The North African Journal of Scientific Publishing (NAJSP)
مجلة شمال إفريقيا للنشر العلمي (NAJSP)
E-ISSN: 2959-4820
Volume 3, Issue 1, January - March 2025
Page No: 111-123
Website: https://najsp.com/index.php/home/index
SJIFactor 2024: 5.49 معامل التأثير العربي (AIF) 2024: 0.71 ISI 2024: 0.696

فحص كفاءة فطريات معزولة من التربة على إنتاج إنزيمات البروتيز

هناء عمر إبراهيم صافار[1*]
[1]قسم الأحياء-الأحياء الدقيقة، كلية العلوم، جامعة مصراتة، مصراتة، ليبيا

Screening the Ability of Fungi Isolated from the Soil to Produce Protease Enzymes

Hanna Omar Ibrahim Safar[1*]
[1]Biology-Microbiology Department, Faculty of Sciences, Misurata University, Misurata, Libya

[*]Corresponding author h.safar@sci.misurata.edu.ly [*]المؤلف المراسل:
تاريخ الاستلام:2024-12-07 تاريخ القبول:2025-01-14 تاريخ النشر:2025-02-18

الملخص
تعد إنزيمات proteases من الإنزيمات الحيوية التي تحظى بأهمية كبرى في العديد من القطاعات الصناعية، أجريت هذه الدراسة لمعرفة قدرة فطريات التربة على إنتاج إنزيمات proteases، والتي تم عزلها من تربة حدائق منزلية جُمعت من مناطق مختلفة بمدينة مصراتة - ليبيا، باستخدام طريقة التخفيف المتسلسل والزراعة على الوسط الغذائي PDA، حيث عزل 11 نوعاً فطرياً، وقد بينت نتائج الفحص الأول باستخدام الوسط الغذائي SMA أن جميع العزلات لها القابلية على إنتاج إنزيمات proteases، حيث أعطى الفطر Yeast sp. أفضل كفاءة تحلل بمتوسط 1.30، وأقلها الفطر *Aspergillus niger* بكفاءة تحلل 0.36، كذلك أظهرت نتائج الفحص الثاني لاختبار نشاط إنزيمات proteases المفرزة في الراشح الفطري للعزلات المنتجة باستخدام طريقة حفر الأجار المنتشرة على الوسط الغذائي SMA، أن كلٌّ من الفطر *A. niger* والفطر *Alternaria* sp. لم يظهرا أي هالة تحلل حول حفر الأجار، في حين أن باقي الفطريات المعزولة أعطت هالات تحلل حول حفر الأجار، حيث أعطى الفطر Yeast sp. أفضل هالة تحلل بمتوسط قطر19.00ملم، يليه الفطر *Trichoderma* sp. بمتوسط قطر16.00ملم، واتضح من الدراسة أهمية فطريات التربة كمصدر لإنتاج إنزيمات proteases، والتي يمكن الاستفادة منها في العديد من المجالات التطبيقية.

الكلمات المفتاحية: الفطريات، الإنزيمات، البروتيز، أجار الحليب منزوع الدسم، حفر الأجار المنتشرة.

Abstract:
Proteases are vital enzymes that are of great importance in many industrial fields. This study amid to determine the ability of soil fungi to produce proteases, which were isolated from house gardens soil collected from different areas in Misurata city, Libya. Eleven species of fungi were isolated using the serial dilution method and cultivation on PDA medium. The results of the primary screening using SMA medium showed that all isolates have the ability to produce the proteases, Yeast sp. showed the best hydrolysis efficiency with an average of 1.30, and the lowest was *Aspergillus niger* with a hydrolysis efficiency of 0.36. Also, the secondary screening was conducted to test the activity of the secreted proteases in the fungal filtrate of the produced isolates using the agar well diffusion method on SMA medium, The results showed that *A. niger* and *Alternaria* sp. did not show any hydrolysis zone around the agar wells, while the rest of the isolated fungi gave a hydrolysis zone around the agar wells, where Yeast sp. gave the best hydrolysis zone with an average diameter of 19.00 mm, followed by *Trichoderma* sp. with an average diameter of 16.00 mm. This study showed the importance of soil fungi as a source for the production of protease enzymes, which can be used in many applied fields.

Keywords: Fungi; Enzymes; Proteases; Skim milk agar; Agar well diffusion method.

المقدمة

تحظى إنزيمات proteases بأهمية كبرى في العديد من القطاعات الصناعية، فهي تشكل حوالي 60٪ من إجمالي سوق الإنزيمات الصناعية (Kumar and Jain, 2017)، وتدخل هذه الإنزيمات في العديد من المجالات التطبيقية كصناعة الأغذية، حيث تستخدم في صناعة الألبان لتخثير بروتين الحليب وفي تحضير الجبن، وأيضا لتحسين الخصائص الوظيفية والغذائية والنكهة في دقيق البسكويت والمقرمشات والكعك، بالإضافة إلى ذلك فهي تلعب دوراً مهمّاً في تطرية اللحوم، وصناعة المنظفات، ومعالجة الجلود وصناعة النسيج، ومعالجة النفايات الصناعية، كما تدخل في تركيب الأدوية لمعالجة بعض الالتهابات، كالتهابات الحروق والجروح، وكمساعدات للهضم ومنع الجلطات الدموية (Haki and Rakshit, 2003; Sumantha *et al.,* 2006; Dias *et al.,* 2010; de Souza *et al.,* 2015).

تعد إنزيمات proteases من إنزيمات التحلل المائي المحفزة لِتَمَيُّؤِ البروتينات (Hussain *et al.,* 2010)، إذ تعمل على تحطيم جزيئات البروتين إلى ببتيدات قصيرة وأحماض أمينية حرة، من الممكن تمثيلها بواسطة الخلية واستخدامها كمصدر للطاقة، وللكربون والنيتروجين (Sabotic and Kos, 2012)، حيث يعمل الإنزيم على فك الروابط الببتيدية الموجودة في جزيء البروتين بإضافة جزيء ماء في مواقع مختلفة، وتُصنف إنزيمات proteases اعتماداً على الموقع الذي يعمل عليه إلى نوعين، النوع الأول: يحلل الروابط الببتيدية البعيدة من نهاية سلسلة الأحماض الأمينية، ويعرف بإنزيمات endopeptidase، والنوع الثاني: يحلل الروابط الببتيدية القريبة من نهاية سلسلة الأحماض الأمينية، ويعرف بإنزيمات exopeptidase (Verma *et al.,* 2011; Malek *et al.,* 2016).

توجد إنزيمات proteases بكثرة في الطبيعة وفي مصادر مختلفة مثل النباتات، والحيوانات، والكائنات الحية الدقيقة المتمثلة في البكتيريا، والفطريات، والأكتينوميسيتات (de Souza *et al.,* 2015)، وتعد الكائنات الحية الدقيقة من أهم المصادر المنتجة للإنزيمات، حيث تحتل مكانا بارزاً في عالم الأحياء الدقيقة الصناعية، وقد وصلت هذه الصناعة إلى مستوى رفيع في الكثير من بلدان العالم المتقدمة؛ وذلك لإمكانية السيطرة على إنتاجها من خلال سهولة التحكم في الظروف البيئية التي تنمو فيها، فضلاً عن مقدرتها على النمو السريع في البيئات الغذائية الرخيصة، ويمكن الحصول على الإنزيم في راشح البيئة الغذائية المستخدمة للنمو، حيث إنها تفرز خارج الخلية، وكذلك تعد الإنزيمات الميكروبية أكثر استقراراً من مثيلتها الإنزيمات المستخلصة من النباتات والحيوانات، وإنتاجها يكون أكثر سهولة وأماناً (Vishwanatha *et al.,* 2010)، وتعتبر فطريات التربة من الكائنات الدقيقة المهمة في إنتاج إنزيمات proteases، التي جذبت انتباه علماء التكنولوجيا الحيوية البيئية، حيث يمكن للفطريات النمو في بيئات غذائية منخفضة التكلفة، ولها القدرة على إنتاج الإنزيم في مدى متسع من درجات الحموضة، وإفراز الإنزيم بكميات كبيرة في وسط الاستزراع، وأيضاً سهولة فصل الفطريات عن طريق الترشيح (Agu *et al.,* 2023).

يعد تحديد كفاءة التحلل أو قابلية الفطريات على إنتاج إنزيمات proteases من الطرق النوعية البسيطة والسريعة المستخدمة لاختيار أفضل الأنواع في إنتاج الإنزيم، حيث أشارت العديد من دراسات إلى أهمية استخدام الأوساط الغذائية الصلبة كخطوة أولية لتحديد الفطريات الأكفأ والتي يمكن استغلالها والاستفادة منها كمصدر لإنتاج إنزيمات proteases، ومن هذه الدراسات دراسة (Maitig *et al.,* 2018) والتي بينت كفاءة فطريات التربة على إنتاج إنزيمات proteases باستخدام الوسط الغذائي Skim milk agar، وأظهرت النتائج أن جنس *Aspergillus* sp. أعطى أفضل نتائج بكفاءة تحلل 2.09، يليها جنس *Rhizopus* sp. بكفاءة تحلل 2.03، كما أظهرت دراسة (Suryawanshi and Pandya, 2017) كفاءة الفطريات المعزولة من التربة على إنتاج إنزيمات proteases باستخدام طريقة حفر الأجار المنتشرة على ثلاثة أوساط غذائية، تحتوي على مصدر بروتيني كمادة مُحفزة لإنتاج الإنزيم وهي: Casein agar، Skim milk agar، Gelatin agar، وبينت الدراسة أن أفضل العزلات المُنتجة للإنزيم تمثلت في الفطر *Aspergillus niger* و *Trichoderma longibrachiatum*، وذلك بظهور هالات تحلل على جميع الأوساط الغذائية بأقطار (27، 18، 35)ملم على التوالي للفطر *A. niger*، و(25، 30، 20)ملم على التوالي للفطر *T. longibrachiatum*.

عليه ونظراً لأهمية فطريات التربة كمصدر لإنزيمات proteases المهمة في العديد من المجالات التطبيقية، فقد هدفت هذه الدراسة إلى عزل فطريات التربة من حدائق منزلية بمدينة مصراتة - ليبيا، وتحديد كفاءتها على إنتاج إنزيمات.

المواد وطرائق البحث

تحضير الأوساط الغذائية Preparation of Culture Media

الوسط الغذائي Potato Dextrose Agar (PDA)

استُخدم هذا الوسط لغرض عزل الفطريات من عينات التربة، حيث حضر الوسط بأخذ 200 جم من البطاطس بعد غسلها وتقطيعها إلى قطع صغيرة، ثم وضعت في دورق زجاجي وأضيف إليها 500 مل من الماء المقطر، وتم غليها لمدة 20 دقيقة، ثم رشحت بواسطة قطعة شاش نظيفة، وأضيف إلى المستخلص 20 جم من السكروز و20 جم من الأجار، وأكمل الوسط إلى 1000 مل ماء مقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني (pH) عند 6.0 باستخدام حامض الهيدروكلوريك (HCL) ومحلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)، وعقم بجهاز التعقيم autoclave عند درجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة، ثم بُرّد الوسط إلى 50مْ وأضيف إليه المضاد البكتيري amoxicillin بتركيز 500 مليجرام/لتر، ورج جيداً، بعد ذلك تم صبه في أطباق بتري تحت ظروف معقمة (Syamsia *et al.*, 2021).

الوسط الغذائي Skim Milk Agar (SMA)

استُخدم هذا الوسط لتحديد قدرة الفطريات المعزولة على إنتاج إنزيمات proteases، حيث حضر بإذابة 15 جم من الأجار في 800 مل من الماء المقطر، وإذابة 10 جم من مسحوق الحليب منزوع الدسم في 200 مل من الماء المقطر، وضبط الرقم الهيدروجيني (pH) عند 6.0 باستخدام حامض الهيدروكلوريك (HCL) ومحلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)، بعد ذلك تم تعقيم الخليطين بشكل منفصل باستخدام جهاز التعقيم autoclave عند درجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة، وبعد التعقيم تم خلط الحليب مع الأجار المعقم، وبُرّد الخليط إلى 50مْ، وسكب في أطباق بتري تحت ظروف معقمة (Tekin *et al.*, 2012; Sedrah *et al.*, 2021).

الوسط الغذائي Yeast Extract Casein Broth (YECB)

استُخدم كوسط لتحفيز إنتاج إنزيمات Proteases من قبل الفطريات التي أعطت نتيجة إيجابية لإنتاج الإنزيم، حيث حضر الوسط بإذابة 5 جم كازين، 10 جم جلوكوز، 5 جم مستخلص الخميرة، 2 جم K_2HPO_4 و1 جم $MgSO_4.7H_2O$ في 1000 مل من الماء المقطر، وتم ضبط الرقم الهيدروجيني (pH) عند 6.0 باستخدام حامض الهيدروكلوريك (HCL) ومحلول هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)، بعد ذلك وزع الوسط في دوارق مخروطية سعة 100 مل (25 مل/ دورق)، وعقمت بجهاز التعقيم autoclave عند درجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة (Sharma *et al.*, 2014).

جمع عينات التربة Collection of the Soil Samples

جمعت 5 عينات تربة بوزن 100 جم بطريقة عشوائية من حدائق منزلية بمناطق مختلفة (وسط المدينة، الزروق، كرزاز، طمينة، والسكت) في مدينة مصراتة - ليبيا، وكل عينة كانت عبارة عن خليط من 4 حفر أخذت بعمق يقارب 15 سم من سطح التربة، ووضعت كل عينة في عبوات بلاستيكية معقمة، ثم نقلت إلى معمل الأحياء الدقيقة بكلية العلوم جامعة مصراتة - ليبيا، وتمت غربلتها للتخلص من الحصى والشوائب العالقة بها (Maitig *et al.*, 2018).

عزل الفطريات من عينات التربة Isolation of the Fungi from the Soil Samples

تم عزل الفطريات من عينات التربة باستخدام طريقة التخفيف، وذلك بوزن 25 جم من كل عينة تربة، ووضعها في دوارق مخروطية تحتوي 225 مل من الماء المقطر المعقم، وحضرت منها سلسلة من التخفيفات العشرية حتى الوصول إلى التخفيف 10^{-3}، ثم نقل 0.1 مل من كل تخفيف إلى طبق بتري يحتوي على الوسط الغذائي PDA، ووزعت بالتساوي على سطح الوسط الغذائي باستخدام الساق الزجاجية الناشرة، وحضنت الأطباق في الحضانة عند درجة حرارة 28مْ لمدة 5 - 7 أيام (Mohanasrinivasan *et al.*, 2012; Maitig *et al.*, 2018).

تنقية العزلات الفطرية Purification of the Fungi

بعد فترة التحضين ونمو المستعمرات الفطرية المختلفة، تمت تنقية كل مستعمرة من الفطريات الخيطية باستخدام إبرة التلقيح المعدنية المعقمة، وذلك بوضعها في طبق بتري مستقل يحتوي على الوسط الغذائي PDA، وحضنت الأطباق في الحضانة عند درجة حرارة 28مْ لمدة 5 - 7 أيام؛ للحصول على مستعمرات نقية من كل نوع فطري (Maiting *et al.*, 2018)، أما بالنسبة لفطر الخميرة فقد تمت تنقيته باستخدام إبرة التلقيح المعدنية ذات العقدة المعقمة باتباع طريقة التخطيط، وحضنت الأطباق في الحضانة عند درجة حرارة 28مْ لمدة 48 ساعة (Abdulla *et al.*, 2022).

تشخيص العزلات الفطرية Identification of the Fungi

شخصت الفطريات على أساس الصفات المظهرية والمجهرية بالاعتماد على المرجع العلمي المتاح (Kidd *et al.*, 2016)، وفي الفحص المجهري تم اتباع طريقة الشريط اللاصق لفحص الفطريات الخيطية، حيث استخدم في هذه الطريقة شريط لاصق تتم ملامسته على سطح المستعمرة الفطرية، ثم لصق الشريط على سطح شريحة زجاجية نظيفة (Maurya *et al.*, 2011)، أما في حالة فطريات الخميرة فقد تم تحضير غشاء من خلايا الخميرة على سطح شريحة زجاجية نظيفة، بعد ذلك فحصت الشرائح باستخدام المجهر الضوئي تحت قوة تكبير40X (Abdulla *et al.*, 2022).

فحص كفاءة الفطريات على إنتاج إنزيمات

الفحص الأول

لتحديد مقدرة وكفاءة الفطريات المعزولة على إنتاج إنزيمات proteases، تم أخذ قرص بقطر 5ملم من كل عزلة من الفطريات المزروعة على الوسط الغذائي PDA باستخدام القاطع الفليني، ووضعت في منتصف طبق بتري يحتوي على الوسط الغذائي SMA، واستخدام ثلاث مكررات لكل عزلة فطرية، مع ترك طبق بدون تلقيح كشاهد على الاختبار، وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 28مْ لمدة 4 أيام، بعد ذلك تم الكشف عن مقدرة العزلات على إنتاج الإنزيم من خلال ظهور هالة تحلل شفافة حول المستعمرة النامية على الوسط الغذائي SMA، وهذا دليل على تحلل بروتين الحليب الموجود في الوسط، وعن طريق قياس قطر هالة التحلل وقطر المستعمرة الفطرية النامية بالمليمتر(ملم mm)، تم حساب كفاءة العزلات الفطرية على تحليل البروتين وإنتاج إنزيمات proteases باستخدام المعادلة التالية:

كفاءة التحلل (قابلية الفطر على إنتاج proteases)= $\frac{\text{قطر هالة التحلل (mm)}}{\text{قطر المستعمرة الفطرية (mm)}}$ (Abe *et al.*, 2015).

الفحص الثاني

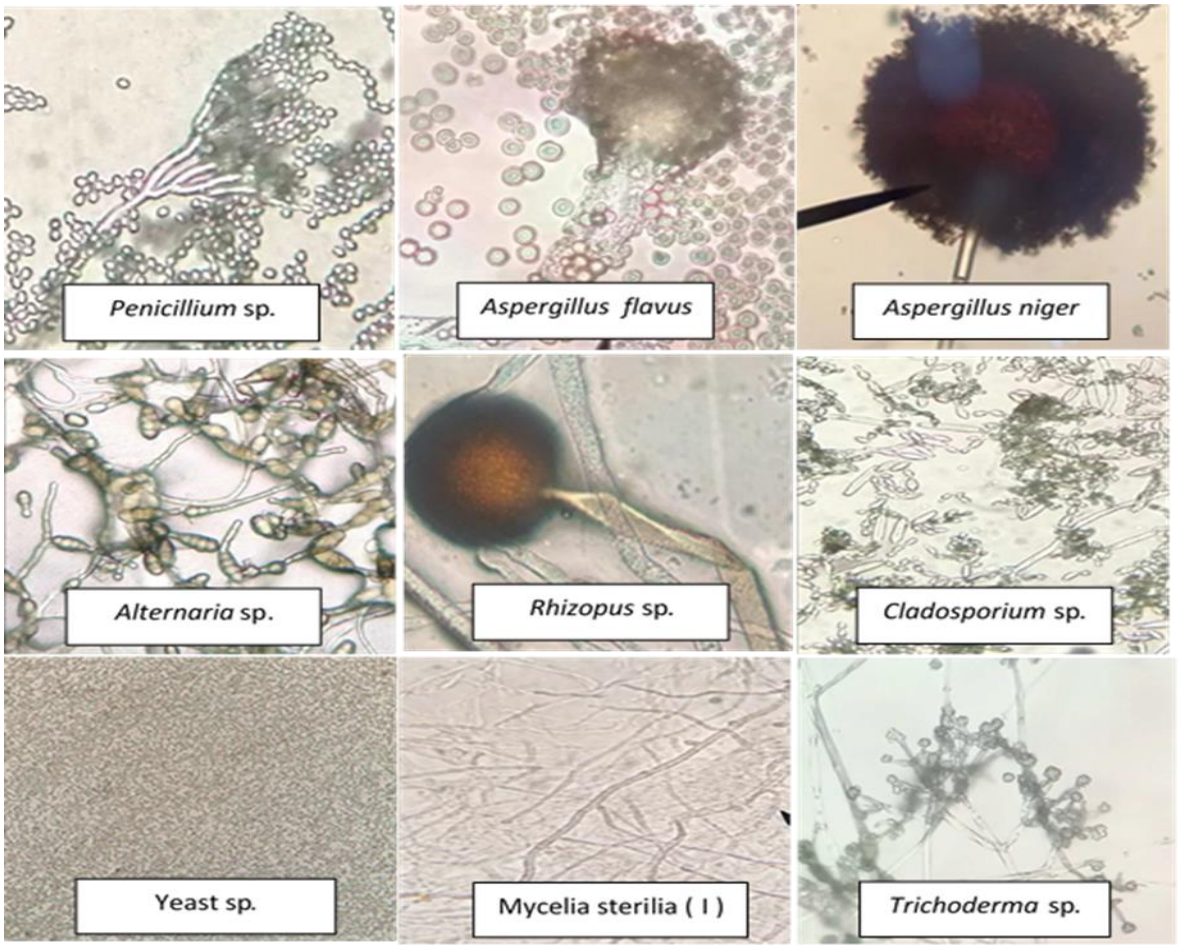
تم استخدام طريقة حفر الأجار المنتشرة (Agar Well Diffusion Method) لغرض تحديد كفاءة إنزيمات proteases في الراشح الفطري للعزلات المنتجة، وذلك بأخذ قرص بقطر 5 ملم باستخدام القاطع الفليني من العزلات الفطرية المزروعة على وسط PDA، ووضعت في دوارق سعة 100 مل تحتوي على 25 مل من الوسط الغذائي السائل المعقم YECB المضاف إليه الكازين كمادة محفزه لإنتاج الإنزيم، مع ترك دورق بدون تلقيح كشاهد على الاختبار، وحضنت الدوارق عند درجة حرارة 28مْ في الحضانة لمدة 4 أيام، بعد ذلك تم ترشيح المزرعة السائلة بواسطة ورق ترشيح؛ للتخلص من النموات الفطرية وللحصول على الراشح الفطري، ثم وضع الراشح الفطري للفطريات المنتجة في أنابيب خاصة بالطرد المركزي، بعد ذلك وضعت في جهاز الطرد المركزي على سرعة 10000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة، وبعد ذلك عقم الراشح الفطري باستخدام وحدة الترشيح الدقيق (membrane filter 0.22µm)، وتم تحديد نشاط الإنزيم في الراشح الفطري باستخدام طريقة حفر الأجار المنتشرة على الوسط الغذائي SMA، وذلك بعمل 4 حفر بقطر 5 ملم على سطح الوسط الغذائي باستخدام القاطع الفليني، بعد ذلك وضع 50 ميكروليتر من الإنزيم الفطري في كل حفرة، مع ترك حفرة بدون تلقيح كشاهد على الاختبار، وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 28مْ لمدة 48 ساعة، وبعد التحضين لوحظ التحلل البروتيني كمنطقة (هالة) شفافة واضحة للتحلل المائي حول حفر الأجار، وتم قياس قطر منطقة أو هالة التحلل باستخدام المسطرة بالمليمتر (ملم mm) (Rasheed, 2023).

التحليل الإحصائي

تم تحليل نتائج الدراسة بواسطة البرنامج الإحصائي Statistical Analysis System (SAS)؛ لحساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري لتكرارات الثلاثة، كما تم استخدام معامل ارتباط بيرسون (Pearson Correlation)؛ لتحديد الارتباط ما بين نتائج كفاءة تحلل الفحص الأول ونتائج كفاءة تحلل الفحص الثاني.

النتائج والمناقشة

عزل في هذه الدراسة 11 عزلة فطرية من عينات تربة حدائق منزلية بمدينة مصراتة - ليبيا، باستخدام طريقة التخفيف المتسلسل والزراعة على الوسط الغذائي PDA، تنتمي هذه العزلات إلى 8 أجناس فطرية وهي: *Aspergillus* spp.، *Penicillium* sp.، *Cladosporium* sp.، *Alternaria* sp.، *Trichoderma* sp.، *Rhizopus* sp.، Mycelia sterilia spp. و Yeast sp.، وتم الحصول على الأنواع الفطرية التالية لجنس *Aspergillus* spp.: *A.* niger، *A. flavus* و*A. fumigatus*، ونوع واحد لكلٍّ من *Penicillium* sp.، *Alternaria* sp.، *Rhizopus* sp.، *Cladosporium* sp.، *Trichoderma* sp.، Yeast sp. ونوعين من الفطريات العقيمة: Mycelia sterilia sp.(I) و Mycelia sterilia sp. (II) (شكل 1)، شخصت الفطريات المعزولة على أساس الصفات المزرعية والمجهرية بالاعتماد على المرجع العلمي المتاح (Kidd *et al.*, 2016).



شكل (1): الفحص المجهري لبعض الفطريات المعزولة باستخدام المجهر الضوئي بقوة تكبير 40X.

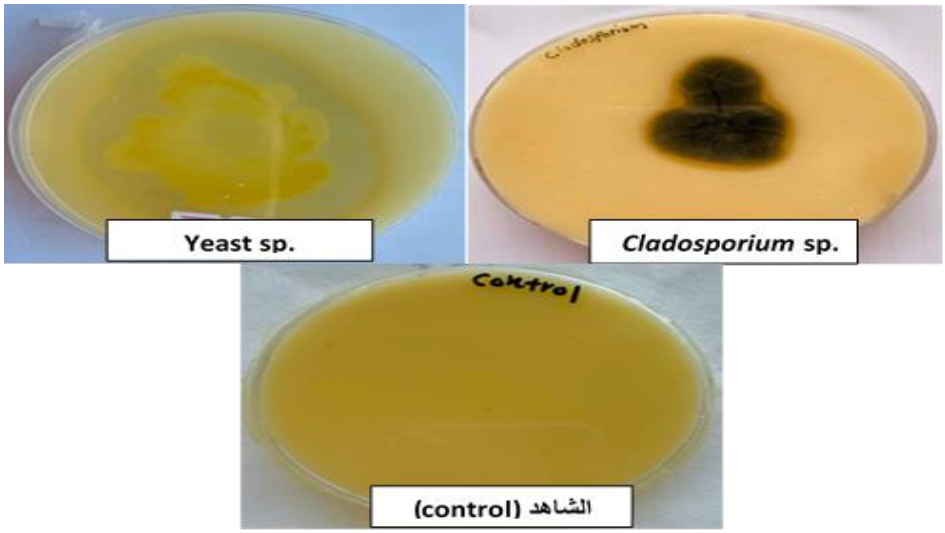
من ناحية أخرى، فقد أظهرت نتائج الفحص الأول لاختبار كفاءة الفطريات المعزولة على إنتاج إنزيمات proteases، أن جميع الفطريات المعزولة كانت لها القابلية على إنتاج إنزيمات proteases وبنشاطات مُختلفة، باستخدام الوسط الغذائي SMA المحتوي على الحليب منزوع الدسم كمادة محفزة

لإنتاج الإنزيم، حيث يعد ظهور هالة تحلل شفافة حول المستعمرة الفطرية دليلاً على مقدرة الفطر على إنتاج الإنزيم، إذ تعمل إنزيمات proteases على تكسير الروابط الببتيدية الموجودة في جزيء البروتين ليُجَزِّئَهَا إلى ببتيدات قصيرة وأحماض أمينية حرة (Smith *et al.*, 1997)، وتبين أيضاً أن هناك تفاوتاً في كفاءة التحلل بين الأنواع الفطرية المعزولة (جدول 1)، حيث أعطى كُلٌّ من الفطر *A. fumigatus*، *Penicillium* sp.، *Cladosporium* sp.، *Trichoderma* sp.، Yeast sp. و Mycelia sterilia sp.(II) أقطار هالات تحلل كانت أكبر من أقطار المستعمرات الفطرية، أي ظهور هالة تحلل حول المستعمرة الفطرية، وأن أفضل كفاءة تحلل كانت للفطر Yeast sp. بمتوسط 1.30، يليه الفطر *Trichoderma* sp. بمتوسط كفاءة تحلل 1.20، والفطر *Cladosporium* sp. بمتوسط كفاءة تحلل 1.16، ويليه كُلٌّ من الفطر *Penicillium* sp.، Mycelia sterilia sp. (II) و *A. fumigatus* بمتوسط كفاءة تحلل 1.09، 1.07 و 1.06 على التوالي (شكل 2)، بالإضافة إلى ذلك أعطى كُلٌّ من الفطر *A.* niger، *A. flavus*، *Rhizopus* sp.، *Alternaria* sp. و Mycelia sterilia sp. (I) أقطار هالات تحلل كانت أقل من أقطار المستعمرات الفطرية، أي عدم ظهور هالة تحلل حول المستعمرة الفطرية، حيث أعطى الفطر *A. niger* أقل كفاءة تحلل بمتوسط 0.36، يليه الفطر *Alternaria* sp. بمتوسط كفاءة تحلل 0.38، ثم *A. flavus*، Mycelia sterilia sp. (I) و *Rhizopus* sp. بمتوسط كفاءة تحلل 0.62، 0.77، 0.96 على التوالي (شكل 3).

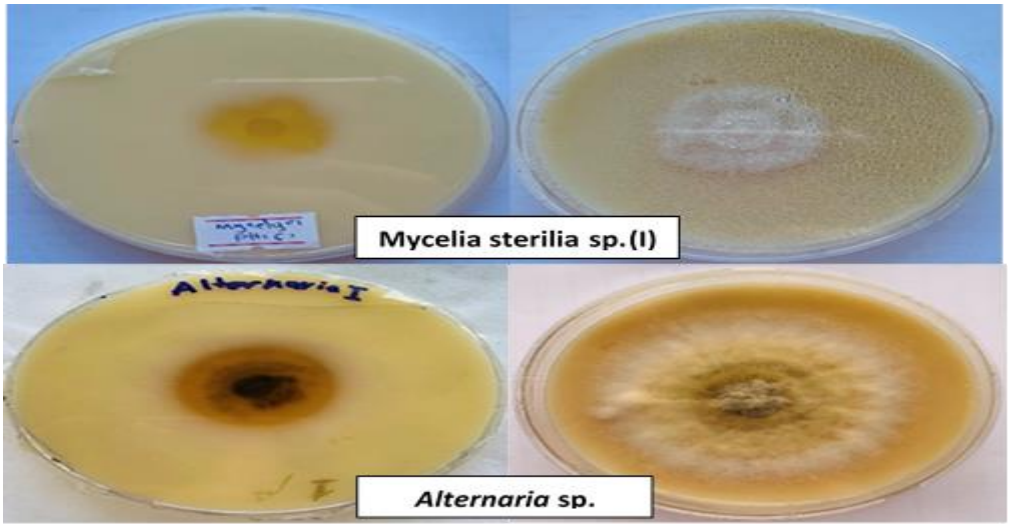
جدول (1): كفاءة التحلل للعزلات الفطرية على الوسط الغذائي SMA (الفحص الأول).

الفطريات المعزولة	قطر المستعمرة الفطرية (mm)	قطر هالة التحلل (mm)	كفاءة التحلل (الفحص الأول)
Aspergillus niger	31.33±1.86	11.33±0.67	0.36±0.02
Aspergillus fumigatus	67.00±4.0	71.33±6.33	1.06±0.03
Aspergillus flavus	28.33±0.88	19.00±0.58	0.62±0.02
Penicillium sp.	28.67±2.33	31.33±2.40	1.09±0.01
Cladosporium sp.	26.67±3.18	31.00±2.89	1.16±0.3
Alternaria sp.	25.00±0.58	9.67±0.67	0.38±0.02
Trichoderma sp.	39.67±0.33	47.67±1.45	1.20±0.03
Rhizopus sp.	85.67±0.33	83.00±0.58	0.96±0.003
Mycelia sterilia sp. (I)	53.33±1.67	41.00±0.58	0.77±0.03
Mycelia sterilia sp. (II)	63.33±0.67	68.00±1.15	1.07±0.01
Yeast sp.	37.67±2.18	49.00±2.31	1.30±0.03

المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاثة مكررات.



شكل (2): نشاط إنزيمات proteases لبعض العزلات الفطرية على الوسط الغذائي SMA، والتي أعطت أقطار هالات تحلل أكبر من أقطار المستعمرات الفطرية، أي ظهور هالة تحلل حول المستعمرة الفطرية مقارنة بطبق الشاهد.



شكل (3): نشاط إنزيمات proteases لبعض العزلات الفطرية على الوسط الغذائي SMA، والتي أعطت أقطار هالات تحلل أقل من أقطار المستعمرات الفطرية، أي عدم ظهور هالة تحلل حول المستعمرة الفطرية.

اختلفت نتائج الفحص الأول لنشاط إنزيمات proteases في هذه الدراسة عن نتائج دراسة (Maitig *et al.*, 2018) التي بينت قدرة كلٍّ من الجنس *Aspergillus* sp. و*Rhizopus* sp. على إنتاج إنزيمات proteases بكفاءة تحلل 2.09 و 2.03 على التوالي، مقارنة بنتائج الدراسة الحالية التي بينت أن الفطريات *A. niger*، *A. flavus* و *Rhizopus* sp. كانت أقل العزلات كفاءة في إنتاج إنزيمات proteases على الوسط الغذائي SMA، كما اختلفت النتائج عن دراسة (Suryawanshi and Pandya, 2017) التي بينت أن الفطر *A. niger* كان الأفضل نشاطاً في إنتاج إنزيمات proteases، في حين اتفقت مع نتائج الدراسة الحالية من ناحية أن الفطر *Trichoderma* كان من أفضل العزلات المُنتجة للإنزيم، أيضاً فقد تقاربت نتائج هذه الدراسة مع دراسة (Oseni, 2011) التي أظهرت دور الفطر *A . fumigatus* في إنتاج إنزيمات proteases، وبينت أهميته في تحليل المواد البروتينية الموجودة في التربة، كما تقاربت النتائج مع دراسة (Saxena *et al.*, 2017) من ناحية قدرة الفطر *Cladosporium* sp. على إنتاج إنزيمات proteases، واتفقت مع نتائج دراسة (Ul-

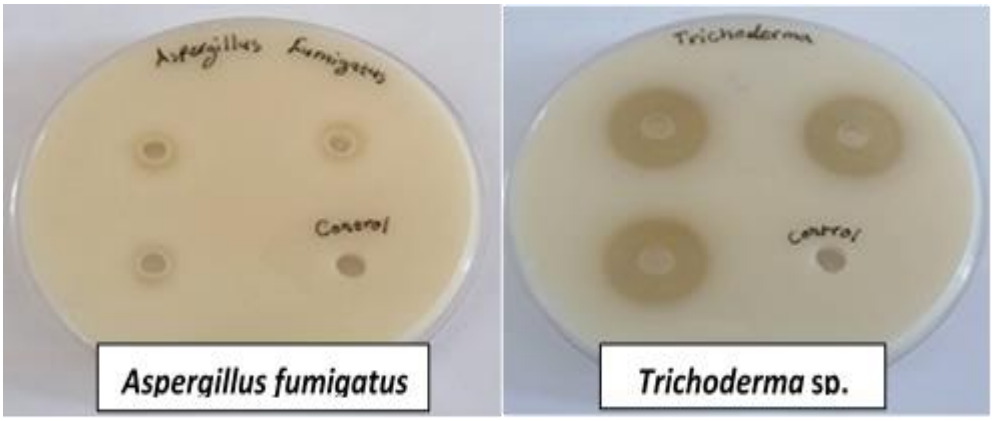
Haq *et al.*, 2006) من حيث قدرة الفطر *Penicillium* sp. على إنتاج إنزيمات proteases، والتي يمكن الاستفادة منها في العديد من المجالات الصناعية والطبية، ويعتبر تحديد كفاءة التحلل أو قابلية الفطر على إنتاج إنزيمات proteases باستخدام الأوساط الصلبة من الطرق النوعية البسيطة والسريعة لاختيار أفضل الأنواع في إنتاج الإنزيم (Florencio *et al.*, 2012).

بالإضافة إلى ذلك، فقد تم إجراء الفحص الثاني لتحديد النشاط الإنزيمي لإنزيمات proteases في راشح الوسط الغذائي YECB للعزلات الفطرية المنتجة، باستخدام طريقة حفر الأجار المنتشرة على الوسط الغذائي SMA، وبينت النتائج (جدول 2) أن أفضل نشاط لإنزيمات proteases المنتجة كانت في الراشح الفطري للفطر Yeast sp. بمتوسط قطر هالة تحلل 19 ملم، والفطر *Trichoderma* sp. بمتوسط قطر هالة تحلل 16 ملم، يليه الفطر *Cladosporium* sp. بمتوسط قطر هالة تحلل 15 ملم، وأقل نشاط إنزيمي كان للفطر *A. flavus* بمتوسط قطر هالة تحلل 6.00 ملم (شكل 4)، أما بالنسبة للراشح الفطري لكلٍّ من الفطر *A. niger* والفطر *Alternaria* sp. فلم يظهرا أي هالة تحلل حول حفر الأجار على الوسط الغذائي SMA، مما يدل على عدم قدرتهما على إنتاج إنزيمات proteases باستخدام الوسط السائل YECB المضاف إليه الكازين كمادة محفزة لإنتاج الإنزيم.

جدول (2): النشاط الإنزيمي لإنزيمات proteases في راشح الوسط الغذائي YECB للعزلات الفطرية المنتجة، باستخدام طريقة حفر الأجار المنتشرة على الوسط الغذائي SMA (الفحص الثاني).

الفطريات المعزولة	قطر هالة تحلل (mm) (الفحص الثاني)
Aspergillus niger	0.00±0
Aspergillus fumigatus	9.00±0.58
Aspergillus flavus	6.00±0
Penicillium sp.	11.00±0.58
Cladosporium sp.	15.00±0
Alternaria sp.	0.00±0
Trichoderma sp.	16.00±0.58
Rhizopus sp.	9.33±0.33
Mycelia sterilia sp. (I)	8.67±0.33
Mycelia sterilia sp. (II)	10.00±0
Yeast sp.	19.00±0.58

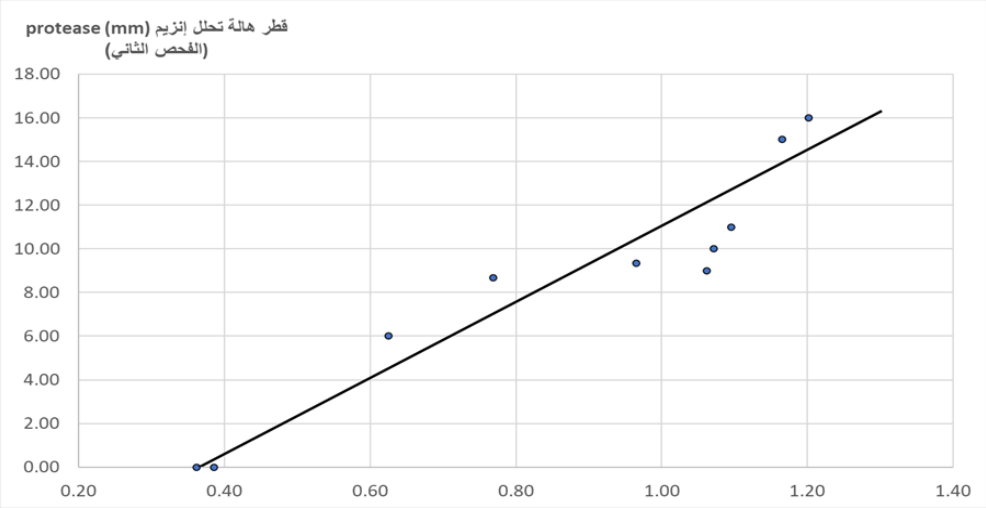
المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاثة مكررات.



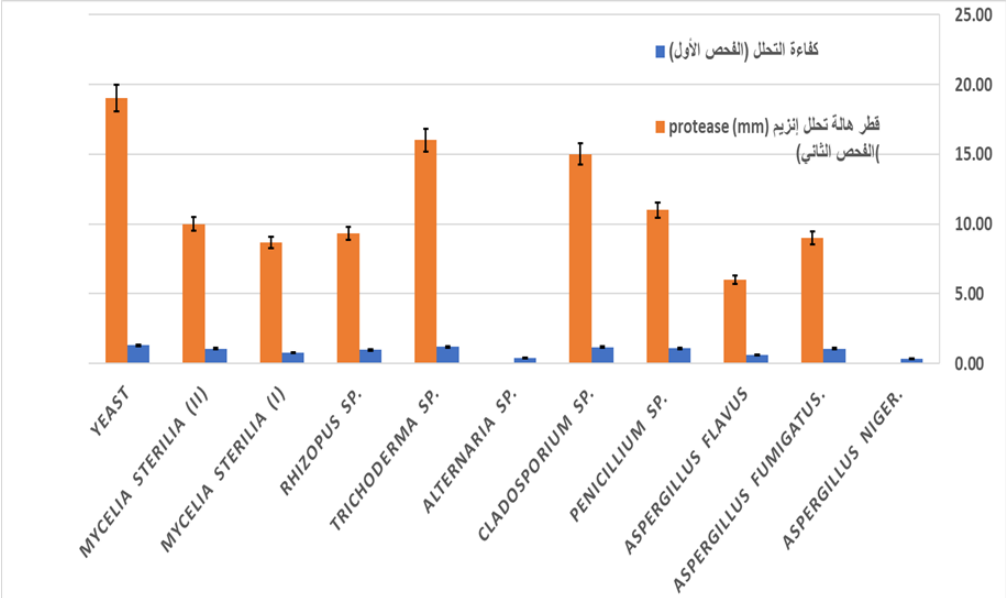
شكل (4): النشاط الإنزيمي للراشح الفطري لإنزيمات proteases لبعض العزلات الفطرية المنتجة باستخدام طريقة حفر الآجار المنتشرة على وسط SMA (الفحص الثاني).

هذه النتائج اختلفت عن دراسة (Shehada *et al.,* 2021) التي بينت أن الفطر *A. niger* أعطى أفضل هالة تحلل حول حفر الأجار بلغت 16 ملم عند pH (6.6)، كما اختلفت أيضاً عن دراسة (Rasheed, 2023) التي أظهرت أن الفطر *A. niger* أعطى أفضل هالة تحلل على الوسط الغذائي SMA باستخدام طريقة حفر الأجار المنتشرة، في حين تقاربت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة (Suryawanshi and Pandya, 2017) التي بينت أن الفطر *T. longibrachiatum* كان أفضل العزلات المنتجة لإنزيمات proteases باستخدام طريقة حفر الأجار على ثلاثة أوساط غذائية تحتوي على مصدر بروتيني كمادة مُحفزة لإنتاج الإنزيم وهي أوساط: Casein agar،SMA، وGelatin agar وتم الحصول على نتائج إيجابية بظهور هالات تحلل في جميع الأوساط الغذائية بأقطار(25 ، 30، 20)ملم على التوالي، أيضاً تطابقت الدراسة مع ما أكدته العديد من الدراسات (Abd Al Halim *et al.,* 2024; Schlander *et al.,* 2017) التي بينت أهمية فطريات الخميرة كمصدر لإنتاج الإنزيمات الصناعية وتحديداً إنزيمات proteases.

بالإضافة إلى ذلك أظهرت نتائج التحليل الإحصائي باستخدام معامل ارتباط بيرسون (شكل 5، 6) أن قيمة مُعامل الارتباط كانت (0.950)، وقيمة مستوى الدلالة (P-value) كانت (0.000129861) أقل من (0.05)، مما يدل على وجود علاقة دالة إحصائيّاً، أي أن هناك علاقة طردية ما بين نتائج كفاءة التحلل في الفحص الأول ونتائج أقطار هالة التحلل في الفحص الثاني، فكلما زادت كفاءة التحلل في الفحص الأول زادت أقطار هالات التحلل في الفحص الثاني، ويمكن تفسير ضعف قابلية بعض الفطريات المعزولة على إنتاج إنزيمات proteases بسبب أن الأنواع الفطرية وسلالاتها قد تختلف عن بعضها البعض في الظروف البيئية المناسبة لتحقيق الإنتاجية القصوى (Kumar and Takagi, 1999)، كما أن القواعد الأساسية التي تتحكم بالظروف المثلى لإنتاج إنزيمات proteases الميكروبية تتأثر بالعديد من العوامل منها: درجة الحرارة المثلى للإنتاج، والوسط الزراعي، وتأثير سرعة الرج والتهوية، والرقم الهيدروجيني (pH) للبيئة، وحجم اللقاح، ومصدر الكربون وتركيزه، ومصدر النيتروجين العضوي واللاعضوي، إن معرفة هذه العوامل تعتبر من الأمور المهمة لتحفيز وتطوير وتحسين الظروف المزرعية المثلى؛ لتحقيق الإنتاجية القصوى للإنزيمات، والتي يمكن الاستفادة منها في العديد من المجالات التطبيقية، وأي تغيير في مثل هذه العوامل قد يسبب في تلف وفقدان النشاط التحفيزي للإنزيم (Wang and Shih, 1999; Abd Rahman *et al.,* 2005; Rani *et al.,* 2012; Saxena *et al.,* 2017).



شكل (5): علاقة الارتباط بين كفاءة التحلل في الفحص الأول وأقطار هالات التحلل في الفحص الثاني لإنزيمات proteases.



شكل (6): كفاءة التحلل في الفحص الأول وأقطار هالات التحلل في الفحص الثاني لإنزيمات proteases.

الاستنتاج

تلعب الفطريات القاطنة في التربة دورًا مهمّاً في إنتاج إنزيمات proteases، والتي يمكن الاستفادة منها في التحلل الحيوي لزيادة معدل تحلل المخلفات العضوية في التربة، وكذلك الاستفادة منها في العديد من المجالات التطبيقية سواء الصناعية أو الدوائية.

التوصيات

- تحديد تركيز إنزيمات proteases المنتجة من قبل الفطريات المعزولة.
- دراسة الظروف المثلى لإنتاج إنزيمات proteases، مثل درجة الحرارة ودرجة الحموضة المثلى، وفترة التحضين المناسبة، وأيضا تركيز المكونات الغذائية للبيئة كالكربون والنيتروجين اللازمة لإنتاج الإنزيم.
- تنقية إنزيمات proteases لاستخدامها في المجالات الصناعية والطبية.

References

Abd Al Halim, L. R., Hemeda, F., N., and Serag, A., M. (2024). Isolation, characterization, and screening of yeast biodiversity for multi-hydrolytic enzymes. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, 10, 474–484. https://doi.org/10.1007/s43994-023-00118-6

Abdulla, R., Ahmad, N. H., Sabullah, M. K., and Gansau, J. A. (2022). Characterization of wild type yeast isolated from Sabah soil for environmental friendly biofuel production. *Earth and environmental science*, 1103(1), 1-9. http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/1103/1/012024

Abd Rahman, R. N. Z., Geok, L. P., Basri. M., and Salleh. A. B. (2005). Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain k. Bioresource Technology, (96), 429-436. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.012

Abe, C. A. L., Faria, C. B., de Castor F. F., de Souza, S. R., dos Santos, F. C., da Silva, C. N., Tessmann, D. J., and Barbosa-Tessmann, I. P. (2015). Fungi isolated from maize (Zea mays L) grains and production of associated enzyme activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15328-15346. https://doi.org/10.3390/ijms160715328

Agu, K. C., Umeoduagu, N. D., Victor-Aduloju, A. T., Uwanta, L. I., Adepeju, D. M., Udenweze, E. C., Awari, V. G., Chidubem-Nwachinemere, N. O., Nwosu, J. C., and Udeh, K. C. (2023). Isolation and characterization of proteolytic enzyme produced from fungi. *Cognizance Journal of Multidisciplinary Studies*, 3(6), 485-493. http://dx.doi.org/10.47760/cognizance.2023.v03i06.033

de Souza, P. M., Bittencourt, M. L., Caprara, C. C., de Freitas, M., de Almeida, R. P., Silveira, D., Fonseca, Y. M., Ferreira Filho, E. X., Pessoa Junior, A., and Magalhães, P. O. (2015). A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337-346. https://doi.org/10.1590/S1517-838246220140359

Dias, D. R., de Abreu, C. M. P., Silvestre, M. P. C., and Schwan, R. F. (2010). In vitro protein digestibility of enzymatically pre-treated bean (Phaseolus vulgaris L.) flour using commercial protease and *Bacillus* sp. protease. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(1), 94-99. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010005000010

Florencio, C., Couri, S., and Farinas, C. S. (2012). Correlation between agar plate screening and solid-State fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme research*, 2012, 1-7. https://doi.org/10.1155/2012/793708

Haki, G. D., and Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89(1), 17-34. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6

Hussain, A., Mannan A., Zubair H. and Mirza B. (2010). Purification and characterization of alkaline proteases from *Aspergillus terreus*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 32(4), 497-504. https://www.researchgate.net/publication/286292953_Purification_and_Characterization_of_Alkaline_Proteases_from_Aspergillus_terreus

Kidd, S., Halliday, C. L., Alexiou, H. and Ellis, D. (2016). Description of medical fungi. (3rd edition). Australio: Newstyle printing. https://www.adelaide.edu.au/mycology/ua/media/1596/fungus3-book.pdf

Kumar, L., and Jain S. K. (2017). A review on environmental pollution mitigation by fungal proteases. *A Journal of Microbiology and Virology*, 7(3), 32-37. http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.23993.62561
Kumar, C. G., and Takagi, H. (1999). Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 17, 561-594. https://doi.org/10.1016/S0734-9750(99)00027-0
Maitig, A. M. A., Alhoot, M. A. M., and Tiwari, k. (2018). Isolation and screening of extracellular protease enzyme from fungal isolates of soil. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(4), 2059-2067. https://dx.doi.org/10.22207/JPAM.12.4.42
Malek, K., Norazan, M., Parasuraman, P., Othman, N. Z., Abd malek, R., Aziz, R., Aladdin, A., and El Enshasy, H. (2016). Production of Cysteine proteases by recombinant microorganisms: A critical review. Yeast. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 11(2), 35-40. https://dx.doi.org/10.9790/3008-1102043540
Maurya, S. P., Prakash, P. Y., and Bairy, I. (2011). A simplified touch tape preparation from tube cultures from microscopic examination of filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*, 86 (1), 128-129. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.015
Mohanasrinivasan, V., Shankar, V., Elizabeth, R., Soumya, A. R., and Subathra Devi, C. (2012). Isolation, screening and identification of protease producing fungi from rhizosphere soil and optimisation of pH, incubation time and inducer concentration for enhanced protease production. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(2), 784-793.
Oseni, O. A. (2011). Production of microbial protease from selected soil fungal Isolates. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 23 (2011), 28 - 34. https://www.ajol.info/index.php/njb/article/view/104525
Rani, M., Prasad, N., and Sambasivarao, K. R. S. (2012). Optimization of cultural conditions for the production of alkaline protease from a mutant *Aspergillus flavus* AS2. *Biology, Environmental Science,* 3(3), 565-576.
Rasheed, H. T. (2023). Analyzing the impact of a formula including a partial purified *Aspergillus niiger* protease. *Revista Bionatura,* 8(3), 1-6. http://dx.doi.org/10.21931/RB/CSS/2023.08.03.96
Sabotič, J., and Kos, J. (2012). Microbial and fungal protease inhibitors current and potential applications. *Applied Microbiology and biotechnology*, 93(4), 1351-1375. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3834-x
Schlander, M., Distler, U., Tenyer, S., Thines, E., and Claus, H. (2017). Purification and Properties of Yeast Proteases Secreted by *Wickerhamomyces anomalus* 227 and *Metschnikovia pulcherrima* 446 during Growth in a White Grape Juice. Fermentation, 3(1), 2. https://doi.org/10.3390/fermentation3010002
Sedrah, Z. T., Alshamary, E. I., and Nassri, S. Kh. (2021). Isolation and Identification of Alkaline Protease Producing *Aspergillus niger* from Iraqi soils. *Earth and Environmental Science*, 761, 1-9. https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/761/1/012117

Sharma, K. M., Kumar. R., Vats, S., and Gupta, A. (2014). Production, partial purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus aryabhata*i K3. *International Journal of Advances in Pharmacy Biology and Chemistry,* 3(2),1-9.
Smith, A. D., Datta, S. P., Howard, S. G., Campbell, P.N., Bentley R., and McKenzie, H. A. (1997). Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press, Oxford.
Sumantha, A., Larroche, C., and Pandey, A. (2006). Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 211-220.
Saxena, J., Choudhary, N., Gupta, P., Sharma, M., and Singh, A. (2017). Isolation and Characterization of Neutral Proteases Producing Soil fungus *Cladosporium* sp. PAB2014 Strain FGCC/BLS2: Process Optimization for Improved Enzyme Production. *Journal of Scientific and Industrial Research,* 76, 707-713.
Suryawanshi, H. K., and Pandya N. D. (2017). Screening, Identification of Alkaline Proteases Producing Fungi from Soil of Different Habitats of Amalner Tahsil [Maharashtra] and Their Applications. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology,* 5(3), 397-402. https://doi.org/10.3126/ijasbt.v5i3.18304
Shehada, W., Uraz, G., Demirel, R., and Hamamci, H. (2021). Proteolytic activity of *Aspergillus niger* strains isolated from soil. International Journal of Current *Microbiology and Applied Sciences*, 10(2), 67-75. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2021.1002.008
Syamisia, S., Idhan, A., Latifah, H., Noerfityani, N., and Akbar, A. (2021). Alternative medium for growth of endophytic fungi. *Earth and Environmental Science*, 886, 1-7. https://doi.org/10.1088/1755-1315/886/1/012045
Tekin, N., Cihan, A. Ç., Takac, Z. S., Tüzün C. Y., Tunc, K., and Çökmüş, C. (2012) Alkaline protease production of Bacillus cohnii APT5. *Turkish Journal Biology*, 36(4),430-440. https://doi.org/10.3906/biy-1104-6
UL-Haq, I., Mukhtar, H., and Umber, H. (2006). Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. *Journal of Agriculture and Social Sciences*, 2(1), 23-25.
Vishwanatha, K. S., Appu Rao A. G., and Singh, S. A. (2010). Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 129-138. https://doi.org/10.1007/s10295-009-0654-4
Verma, J., Modi, D., Sharma, R., and Saxena, S. (2011). Vital role of Alkaline Protease in Bio-industries: A review. *Plant archives*, 1(2), 1083-1092.
Wang, J. J., and Shih, J. C.H. (1999). Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22(6), 608-616. https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900667