) يليه الكازائين والبومين المصل البقري ، في حين سجلت أوطأ فعالية حيال بروتين الفايبرينوجين(Fibrinogin) والكلوبيولين (Globiolin) (Shimizu *et al.* ,1992) .

وتعتمد طبيعة التخصص هذه على عدد من العوامل المشتركة في إرتباط مادة التفاعل بالإنزيم وهذه العوامل تتضمن (فليح ، 1987):

1- تجاذب المجموعات المشحونة لمادة التفاعل مع تلك الموجودة في البروتين (الإنزيم) .

2- تداخل المجموعات الكارهة للماء مع تلك الموجودة في البروتين .

3- التآصر الهيدروجيني مع البروتين .

4- التداخل مع المجموعات المترابطة للبروتين .

جدول (2) : الثوابت الحركية لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B.bassiana* حيال مواد تفاعل مختلفة

مادة التفاعل	Km(ملغم / مل)	Vmax(ملغم/مل .دقيقة)	Vmax / Km
الكازائين	4.34	16.13	3.72

الجيلاتين	6.25	16.66	2.67
البومين المصل البقري	6.66	16.66	2.51

جدول (3)

: الفعالية النسبية لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B.bassiana* حيال بروتينات مختلفة

مادة التفاعل	الفعالية (وحدة / مل)	الفعالية النسبية %
الكازائين	18.575	100
البومين البيض	17.075	91.925
الجيلاتين	16.425	88.425
البومين المصل البقري	16.075	86.541

3- الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم :

درس تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيم البروتييز من الفطر *B. bassiana* . ويتضح من النتائج المبينة في الشكل 17 أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم قيد الدراسة بلغ 9.0 مما يشير إلى أن هذا البروتييز قاعدي Alkaline Protease .

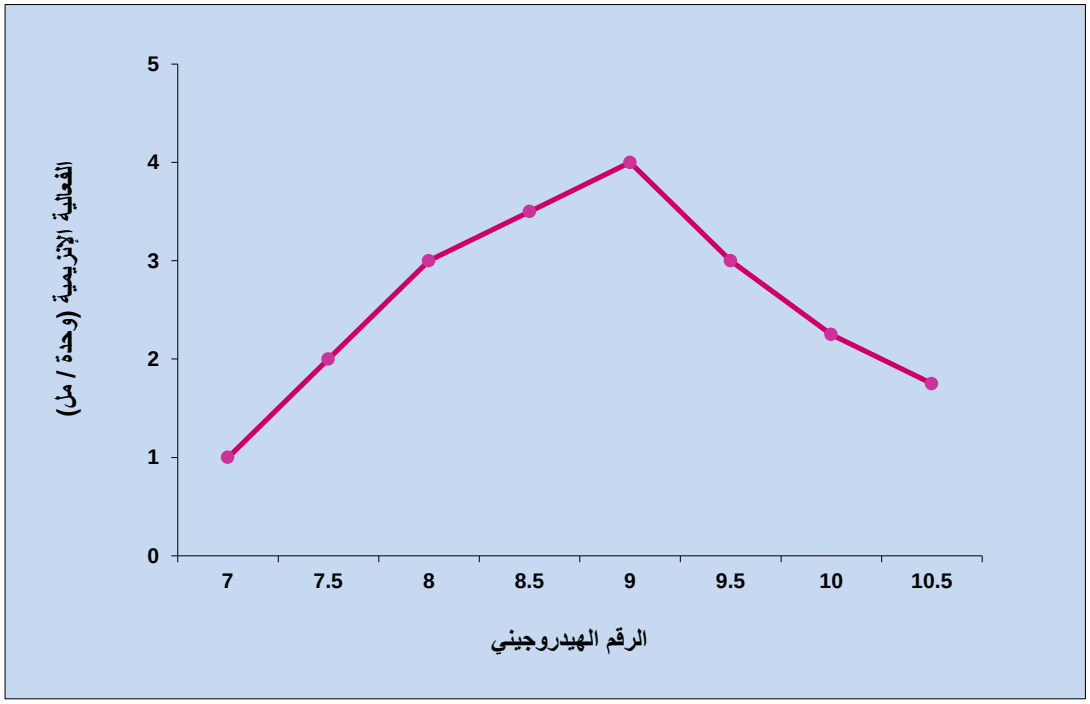
تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه Shankar *et al.* (2011) و Zanphorlin *et al.* (2011) اللذين ذكروا أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطرين *Beauveria* sp. و *Myceliophthora* sp. ، على التوالي هو (9.0) .

بينما وجد Bidochka & khachatourians (1987) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana* GK2016 هو 8.5 . وفي دراسة أخرى عن إنزيم

البروتييز المنقى من الفطر *B.brongriartii* إتضح أن الرقم الهيدروجيني 8.0 هو الأمثل لفعالية الإنزيم (Erlacher *et al.* ,2006) .

في حين ظهرت عند الرقم الهيدروجيني 7.0 أعلى فعالية لإنزيم البروتييز المنقى من الفطرين *Arthrobotrys coniode* و *Hirsutella rhossiliensis* (Wang *et al.* ,2007 ; Yang *et al.* ,2007b) ، على التوالي .

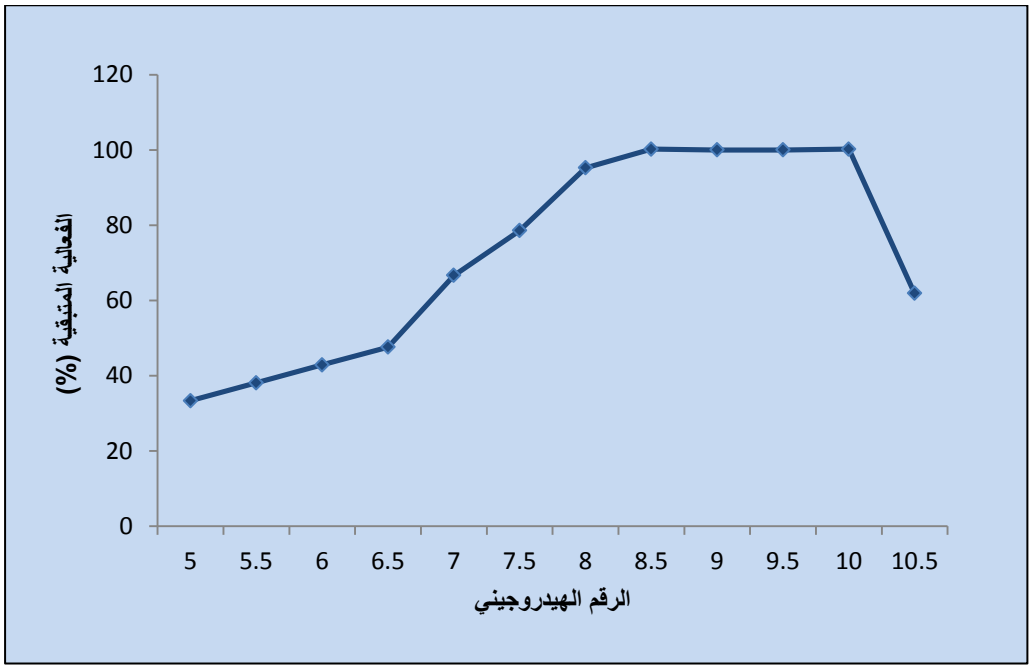
ويلاحظ من الشكل 17 أن الفعالية الإنزيمية تقل عند قيم pH أقل أو أكثر من قيمة الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم وسبب ذلك التأثير في ثمالات الأحماض الأمينية عند القيم الأعلى والأوطأ من الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية والتي يجب أن تكون في حالة معينة لكي يحدث التفاعل وهذا من شأنه أن يؤثر على إرتباط المادة الأساس بالإنزيم ، أضافة إلى تأثيراته على شحنة الإنزيم ومادة التفاعل أو كليهما أو إكتساب أو فقدان مجاميع مشحونة ستؤثر عكسياً على إرتباط مادة التفاعل بالإنزيم لذا سوف يعيق أو يبطل التحفيز (Yandri *et al.* ,2008 ; Murray ,2003) .



الشكل (17) : الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana*

4- الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم :

درس الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B. bassiana* ، إذ يعد هذا الرقم من الصفات المهمة في تحديد ظروف التنقية و خزن الإنزيم و يتضح من الشكل 18 أن الإنزيم يحتفظ بكامل فعاليته في مدى رقم الهيدروجيني يتراوح بين (8.0-10.0) كما يلاحظ أن الإنزيم احتفظ بـ 78.5 % من فعاليته عند الرقم الهيدروجيني 7.5 بعد حضنه لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 مْ ، و انخفضت الفعالية إلى 61.9 % عند الرقم الهيدروجيني 10.5 ، كذلك إنخفضت الفعالية الإنزيمية في الأرقام الهيدروجينية الحامضية ، إذ بلغت أدنى فعالية 33.3% عند الرقم الهيدروجيني 5.0 .



الشكل (18) : الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana*

وإعتماداً على هذه النتيجة فإن الإنزيم يعد ثابتاً نسبياً في الأرقام الهيدروجينية القاعدية والقريبة من التعادل إلا أنه غير ثابت في الظروف الحامضية والقاعدية المتطرفة ، ويعزى ذلك إلى التغيرات في شحنة المجاميع الأيونية الموجودة داخل الإنزيم وعلى سطحه (والتي لها دور مهم في وظيفة الإنزيم) وهذا سيؤثر على الشحنة الكلية للإنزيم والتي بدورها سوف تؤثر بشكل غير عكسي على التركيب الطبيعي للإنزيم (Bisswanger ,2008) .

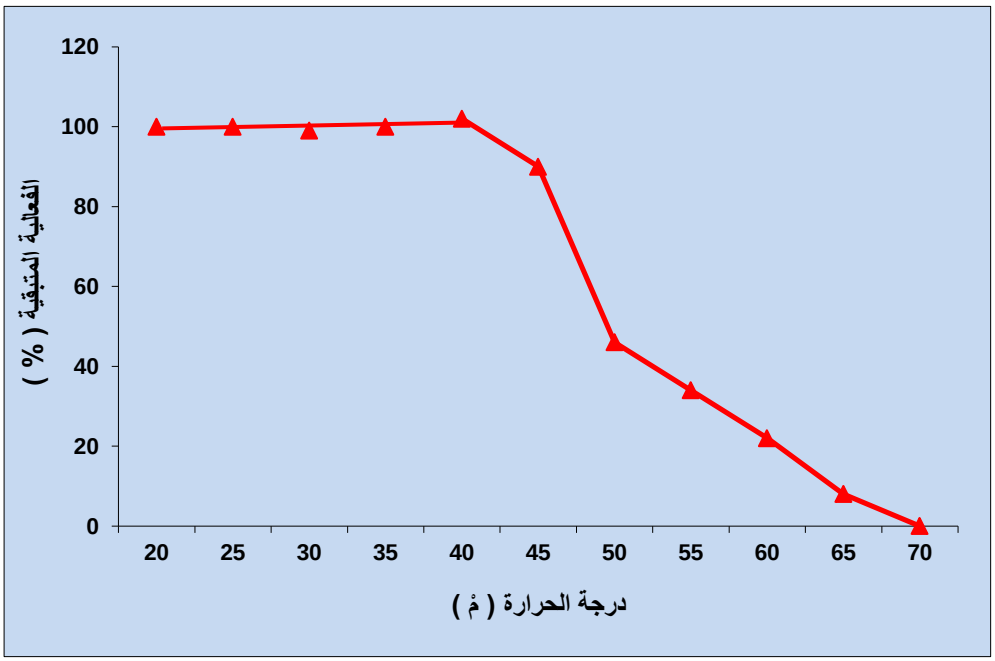
حصل Yang *et al.* (2005) على نتائج مشابهة حيث وجد أن إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Lacanicillium psalliotae* يبقى ثابتاً في ظروف قاعدية بمدى رقم هيدروجيني يتراوح بين (9–10) . كما وجد Kim (2003) بأن إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Aspergillus flavus* K-03 يكون ثابتاً ويحتفظ بـ 80 % من فعاليته بمدى رقم هيدروجيني يتراوح بين (8–11) بعد حضنه لمدة 24 ساعة . فضلاً عن ذلك فقد كان الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Hirsutella rhossiliensis* يقع ضمن المدى (5–6) عند حضنه لمدة 120 دقيقة ولكنه يحتفظ فقط بـ 20 % من فعاليته عند الرقمين الهيدروجينين 4 و7 عند حضنه لنفس المدة (Wang *et al.* ,2009) .

5–الثبات الحراري للإنزيم :

أظهرت نتائج حضن إنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B.bassiana* بدرجات حرارة تتراوح بين (20–70) مْ و لمدة 30 دقيقة ، أن الإنزيم احتفظ بكامل فعاليته بدرجات حرارة تراوحت بين (20–40) مْ (الشكل 19) ، وإحتفظ الإنزيم بحوالي 90 % من فعاليته الأصلية بدرجة حرارة 45 مْ ، إنخفضت بعدها الفعالية الإنزيمية بشكل ملحوظ بدرجة حرارة (50 و55) مْ ، و فقد الإنزيم 78 % من فعاليته بدرجة حرارة 60 مْ ، بينما فقدها تماماً عند درجة حرارة 70 %.

إن الحرارة العالية تزيد من الطاقة الحركية للتفاعل إلى الحد الذي يتجاوز الحاجز الطاقي لتمزيق الأواصر الغير تساهمية التي تحافظ على التركيب ثلاثي الأبعاد للإنزيم فتبدأ السلاسل متعددة الببتيد

بالإنفتاح والذي يرافقه فقدان سريع للفعالية الإنزيمية (Murray ,2003) . كذلك فأن الإنزيم يفقد خواصه التحفيزية عند درجات الحرارة العالية نتيجة تكسر الأواصر الهيدروجينية الضعيفة داخل تركيب الإنزيم (Muthulaksmi *et al.* ,2011) .



الشكل (19) : الثبات الحراري لإنزيم البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana*

و تتفق هذه النتيجة مع ما أشار إليه Shankar *et al.* (2011) من أن إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Beauveria* sp. يكون ثابتاً حرارياً عند درجة 30 مْ ويفقد 15% من فعاليته بدرجة حرارة 40 مْ بعد حضنه لمدة ساعة . بينما يمتلك إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Arthrobotrys coniode* ثباتاً حرارياً عند درجة حرارة (42–60) مْ بعد حضنه لمدة 20 دقيقة لكنه يثبط تماماً بدرجة حرارة 70 مْ (Yang *et al.* ,2007 b) . كذلك كان إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Monascus purpurcus* ثابتاً حرارياً لغاية درجة حرارة 40 مْ (Liang *et al.* ,2006) .

وفي دراسة الثبات الحراري لإنزيم البروتييز المنقى من الفطرين *Neurospora crassa* و *Penicillium Janthinellum* تبين أن الإنزيم كان ثابتاً حرارياً عند الحضن لمدة ثلاث ساعات عند درجات حرارة تراوحت بين (30–40) مْ (Abirami *et al.* ,2011) .

6- تأثير بعض أيونات المعادن و المواد الكيميائية في فعالية الإنزيم :

درس تأثير مثبطات مختلفة إضافة إلى بعض الأيونات الفلزية في فعالية إنزيم البروتييز والذي يساعد في تحديد طبيعة البروتييز المنقى جزئياً من الفطر *B. bassiana* .

وتشير النتائج المبينة في الجدول 4 إلى تباين تأثير الأيونات الفلزية في فعالية الإنزيم فقد كانت لأيونات الكالسيوم (Ca^{+2}) والمغنيسيوم (Mg^{+2}) تأثيراً حاثاً للإنزيم عند التركيز 5 ملي مولر ، إذ بلغت الفعالية المتبقية (174.67 و140.83) % ، على التوالي . يبدو إن لهذين الأيونين دوراً في تثبيت التركيب الفعال للإنزيم حيث تحمي البروتييز من المسخ الحراري (Thermal denaturation) لكنها ليست مطلوبة في العملية التحفيزية أو في إنطواء سلسلة البروتين التي تكوَن التركيب الفعال (Barata *et al.* ,2002 ; DoNascimento & Martins ,2004) .

كما يلاحظ أن الإنزيم يبقى ثابتاً ولم يكن هناك تأثير يذكر لأيونات المنغنيز (Mn^{+2}) في فعالية الإنزيم عند التركيز 1 ملي مولر ولكن بزيادة التركيز إلى 5 ملي مولر تنخفض الفعالية الإنزيمية إلى 87.34 % ، أما كلوريد النيكل وحامض البوريك فقد كان لهما تأثيراً تثبيطياً واضحاً في فعالية الإنزيم إذ بلغت الفعالية المتبقية بإستخدام التركيز 1 ملي مولر للمادتين المذكورتين (63.32 و 57.86) % ، على التوالي . وإنخفضت الفعالية إلى (52.4 و50.87) % ، على التوالي أيضاً عند زيادة التركيز إلى 5 ملي مولر .

ويبين الجدول 4 أن لأيونات الزئبق (Hg^{+2}) تأثيراً تثبيطياً قوياً في فعالية الإنزيم ويزداد التثبيط بزيادة التركيز حيث بلغت الفعالية المتبقية للإنزيم (49.13 و36.03) % بإستخدام التركيزين (1

و5) ملي مولر، على التوالي . كما هو معروف أن أيونات الزئبق تتفاعل مع مجاميع الثايول (Thiol groups) في البروتين وتحولها إلى Mercaptides ، بالإضافة إلى إنها تتفاعل مع ثمالات الأحماض الأمينية Histidine و Tryptophan ، علاوة على ذلك فان الروابط ثنائية الكبريت الموجودة في الإنزيم تتحطم بفعل أيون الزئبق(DoNascimento & Martins ,2004) .

جدول (4) : تأثير بعض الأيونات المعدنية و المواد الكيميائية في فعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B.bassiana*

الأيون أو المادة الكيميائية	التركيز (ملي مولر)	الفعالية (وحدة / مل)	الفعالية المتبقية (%)
إنزيم غير معامل	–	4.58	100
كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$)	1	7.07	154.37
	5	8	174.67
كلوريد المغنيسيوم ($MgCl_2$)	1	5. 2	113.54
	5	6.45	140.83
كلوريد المنغنيز ($MnCl_2$)	1	4.65	101.53
	5	4	87.34
كلوريد النيكل ($NiCl_2$)	1	2.9	63.32
	5	2.4	52.40
حامض البوريك (Boric acid)	1	2.33	57.86
	5	2.65	50.87
كلوريد الزئبق ($HgCl_2$)	1	2.25	49.13
	5	1.65	36.03
PMSF	1	0	0
	5	0	0
اثيلين ثنائي أمين رباعي	1	7.5	163.75

حامض الخليك (EDTA)	5	6. 83	144.13
Iodoacetamide (IAA)	1	4.5	98.25
	5	5.25	114.63
مركابتوايثانول (mercaptoethanol)	1	2.5	54.59
	5	3.08	67.25

أما فيما يتعلق بتأثير المثبطات المختلفة في فعالية الإنزيم فأن النتائج تشير إلى أن الإنزيم فقد فعاليته تماماً بوجود الـ PMSF (أحد مثبطات البروتييز السيريني) وبكلا التركيزين والذي يحدد طبيعة البروتييز ضمن مجموعة Serine Proteases ، حيث أنه يقوم ب Sulfonated للحامض الأميني السيرين Serine الموجود في الموقع الفعال للإنزيم وبالتالي ينتج عنه فقدان الفعالية بالكامل (Sharma & De ,2011) .

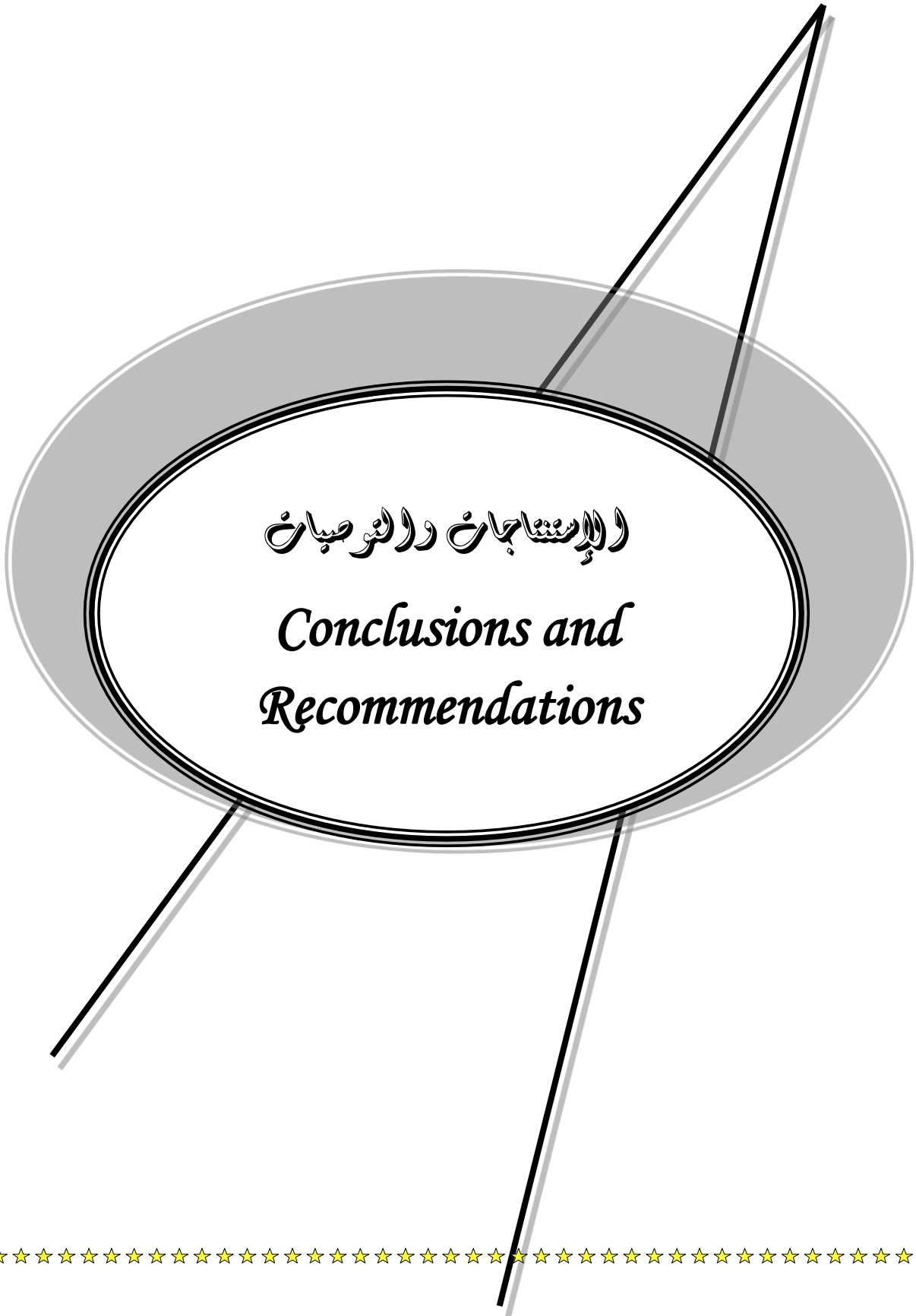
بينما هناك تأثيراً حاثاً بنسبة (63.75 و44.13)% في الفعالية الإنزيمية باستخدام التركيزين (1 و5) ملي مولر، على التوالي من الـ EDTA (أحد مثبطات البروتييز المعدني) مما يدل على أن الإنزيم قيد الدراسة ليس ضمن مجموعة Metallo-Proteases . وعند إستخدام 1 ملي مولر من الـIAA (أحد مثبطات بروتييز السيستاين Cystein Proteases) لم يؤثر في الإنزيم ، في حين إزدادت الفعالية المتبقية إلى 114.63 % بزيادة التركيز إلى 5 ملي مولر . كما يظهر الجدول (4) أن لمادة الـ Mercaptoethanol تأثيراً تثبيطياً واضحاً في فعالية إنزيم البروتييز إذ بلغت الفعالية المتبقية للإنزيم 54.59 % عند التركيز 1 ملي مولر و 67.25 % عند التركيز 5 ملي مولر .

جاءت هذه النتائج متفقة مع أغلب الدراسات السابقة ، حيث أثبت Shankar *et al*. (2011) أن لأيونات الزئبق(Hg^{+2}) تأثيراً تثبيطياً في فعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Beauveria* sp. إذ بلغت الفعالية المتبقية 63.16 % عند التركيز 10 ملي مولر ، بينما أدى إستخدام 1 ملي مولر من مادة الـ PMSF إلى تثبيط الفعالية بنسبة 97.75 % ، في حين لم يكن لمادتي الـ EDTA و IAA تأثيراً ملحوظاً في الفعالية .

وأشار Erlacher *et al*. (2006) إلى أن الفعالية المتبقية لإنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B.brongriartii* قد إزدادت بوجود أيونات الكالسيوم و المغنيسيوم بنسبة (34 و33) % ، على التوالي .

وبين Shimizu *et al*. (1992) لدى دراسته بعض خواص إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *B.bassiana* F18 أن الإنزيم يفقد فعاليته بشكل ملحوظ بوجود الـ PMSF عند التركيزين (5 و10) ملي مولر ، بينما لم يكن لمادتي الـ EDTA و IAA تأثيراً في الفعالية الإنزيمية .

و في دراسة أخرى قام بها Zanphorlin *et al*. (2011) لاحظ أن فعالية إنزيم البروتييز المنقى من الفطر *Myceliophthora* sp. قد ثبطت تماماً بوجود 5 ملي مولر من الـ PMSF في حين لم تتأثر الفعالية الإنزيمية بوجود الـ EDTA و IAA حيث بلغت الفعالية المتبقية للإنزيم (95 و100) % ، على التوالي .من ناحية أخرى فقد كان لأيونات المغنيسيوم تأثيراً حاثاً عند التركيز 5 ملي مولر إذ كانت الفعالية المتبقية للإنزيم 122.2% ، في حين كان أيون الزئبق مثبطاً قوياً إذ بلغت الفعالية المتبقية للإنزيم 33.3 % .


الإستنتاجات والتوصيات
Conclusions and
Recommendations

الاستنتاجات (Conclusions) :

1- إن إنزيمي البروتييز والكايتينيز هما عاملي الضراوة الرئيسين للفطر ***B.bassiana*** .

2- أظهر إنزيم البروتييز قيد الدراسة تخصصاً واسعاً حيال العديد من مواد التفاعل مما يشير إلى إمكانية إستخدامه في السيطرة الحيوية ضد أنواع مختلفة من الحشرات .

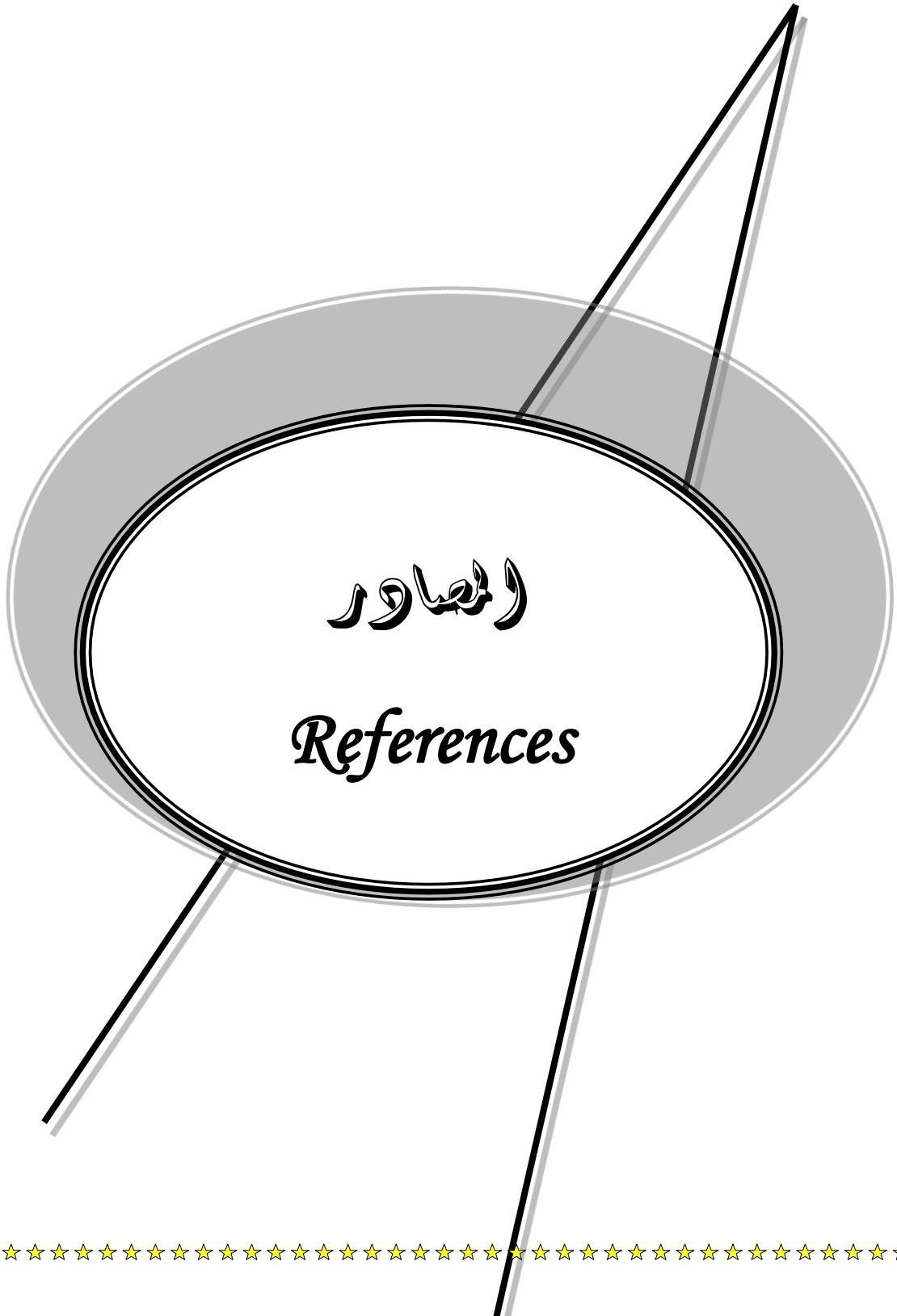
3- إمكانية إستخدام إنزيم البروتييز في السيطرة الحيوية ضد الحشرات التي تنتشر في فصلي الخريف والربيع ، ولا يمكن إستخدامه في فصل الصيف نظراً لقلة ثباته في درجات الحرارة العالية .

التوصيات (Recommendations) :

1- إستخدام الراشح الإنزيمي المنتج من الفطر ***B.bassiana*** في عملية تطبيقية ضد بعض الحشرات الإقتصادية والطبية .

2- تحسين إنتاج إنزيم البروتييز من الفطر ***B.bassiana*** بالطرائق الوراثية .

3- دراسة المواد الأيضية الأخرى المنتجة من الفطر (مثل السموم والأحماض العضوية) والتي لها دور في السيطرة الحيوية .


المصادر
References

المصادر العربية

) . الأحياء المجهرية الصناعية . 1989الحيدري، نظام كاظم والمصلح، رشيد محجوب . (الطبعة الأولى ، جامعة بغداد .

(Bals.) Vuil. *Beauveria*)). كفاءة الفطر2011العبيدي , شيماء حميد و سمير, صالح حسن.(*bassiana* في المكافحة الاحيائية لدودة ورق القطن (Boisd.) *Spodoptera littoralis*. مجلة . 82 -77. 1. العدد 29 وقاية النبات العربية . الحجم

كلوكانيز من 3−1). إنتاج وتوصيف إنزيمي الكايتينيز وبيتا2011حيدر،حوراء عباس .(المعزول محلياً . رسالة ماجستير/ كلية العلوم / جامعة كربلاء *Trichoderma fertile*الفطر .

). تحديد 2009سعود ،أسماء محمد وعزيز ، غازي منعم والخفاجي ،زهرة محمود .(المعزولة AG10 *Staphylococcus aureus*الظروف المثلى لإنتاج البروتييز من بكتريا 10-26.): 1 (8محلياً . المجلة العراقية للتقانات الحياتية

) . مدخل إلى الكيمياء الحياتية . وزارة التعليم العالي والبحث 1987فليح , خولة أحمد . (العلمي / جامعة الموصل .

References المصادر الأجنبية

- **Abd-Aziz, S. ; Sin, T.; Alitheen, N.; Shahab, N. & Kamaruddin, K.(2008).Microbial Degradation of Chitin Materials by *Trichoderma virens* UKM1 . Journal of Biological Sciences . 8(1): 52-59 .**

- **Abdul Rauf ; Irfan,M. ; Nadeem,M. ; Ahmed,I. & Iqbal,H. (2010). Optimization of Growth Conditions for Acidic Protease Production from *Rhizopus oligosporus* through Solid State Fermentation of Sunflower Meal. World Academy of Science , Engineering and Technology. 72.**

- **Abirami,V. ; Meenakshi,S. ; Kanthymathy,K. ; Bharathidasan,R.; Mahalingam,R. & Panneerselvam,A. (2011). Partial Purification and Characterization of an Extracellular Protease from *Penicillium janthinellum* and *Neurospora crassa*. European Journal of Experimental Biology.1(3):114-123.**

- **Abu Sayem, S. ; Alam,M. & Hoq ,M. (2006). Effect of temperature, pH and metal ions on the activety and stability of alkaline protease from novel *Bacillus licheniformis* MZK03.Proc. Pakistan Acad. Sci. 43(4):257- 262.**

- **Aehle, W. (2004) . Enzymes in industry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA,Weinheim.**

- **Agrawal, D. ; Patidar, P. ; Banerjee, T. & Patil, S. (2005). Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. Process Biochemistry. Vol.40. Issues3-4. pp. 1131–1136.**

- **Ahmed, I. ; Zia, M. & Iqpal, H. (2011). Purification and kinetic parameters characterization of an alkaline protease produced from *Bacillus subtilis* through submerged fermentation technique . World Applied Sciences Journal. 12(6): 751-757.**

- **Ahmed,S. ; Al-domany,A. ; El-shayeb,N. ; Radwan,H. & Saleh, S. (2008).Optimization, Immobilization of Extracellular Alkaline Protease and**

Characterization of its Enzymatic Properties. Research Journal of Agriculture & Biological Sciences.4(5):434-446.

- **Akcan, N.(2012). Production of extracellular protease in submerged fermentation by *Bacillus licheniformis* ATCC 12759. African Journal of Biotechnology . Vol.11(7):pp.1729-1735.**

- **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 .**

- **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.**

- **Ali,S. ; Huang,Z. & Ren,S. (2010a). Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as a biocontrol agent against diamondback moth. J. Pest. Sci. 83: 361–370.**

- **Ali,S. ; Ren,S. ; Huang,Z. & Wu,J. (2010b). Purification of enzymes related to host penetration and pathogenesis from entomopathogenic fungi.Current Research,Tecnology and Education Topics in Applied Microbiology and microbial Biotechnology .**

- **Alves, M. ; de Campos-Takaki, G. ; Okada, K. ; Pessoa, I. & Milanez,A. (2005). Detection of extracellular protease in *Mucor* species. Rev Iberoam Micol. 22:114-117.**

- **Ambethgar,V.(2009). Potential of entomopathogenic fungi in insecticide resistance management (IRM): A review. Journal of Biopesticides. 2(2): 177-193.**

- **Annamalai,N. ; Rajeswari,M. ; Vijayalakshmi,S. & Balasubra-manian,T.(2011) . Purification and characterization of chitinase from *Alcaligenes faecalis* AU02 by utilizing marine wastes and its antioxidant activity. Annals of Microbiology. 61(4): 801–807.**

- **Barata, R. ; Andrade, M.; Rodrigues,R. & Castro, I. (2002). Purification and characterization of an extracellular trypsina-like protease of *Fusarium oxysporum* var. lini. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 94. No. 4. pp. 304-308.**

- **Bhagya,L. ; Gurvinder,K. & Padmini.P. (2010). Isolation and purification of cuticle degrading extra cellular proteases from entomopathogenic fungal species of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. vol. 1. Issue-3.**

- **Bidochka, M. & Khachatourians, G.(1987). Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 53. No.7. p. 1679-1684.**

- **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.**

- **Bisswanger, H.(2008). Enzyme kinetics.Principles and Methods. 2nd edition. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA,Weinheim.**

- **Bradford, M. (1976) . A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding . Analytical Biochemistry , 72: 248-254 .**

- **Braga, G.; Destéfano, R. & Messias,C. (1999) . Protease production during growth and autolysis of submerged *Metarhizium anisopliae* cultures. Revista de Microbiologia. 30 : 107-113.**

- **Cagáň,L. & Švercel,M. (2001). The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fugus *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin to the European corn borer , *ostrinia nubilalis* HBN. (Lepidoptera:crambidae). Journal of Central European Agriculture .Vol.2.No.3-4.**

- **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.**

- **Campose, R. ; Boldo, J. ; Pimentel, I. ; Dalfovo, V. ; Araujo, W. ; Azevedo, J. ; Vainstein, M. & Barros,N. (2010). Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp. To control the bovine tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Genetics and Molecular Research .9(3):1421-1430.**

- **Chi, Z ; Ma, C. ; Wang, P. & Li, H. (2007). Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans* . Bioresource Technology .98: 534-538.**
- **Chutmanop, J.; Chuichulcherm, S.; Chisti, Y. & Srinophakun, P. (2008). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 83:1012–1018.**
- **Copeland, R. (2000). Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. Second Editionc. Wiley-VCH, Inc. New York.**
- **Cuervo-Parra,J. ; Ramírez-Suero,M. ; Sánchez-López,V. & Ramírez-Lepe,M. (2011) . Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* VSL291 on phytopathogenic fungi isolated from cocoa (*Theobroma cacao* L.) fruits. African Journal of Biotechnology . Vol. 10(52). pp. 10657-10663.**
- **Dahiya,N. ; Tewari,R. & Hoondal,G. (2006). Biotechnological aspect of chitinolytic enzymes: a review. Appi Microbial Biotechnol . 71:773-782.**
- **Dahot, M. (1994). Purification and some properties of alkaline protease from *Penicillium expansum.* Journal of Islamic Academy of Sciences. 7:2. 100-105.**
- **De Hoog, G. (1972). The genera *Beauveria* ,*Isaria, Tritirachium* and *Acrodontium* gen .nov. Studies in Mycology . No. 1: 1-41.**
- **De La Cruz, J. ; Pintor-Toro, J. ; Benitez, T. ; Llobell, A. and Romero, L. (1995a) . A Novel Endo-β-1,3-Glucanase, BGN13.1, Involved in the Mycoparasitism of *Trichoderma harzianum* .Journal of Bacteriology , 177(23): 6937-6945 .**
- **De Marco, J. & Felix, C. (2002) .Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease . BMC Biochemistry . 3: 3 .**
- **De Marco, J. ; Valadares-Inglis, M. & Felix, C. (2003) . production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa* , the causal agent of witches, broom of coca . Brazilian Journal of Microbiology. 34: 33-38 .**
- **Dennell, R. (1946). A study of an insect cuticle: the larval cuticle of *Sarcophaga falculata* Pand. (Diptera) . Biological Sciences. Vol. 133, No. 872 . pp. 348-373.**

- **Devi,M. ; Banu,A. ; Gnanaprabhal,G. ; Pradeep,B. & Palaniswamy, M.(2008). Purification , Characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. Indian Joyrnal of Science and Technology. Vol.1. No.7.**

- **Devi,P. ; Raghavan,P. ; Vasudheven,I. ; Joshua,L. & VijayaKumar, M. (2011). Purification and Characterization of Protease from *Rhizopus oligosporus*. International Journal of Biological Technology. 2(2): 46-49.**

- **Dhar,P. & Kaur,G. (2010 a). Production of cuticle-degrading proteases by *Beauveria bassiana* and their induction in different Media.African Journal of Biochemistry Research.Vol.4(3). pp.65-72.**

- **Dhar,P. & Kaur,G. (2010 b). Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Beauveria bassiana* isolates. African Journal of Biotechnology . Vol. 9(47) . pp. 8092-8099.**

- **Dias, B.; Neves, P.; Furlaneto-Maia, L. & Furlaneto,M. (2008). Cuticle - degrading proteases produced by the entomo-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. Brazilian Journal of Microbiology. 39: 301-306.**

- **Dienes, D. ; Börjesson, J. ; Hägglund, P. ; Tjerneld, F. ; Lidén, G. ; Réczey, K. & Stålbrand, H. (2007). Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. Enzyme and Microbial Technology. 40: 1087-1094.**

- **Do Nascimento,W. & Martins,M. (2004). Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian Journal of Microbiology . 35:91-96.**

- **Donatti, A.; Furlaneto-Maia, L.; Fungaro, M. & Furlaneto, M. (2008). Production and regulation of cuticle-degrading proteases from *Beauveria bassiana* in the presence of *Rhammatocerus schistocercoides* cuticle.Curr. Microbiol.56:256-260.**

- **Draganova, S. ; Pilarska ,D. ; Takov, D. & Doychev, D. (2011). Utilization of carbohydrates by *Beauveria bassiana* isolates obtained from forest pests. Journal of Plant Protection Research.Vol. 51. No. 4.**

- **Duo-Chuan, L. ; Chen, S. & Jing, L. (2005) . Purification and partial characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus *Talaromyces flavus* . Mycopathologia . 159: 223-229 .**

- **Dutta, P. ; Dutta, J. & Tripathi, V. (2004) . Chitin and chitosan : chemistry, properties and application . Journal of Scientific and Industrial Research . 63: 20-31 .**

- **Elad, Y. & Kapat, A. (1999) .The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. European Journal of Pathology . 105: 177-189 .**

- **Erlacher, A. ; Sousa, F. ; Schroeder, M. ; Jus, S. ; Kokol, V. ; Cavaco-Paulo, A. & Guebitz, G.(2006). A new cuticle scale hydrolysing protease from *Beauveria brongniartii*. Biotechnol Lett. 28:703–710.**

- **Ferracini-Santos,L. & Sato,H. (2009).Production of Alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans*. Brazilian Journal of Microbiology. 40:54-60.**

- **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.**

- **Ghanem, K. ; Al-Garni, S. & Al-Makishah, N. (2010) . Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus* . African Journal of Biotechnology . 9(32): 5135-5146 .**

- **Glare, T. ; Reay, S. ; Nelson,T. & Moore,R.(2008). *Beauveria caledonica* is a naturally occurring pathogen of forest beetles. Mycological Research. Vol.112.Issue. 3. pp. 352-360.**

- **Guangrong, H. ; Tiejing, Y. ; Po,H. & Jiaxing ,J.(2006). Purification and characterization of a protease from Thermophilic *Bacillus* strain HS08. African Journal of Biotechnology. Vol.5(24). pp. 2433-2438.**

- **Gupta, S. ; Leathers, T. ; El-Sayed, G. & Ignoffo, C. (1992). Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. Experimental Mycology. 16: 132-137.**

- **Gupta, S. ; Leathers, T. ; El-Sayed, G. & Ignoffo, C. (1994). Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infection of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia.* Journal of Invertebrate Pathology. 64: 13-17.**

- **Gupta,R. ; Beg,Q. ; Khan,S. & Chauhan,B.(2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. Appi Microbial Biotechnol. 60: 381-395.**

- **Haggag, W.; Kansoh, A. & Aly, A. (2006) . Proteases From *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum* : Purification , Characterization and Antifungal Activity Against Brown Spot Disease on Faba Bean. Plant Pathology. Bulletin. 15: 231-239 .**

- **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.**

- **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.**

- **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.**

- **Hartl,L. ; Zach,S. & Siedl-Seiboth,V.(2012).Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. Appl Microbiol Biotechnol.93:533-543.**

- **Hastuti,B. ; Glare,T. & Chapman,R. (1999).Effects of Temperature and Humidity on The Susceptibility of *Paropsis charybdis* to *Beauveria Bassiana*. Proc. 52nd N.Z. Plant Protection Conf. 103-107.**

- **Hattori, M. ; Isomura, S. ; Yokoyama, E. ; Ujita, M. & Hara, A.(2005).Extracellular trypsin-like proteases produced by *Cordyceps militaris.* Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 100. Issue (6). pp. 631–636.**

- **Holme , D. & Peck,H. (1998). Analytical Biochemistry .third edition. Prentice Hall.**

- **Ike, M.; Nagamatsu, K. ; Shioya, A. ; Nogawa,M. ; Ogasawara,W. ; Okada,H. & Morikawa,Y. (2006) . Purification, characterization, and gene cloning of 46 kDa chitinase (Chi46) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its expression in *Escherichia coli*. Appl. Microbial Biotechnol. 71: 294-303.**

- **Inglis,D. ; Goettel,M. ; Butt,T. & Strasser,H. (2001). Use of Hyphomycetous fungi for managing insect pest.In: Butt,T.M. ; Jackson,C.W. & Magan,N.(eds):Fungi as Biocontrol Agents-Progress Problems and Potential. CAB International, Wallingford. UK. pp. 23-69 . (Cited from Dhar & Kour , 2010b).**

- **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.**

- **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.**

- **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.**

- **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.**

- **Jayalakshmi, S. ; Raju, S. ; Usha, R.; Benagi, V. & Sreeramulu, K. (2009) . *Trichoderma harzianum* L1 as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* . Australian Journal of Crop Science . 3(1): 44-52 .**

- **Joseph,B. & Palaniyandi,S.(2011). Determination of Alkaline Protease production in *Serratia marcescens* Sp7 using Agro wastes as substrate medium , optimization of production parameters and purification of the enzyme. Word Academy of Science, Engineering and Technology. 74. pp. 252-256.**

- **Kang, S. ; Park, S. & Lee, D. (1999) . Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae* . Journal of Invertebrate Pathology. 73: 276-281.**
- **Khan,S. ; Guo,L. ; Maimaiti,Y. ; Mijit,M. & Qiu,D. (2012). Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent . Molecular Plant Breeding . Vol.3. No.7 .**

- **Kim, H.; Hoe, H.; Suh, D.; Kang, S.; Hwang, C. & Kwon, S. (1999). Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin I, an insect cuticle-degrading serine protease. Biotechnology Letters. 21: 777-783.**

- **Kim,J. (2003). Preliminary Characterization of Keratinolytic Enzyme of *Aspergillus flavus* K-03 and Its Potential in Biodegradation of Keratin Wastes. Mycobiology. 31(4): 209-213.**

- **Kim,J. & Jo,Y. (2010). A novel biopesticide production: attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 1639-1648.**

- **Koolman, J. & Roehm, K. (2005). Color Atlas of Biochemistry .2nd edition. Thieme Stuttgart · New York.**

- **Kooyman,C. ; Bateman,R. ; Langewald,J. ; Lomer,C. ; Ouambama, Z. & Thomas,M.(1997).Operational–scale application of entomo-pathogenic fungi for control of Sahelian grasshoppers. Proc.R.Soc. Lond.B 264.541-546.**

- **Krishna,V. ; Gupta,M. ; Gupta,N. ; Gaudani,H. ; Trivedi,S. ; Patil, P. ;Gupta, G. ; Khairnar,Y. ; Borasate,A. & Mishra,D. (2009). Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. International Journal of Microbiology Research. Vol.1. Issue.1. pp.14-18.**

- **Kuberan,T. ; Sangaralingam,S. & Arasu, V. (2010). Isolation and optimization of Protease producing Bacteria from Halophilic soil. Journal of Biosciences Research .1(3): 163-174.**

- **Kuddus, M. & Ramteke, P. (2011). Production optimization of an extracellular cold-active alkaline protease from *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 7528 and its application in detergent industry. African Journal of Microbiology Research . Vol. 5(7).pp.809-816.**

- **Kumar,C. & Takagi,H. (1999).Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint.Biotechnology Advances. 17.561-594.**

- **Lekimme, M. ; Focant,C. ; Farnir, F. ; Mignon,B. & Losson, B. (2008). Pathogenicity and thermotolerance of entomopathogenic fungi for the control of the scab mite , *Psoroptes ovis*. Exp Appl Acarol. 46:95-104.**

- **Liang,T. ; Lin,J. ; Yen,Y. ; Wang,C. & Wang,S.(2006).Purification and characterization of a protease extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. Enzyme and Microbial Technology.Vol. 38. Issues. 1-2. pp.74-80.**

- **Lineweaver, H. & Burk, D. (1934) . The determination of enzyme dissociation constants . J. Am. Chem. Soc. , 56: 658-666 .**

- **Liu, B. ; Kao,P. ; Tzeng,Y. & Feng,K. (2003) . Production of Chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. Enzyme and Microbial Technology. Vol. 33. Issue 4. pp. 410-415.**

- **Liu,Z.; Laing,Z.; Whalley,A.; Liu,A. & Yao,Y. (2001). A new species of *Beauveria*,the anamorph of *Cordyceps sobolifera* .Fungal Diversity. 7:61-70.**

- **Lopez-Mondejar,R. ; Blaya,J. ; Obiol,M. ; Ros,M. & Pascual,J. (2012). Evaluation of the effect of chitin-rich residues on the chitinolytic activity of *Trichoderma harzianum*: *In vitro* and greenhouse nursery experiments. Pesticide Biochemistry and Physiology. 103: 1-8.**

- **Mccoy, C. & Tigano-Milani, M. (1992). Use of entomo - pathagenic fungi in biological control : A world view . Pesq. Agropec. Bras. Brasflia.27: 87-93.**

- **Merheb-Dini, C. ; Cabral, H. ; Leite, R.; Zanphorlin, L. ; Okamoto, D.; Rodriguez, G.; Juliano, L. ; Arantes, E.; Gomes, E. & Da-Silva, R. (2009). Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. Journal Agricultural and Food Chemisty. 57(19): 9210-9217.**

- **Moreira, K. ; Porto, T. ; Teixeira, M.; Porto, A..& Filho, J. (2003). New alkaline protease from *Nocardiopsis* sp. : partial purification and characterization .Process Biochemistry .Vol. 39 . Issue.1. pp. 67- 72.**

- **Mukhtar, H.. & Haq. I.-U. (2007). Optimization of volume of fermentation medium for the production of alkaline protease by an EMS mutant strain of *Bacillus subtilis* IH-72. Pak. J. Bot. 39(7): 2705-2715.**

- **Murray,R. ; Granner,D. ; Mayes,P. & Rodwell,V. (2003). Harper's Illustrated Biochemistry. Twenty-sixth edition . Mc Graw-Hill companies , Inc.USA.**

- **Murthy,P. & Naidu,M. (2010). Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation Utilizing Coffee By-Products. World Applied Sciences Journal. 8(2):199-205.**

- **Mustafa,U. & Kaur,G. (2010). Studies on Extracellular Enzyme Prpduction in *Beauveria bassiana* Isolates. International Journal of Biotechnology and Biochemistry. Vol.6. No.5. pp.701-713.**

- **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.**

- **Namasivayam,S.; *Sivasubramanian*,S. & *Kumar*,G. (2010). Influence of media on protease production by *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. and stability**

towards commercially available detergents, surfactants and enzyme inhibitors. International Journal of Biological Technology .1(1) :78-83.

- Nampoothiri , K. ; Baiju, T. ; Sandhya, C. ; Sabu, A. ; Szakacs, G. & Pandey, A. (2004) . Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum* . Process Biochemistry . 39: 1583-1590 .

- Nevill,A. (1975). Biology of the Arthropod Cuticle. pp. 71-123. Springer-Verlag KG. Berlin.

- Nirmal,N.; Shankar,S. & Laxman,R. (2011). Fungal proteases :An Overview. Int. J. Biotech & Biosci. Vol. 1(1): pp.1-40 .

- Nunes,A.; Martins,J. ; Furlaneto,M. & Barros,N. (2010). Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis* . Ciência Rural. Santa Maria. Vol.40. No.9. pp. 1853-1859.

- Park,S. ; Lee,J. & Lee,H. (2000) . Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio* sp.98CJ11027. The Journal of Microbiology. 38(4) : 224-229.

- Patidar, P. ; Agrawal, D. ; Banerjee, T. & Patil, S. (2005). Chitinase production by *Beauveria feline* RD 101: optimization of parameters under solid substrate fermentation condition . Word Journal of Microbiology & Biotechnology. 21: 93-95.

- Pirali-Kheirabadi,K. ; Haddadzadeh, H. ; Razzaghi - Abyaneh, M. ; Zare,R. ; Ranjbar-Bahadori,S. ; Rahbari,S. ; Nabian,S. & Rezaeian,M. (2007).Preliminary study on virulence of some isolates of entomopathogenic fungi in different developmental stages of *Boophilus annulatus* in Iran. J.Vet.Res. 62 (4): 113-118.

- Prasad,A. & Syed, N. (2010). Evaluating Prospects of Fungal Biopestiside *Beauveria Bassiana* (Balsamo) Against *Helicoverpa Armigera* (Hubner): An Ecosafe Strategy for Pesticidal Pollution. Asian.J. Exp. Biol. Sci. Vol.1(3):596-601.

- Qadar ,S.; Shireen,E.; Iqbal,S. & Anwar,A. (2009). Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus* sp. PCSIR EA-3 .Indian Journal Biotechnology. Vol. 8. pp.286-290.

- 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.

- **Rao, Y. ; Lu, S. ; Liu, B. & Tzeng, Y. (2006). Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. Biochemical Engineering Journal. Vol. 28. Issue(1). pp. 57–66.**

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

- **Ravikumar,G.; Gomathi,D.; Kalaiselvi,M. & Uma ,C.(2012). A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju;* production, purification and partial characterization. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 1-6.**

- **Reddy, M.; Kumar,C.; Swathi,K. ; Nagamani,B.; Venkateshwar, S. & Rao, L. (2011). Extracellular alkaline protease production from isolated *Bacillus subtilis* SVR -70 by using submerged fermentation . International Journal of Pharma . Research & Development. Vol.3. pp.216-220.**

- **Rehner, S. & Buckley,E. (2003). Isolation and characterization of micosatellite 1oci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota : hypocreales). Molecular Ecology Notes . 3: 409-411.**
- **Rehner,S. & Buckley,E.(2005).A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-α Sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. Mycologia. 97(1): pp.84-98.**

- **Rehner,S.; Minnis,A.; Sung,G.; Laungsa-ard,J.; Devotte,L. & Humber,R. (2011). Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. Mycologia . 103 (5) : pp. 1055-1073.**

- **Roberts, D. (1989). World picture of biological control of insects by fungi .Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 84. Supl.III. 89-100.**
- **Roberts, D.; Gupta, S. & Leger, R. (1992). Metabolite production by entomopathogenic fungi . Pesq. Agropec. Bras. Brasflia . 27.325-347.**

- **Safavi,S. (2010). Isolation ,identification and pathogenicity assessment of a new isolate of entomopathogenic fugus , *Beauveria bassiana* in Iran.Journal of Plant Protection Research. Vol.50.No.2.**

- **Samson,R. & Evans,H. (1982).Two new *Beauveria* spp. From South America. Journal of Invertertebrate Pathology.Vol. 39. Issue1. pp.93-97.**

- **Sassá,D. ; Varéa-Pereira,G. ; Neves,P. & Garcia, J. (2009) . Genetic variation in a chitinase gene of *Beauveria bassiana* : lack of association between enzyme activity and virulence against *Hypothenemus hampei*. Journal of Entomology. 6(1) : 35-41.**

- **Saurabh, S.; Jasmine, I.; Pritesh, G. & Kumar, R. (2007). Enhanced productivity of serine alkaline protease by *Bacillus* sp. Using soybean as substrate. Malaysian Journal of Microbiology . Vol.3(1). pp.1 – 6.**

- **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 .**
- **Sevinc,N. & Demirkan, E. (2011). Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. J.Biol. Environ.Sci. 5(14): 95-103.**

- **Shankar, S. ; Rao, M. & Laxman, R. (2011), Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. .Process Biochemistry.Vol. 46. pp. 579-585.**

- **Sharaf, E. (2005) . A Potent Chitinolytic Activity of *Alternaria alternate* Isolated from Egyptian Blach Sand. Polish Journal of Microbiology. Vol. 54. No.2: 145-151 .**

- **Sharma, N. & De, k.(2011). Production, Purification and crystallization of an alkaline protease from *Aspergillus tamari* [EF661565.1]. Agric. Biol. J. N. Am. 2(7): 1135-1142.**

- **Shimizu, S.; Tsuchitani, Y. & Matusumoto, T. (1992). Purification and properties of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* . Journal of Sericultural Science of Japan. Vol. 61. No.5 : 421-428.**

- **Silva,B.; Ulhoa,C. ; Batista,K. ; Yamashita,F. & Fernandes, K . (2011). Potential Fungal Inhibition by Immobilized Hydrolytic Enzymes from *Trichoderma asperellum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59: 8148–8154.**

- **Šimkovič,M. ; Gdovinova´,A. ; Zemkova´,Z & Varecˇka,L. (2012). Properties of secreted protease from vegetative *Trichoderma atroviride* mycelia cultivated with protein inducer reveal a complex protein-recognition mechanism. Antonie van Leeuwenhoek. 101: 253–265.**

- **Šimkovič,M. ; Kurucová,A. ; Hunová,M. & Varečka, Ľ.(2008). Induction of secretion of extracellular proteases from *Trichoderma viride*. Acta Chimica Slovaca. Vol.1. No. 1: 250 – 264.**

- **Singh, C. (1999). Exocellular proteases of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration. Mycopathologia. Vol. 143. No.3. 147–150.**

- **Sirisha,S. ; Gurvinder, K . & Padmini,P. (2010). Strain improvement of entomopathogenig fungal species *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* by Protoplast Fusion. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology.Vol.1: Issue-3.**

- **Soares,F. ; Braga,F. ; Geniêr,H.; de Araújo,J. ; Ferreira,S. ; Araujo,J. ; Tavela,A. ; Vilela,V. & de Queiróz, J. (2010). Optimization of medium composition for protease production by *Paecilomyces marquandii* in solid-state fermentation using response surface methodology. African Journal of Microbiology Research. Vol. 4(24). pp. 2699-2703.**

- **Somkuti,G. & Babel, F. (1968). Purification and Properties of *Mucor Pusillus* Acid Protease. Journal of Bacteriology. Vol. 95. No . 4. p.1407-1414.**

- **Soroor, M.; El Hendawy,H.; Ghazy,A. ; El Semary,N. ; Khalil, K. & Abd El Aziz,A. (2009) .Characterization of an alkaline Metallo-protease secreted by The Entomopathogenic bacteria *Photorhabdus* sp.strain EK1. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 5(4) : 349-360 .**

- **Sosa-Gomez, D. ; Alves, S. & Milani, M. (1994). Characterization and Phenetic Analysis of Geographical Isolates of *Beauveria* spp. Pesq. Agropec. Bras. Brasilia. Vol. 29. No. 3. pp. 401-409.**

- **St. Leger, R.; Cooper,R. & Charnley, A. (1986). Cuticle- degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. Journal of General Microbiology. 132:1509–1517.**

- **St.Leger, R.; Joshi, L.; Bidochka, M.; Rizzo, N. & Roberts, D.W.(1996). Characterization and Ultrastructural Localization of Chitinases from *Metarhizium anisopliae* , *M.flavoviride* , and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca*) Cuticle. Applied and Environmental Microbiology.Vol. 62. No.3. pp. 907-912.**

- **Stawski, D.; Rabiej, S.; Herczynska,L. & Draczynski, Z. (2008). Thermogravimetric analysis of chitins of different origin. Journal Of Thermal Analysis and Calorimetry. Vol.93(2):489-494.**

- **Suarez, B. ; Rey, M. ; Castillo, P. ; Monte, E. & Llobell, A. (2004). Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematicidal activity. Appl. Microbiol Biotechnol. 65: 46–55.**
- **Suderman,R.; Dittmer,N.; Kanost,M. & Kramer,K. (2006). Model reaction for insect cuticle sclerotization : Cross - linking of recombinant cuticular protein upon their laccase – catalyzed oxidative conjugation with catechole. Insect Biochemistry and Molecular Biology . 36:353-365.**

- **Suderman,R.;Dittmer,N.; Kramer,K. & Kanost,M. (2010). Model reaction for insect cuticle sclerotization: participation of amino groups in the cross-linking of *manduca sexta* cuticle protein Ms CP36. Insect Biochemistry and Molecular Biology .40:252-258.**

- **Sudhakar,P. & Nagarajan,P.(2010).Production of Chitinase by Solid State Fermentation from Rice Bran. International Journal of Environmental Science and Development. Vol.1. No.5.**

- **Sumantha, A. ; Deepa,P.; Sandhya,C.; Szakacs,G.; Soccol, C . & Pandey, A.(2006 b). Rice Bran as Substrate for Proteolytic Enzyme Production . Brazilian Archives of Biology and Technology . Vol.49. No. 5. pp.843-851.**

- **Sumantha, A.; Larroche,C. & Pandey,A.(2006 a). Microbiology and Industrial Biotechnology of Food- Grade Proteases : A Perspective. Food Technol. Biotechnol. 44 (2): 211-220.**

- **Sun,B.; Yu,H.; Chen,A. & Liu,X. (2008). Insect-associated fungi in soil of field crops and orchards.Crop Protection.27.1421-1426.**

- **Tambekar,D. & Tambekar ,S. (2011). Partial Characterization and Optimization of Protease Production from newly isolated *Cohnella Thermotolerans* from Lonar Lake .Journal of Research in Biology. Vol.1. No.4:292 – 298 .**

- **Thiagarajan, V.; Revathi, R.; Aparanjini, K.; Sivamani, P. ;Girilal, M. ; Priya, C. & Kalaichelvan,T.(2011). Extracellular chitinase production by *Streptomyces* sp. PTK19 in submerged fermentation and its lytic activity on *Fusarium oxysporum* PTK2 cell wall. Int.J. Curr. Sci. 1:30-44.**
- **Thungrabeab, M. & Tongma,S.(2007). Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non target insect. KMITL Sci.Tech. J. Vol.7. No. 1.**

- **Tikhonov, V. ; Lopez-Llorca, L. ; Salinas, J. & Jansson, H. (2002). Purification and Characterization of Chitinases from the Nematophagous Fungi**

Verticillium chlamydosporium and *V. suchlasporium* . Fungal Genetics and Biology . 35: 67-78 .

- Usharani, B. & Muthuraj, M. (2010). Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. African Journal of Microbiology Research. Vol.4.(11).pp. 1057-1063.
- Ustariz , F. ;Laca,A. & Diaz, L. (2008). Fermentation condition increasing protease production by *Serratia marcescens* in fresh whey. Rev.Tec.Ing. Univ.Zulia. Vol.31. No.1.79-89.
- Vega,F. (2008). Insect Pathology and Fungal Endophytes. Journal of Invertebrate Pathology. 98. 277-279.
- Verma,J.;Modi,D.; Sharma,R. & Saxena,S.(2011). Vetal role of Alkaline Protease in Bio-industreis : A review . Plant archives . Vol . 11. No. 2.pp. 1083-1092.
- VijayAnand, S. ; Hemapriya, J. ; Selvin, J. & Kiran,S. (2010). Production and Optimization of Haloalkaliphilic Protease by an Extremophile – *Halobacterium* sp. Js.1, Isolated From Thalassohalin Environment. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry . 5(1): 44- 49.
- Vincent, J. & Wegst, U.(2004).Design and mechanical properties of insect cuticle. Arthropod Structure & Development . 33 .187-199.
- Voet, D. & Voet, J. (2010). Biochemistry. Fourth edition. John Wiley & Sons , Inc.
- Wang, B. ; Liu, X. ; Wu, W. ; Liu, X. & Li, S. (2009). Purification, characterization, and gene cloning of an alkaline serine protease from a highly virulent strain of the nematode-endoparasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis.* Microbiological Research. 164: 665-673.
- Wang,B. ; Wu,W. & Liu,X. (2007). Purification and characterization of a neutral serine protease with nematicidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. Mycopathologia.163:169–176.
- 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.
- Whitaker,J.(1972). Principles of Enzymology for the Food Science . Marcel Dekker, Inc. New York.

- **Xu,Y. ; Zhan,J. ; Wijeratne,E.; Burns,A.; Gunatilake,A. & Molnar, I. (2007). Cytotoxic and Antihaptotactic Beauvericin Analogues from Precursor-Directed Biosynthesis with the Insect Pathogen *Beauveria bassiana* ATCC7159. J.Nat.Prod. 70:1467-1471.**

- **Yandri, ; Suhartati,T.; Herasari,D. & Hadi,S. (2008). The chemical modification of protease enzyme isolated from local bacteria isolate, *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with cyanuric chloride polyethylenglycol. European Journal of Scientific Research. Vol. 23 No.1. pp. 177-186.**

- **Yang ; Jin-Kui, ; Ye,F. ; Mi,Q. ; Tang,S. ; Li,J. & Zhang,K.(2008). Purification and Cloning of an Extracellular Serine Protease from the Nematode-Trapping Fungus *Monacrosporium cystosporium*. J. Microbiol. Biotechnol. 18(5): 852–858.**

- **Yang, J. ; Huang, X. ; Tian, B. ; Wang, M. ; Niu ,Q. & Zhang, K. (2005). Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematicidal activity. Biotechnology Letters. 27 : 1123–1128.**

- **Yang, J.; Liang, L. ; Zhang, Y. ; Li, J. ; Zhang, L. ; Ye, F. ; Gan, Z. & Zhang, K. (2007a). Purification and cloning of a novel serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylellina varietas* and its potential roles in infection against nematodes. Appl. Microbiol Biotechnol. 75: 557-565.**

- **Yang,J. ; Li,J. ; Liang,L. ; Tian,B. ; Zhang,Y. ; Cheng,C. & Zhang, K. (2007b). Cloning and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys conoides*. Arch. Microbiol. 188:167–174.**

- **Yegin, S. ; Lahore,M. ; Guvenc,U. & Goksungur,Y.(2010). Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM 809. African Journal of Biotechnology.Vol. 9(38): pp. 6380-6386.**

- **Yike, I. (2011). Fungal proteases and their pathophysiological effects . Mycopathologia . 171:299–323.**

- **Zambara,V. (2010). Strain improvement of alkaline protease from *Trichoderma reesei* MTCC-3929 by physical and chemical mutagen. The IIOAB Journal. Vol.1 Issue.1.**

- **Zanphorlin, L.; Cabral,H.; Arantes,E.; Assis,D.; Juliano,L.; Juliano, M.; Da-Silva,R.; Gomes,E. & Bonilla-Rodriguez,G. (2011) . Purification and**

characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora sp.,* Process Biochemistry. 46: 2137-2143.

- **Zayed,A. (2003). Pathgenicity of two *Beauveria bassiana* indigenous isolates towards the greater wax moth *Galleria mellonella* L. Larvea in Egypt. Efflatounia. 3: 10-14.**

- **Zhang,Y. ; Feng,M. ; Fan,Y. ; Luo,Z. ; Yang,X. ; Wu,D. & Pei,Y. (2008) . A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of *Beauveria bassiana* enhances virulence . Biocontrol Science and Technology . Vol. 18. No.6 : 551-563.**
- **Zhao, M. ; Huang, J. ; Mo, M. & Zhang, K. (2005). A potential virulence factor involved in fungal pathogenicity: serine-like protease activity of nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. Fungal Diversity. 19: 217-234.**

- **Zhao, Y. ; Park, R. & Muzzarelli, R. (2010). Review: Chitin Deacetylases: Properties and Applications. Mar. Drugs. 8, 24-46.**

Summary

This study was carried out to investigate the optimal conditions for Protease production and chitinase from *Beauveria bassiana* . The study also included a partial purification of this enzyme and characterization of some important properties , and the results showed the following :

1- **The optimal conditions for the enzyme production from the fungus used in this study were using medium composed of baker's yeast at concentration 1.5 % supplemented with 0.3 % $(NH_4)_2 SO_4$, at initial pH 6.5 with an inoculum size 16 % , and incubated at 30 ˚C on a rotary shaker at 150 rpm for 72 h.**

2- **Protease from culture filtrate of *B. bassiana* , were partially purified by dialysis , precipitation with 70% ethanol and DEAE-Cellulose ion exchange chromatography . The enzyme was purified by 2.13 fold with 16.3% yield .**

3- **The purified Protease was characterized . The results showed the following :**

   A- **The K_m values for protease were (4.34 , 6.25 and 6.66) mg/ml , against casein , gelatin and BSA as substrates , respectively . While the V_{max} values were (16.13 , 16.66 and 16.66) mg/ml.min for the three substrates , respectively too .**

B- The optimum pH for the Protease activity was pH 9.0 , and it was stable in the pH range of (8.0-10.0) .

C- The Protease showed heat stability at (20-40) ˚C .

D- The efects of protease inhibitors and various metal ions on the enzyme activity were determined. Only in the presence of PMSF at (1 and 5) mM, the enzyme activity was strongly inhibited, indicating that protease enzyme belongs to the serine-type peptidase group, While calicum chloride and magnesium chloride had stimulated effect on the enzyme activity .

Biochemical Study of Protease Enzyme from *Beauveria bassiana*

A Thesis Submitted

to the Cancil of the College of Science – University of Kerbala'a

in Partial Fulfillment of the Requirement for the

Degree of Master of Science in Biology

By

Soro0r M.A. Al-Ebadi

B.SC. Kerbala University

2006

Supervised by

Assist. Prof. Dr.

Ali Abdul Kadhm Jasim

July 2012 A.D *Ramadhan 1433 A.H*