Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org

شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

The Ninth International Scientific Academic Conference
Under the Title "Contemporary trends in social, human, and natural sciences"
المؤتمر العلمي الاكاديمي الدولي التاسع
تحت عنوان "الاتجاهات المعاصرة في العلوم الاجتماعية، الانسانية، والطبيعية"
17 – 18 يوليو – تموز 2018 - اسطنبول – تركيا
http://kmshare.net/isac2018/

Production, Purification and Characterization of Phytase from Fruit Bodies of local isolate of the basidiomycetes fungus and test its impact on Some biological *Pleurotus ostreatus* (11L) variables in Albino Rats

Abdullah A.Hasan [a] , Hawazn A. Al-Jobori [b]

[a] Department of Plant Protection – Collage of Agriculture – Tikrit University

drabdullah.has67@tu.edu.iq

[b a] Department of Biology – Collage of Science – Tikrit University

haadrbilogy@tu.edu.iq

Abstract: Among ten mushroom species, the local isolate , *Pleurotus ostreatus* (11L) was superior in production of endo-phytase which produce 0.66 unit/ml compare to other mushrooms ranged between 0.16 and 0.61 unit/ml. The optimum conditions for highest phytase activity from *P. ostreatus* (11L) were studied, wheat straw was the best substrate which gave highest Biological efficiency (BE) and phytase activity resulting in 71.07% and 0.63 unit/ml,respectively. The optimum spawn rates were 4 and 5% of the basis substrate dry weight, resulting in 0.68 unit/ml for each rates. the optimum temperature for fruitbodies development and phytase activity was 17ºC with highest activity which was 0.71 u/ml and decrease in phytase activity at 21 and 23ºC which reached to 0.57 and 0.51unit/ml, respectively. Biological efficiency of *P. ostreatus* (11L) and phytase activity was increased when wheat straw supplemented with (3%) of wheat bran which was 81.38% and 0.81unit/ml compared to71.07% and 0.63 unit/ml in control, respectively.In addition to

these conditions phytase activity increased to 0.88 unit/ml when fruit bodies of *P. ostreatus* (11L) harvested at mature stage (8 days from the pinning stage). Phytase produced from an edible mushroom *P.ostreatus* (11L) was purified in three steps, in precipitation with ammonium Sulfate (saturation ratio70%), the specific activity of phytase increased from 0.38u/mg protein in crude extract to 0.77 u/mg protein with purification of 2.03 fold and the enzyme yield was 92.05%, in ion exchange chromatography(DEAE-cellulose) step , specific activity was 3.6 u/mg protein with purification of 9.47 fold with a yield of 71. 82%. In the last step was purification with gel filtration chromatography using Sephadex G75 which gave the highest specific activity reached 7.5 U/mg with the purification folds arrived to 19.74 and enzyme yield was 42.61%.The results showed that there is only one band appeared in SDS-PAGE technique indicating a high purity of phytase enzyme , the purified phytase behaved as a monomeric protein with a molecular mass of about 25.12 kDa . The phytase was active over a broad range of incubation temperature (20 - 50ºC) , maximal activity was 0.83 unit/ml when phytase incubated at 30ºC while the enzyme has thermal stability over a broad range of temperatures (20-60ºC) for one h since more than 50 % of the relative enzyme activity was retained after incubation. Phytase was active over a broad range of pH (4- 8) , maximal activity was 0.81unit/ml when phytase incubated at pH 6 followed by 0.79 unit/ml when phytase incubated at pH 5 without significant differences between them. In addition , the enzyme was full stable at pH 5 and 6 for 1 h of incubation at 37^{o}C. phytase activity didn’t reach 70% at the other pH values. Hence it is inferred that the phytase was active over a broad range of pH 4-8. Among various metal ions, only $MgSO_4$ has a syregenic effect with phytase activity in which activity increased as residual activity was 117.36% , while CuSO4 and ZnCl were the most inhibitory agents for *Pleorotus sp. phytase* The effect of phytase purified from *P.ostreatus* (11L) compared to other sources such as commercial Phytase , fruitbodies and spent substrates of *P. ostreatus* on some growth parameters in female Albino Rats was studied. The results showed that highest growth parameters was in commercial phytase and purified phytase from *P.ostreatus* (11L) compared to control and other treatments. There were no loss and Mortality in rats weight in all treatments. Among the enzymes types, Gain in wt(g), and ADG (gday^{-1}), were the highest in 0.03% of purified phytase resulting in 17.4g and 0.50g/day , respectively with no significant differences at(P‹0.01) among these contents in commercial phytase and other purified phytase rates (1 and 2%). In blood biochemical parameters minimum In addition to that the lowest levels of AST and ALT were significantly recorded in purified and commercial phytase. All phytase types showed significant increase of blood minerals including P, K, Mg, Ca, Fe, Cl and Na while these minerals were decrease in rat feces.

Keywords: optics, photonics, imaging, electronic journals, Microsoft Word, templates.

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

انتاج وتنقية وتوصيف انزيم الفايتيز من الاجسام الثمرية لعزلة محلية من الفطر البازيدي (11L) *Pleurotus ostreatus* واختبار تاثيره في بعض المتغيرات البايولوجية في الجرذان البيض

عبد الله عبدالكريم حسن* و هوازن أحمد عبد الجبوري**

*جامعة تكريت / كلية الزراعة – قسم وقاية النبات

*البريد الإلكتروني : drabdullah.has67@tu.edu.iq

**جامعة تكريت / كلية العلوم- قسم علوم الحياة

** البريد الالكتروني: haadrbilogy@tu.edu.iq

الملخص

اظهرت العزلة المحلية للفطر (11L) *Pleurotus ostreatus* من بين عشرة انواع من الفطريات تفوقها بانتاج الفايتيز الداخل خلوي اذ بلغت الفعالية الانزيمية 0.66 وحدة/مل مقارنة بمدى 0.16-0.61 وحدة/مل للفطريات الاخرى. درست الظروف المثلى لانتاج اعلى فعالية انزيمية من الفطر (11L) *P.ostreatus*، ابدى وسط تبن الحنطة اعلى انتاجية للفطر(كفاءة احيائية) واعلى فعالية انزيمية للاجسام الثمرية النامية فيه اذ بلغت 71.07% و 0.63 وحدة/مل، على التوالي. وسجل معدل اللقاح الفطري عند 4 و5% اعلى فعالية انزيمية بلغت لكليهما 0.68 وحدة/مل فيما كانت الدرجة الحرارية 17 ^{0}م المثلى لنمو ثمار الفطر وتسجيلها لاعلى فعالية انزيمية بلغت 0.71 وحدة/مل ثم انخفضت الى 0.57 و0.51 وحدة/مل عند درجتي 21 و23م على التوالي. ، فضلا عن تلك الظروف فقد ارتفعت الفعالية الانزيمية الى 0.88 وحدة/مل عند حصاد الاجسام الثمرية عند مرحلة النضج (بعد 8 ايام من مرحلة التبرعم). اجريت تنقية الفايتيز من الفطر (11L) *P.ostreatus* بثلاث خطوات شملت الترسيب بملح كبريتات الامونيوم (نسبة الاشباع 70%) وفيها ارتفعت الفعالية النوعية من 0.38 وحدة/ملغم بروتين في المستخلص الخام الى 0.77 وحدة/ ملغم بروتين بعدد مرات التنقية 2.03 مرة وبحصيلة انزيمية 92.05% ، وعند خطوة كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام DEAE-cellulose بلغت الفعالية النوعية 3.6 وحدة/ملغم بروتين بعدد مرات التنقية 9.47 مرة وبحصيلة انزيمية 71.82% وفي اخر خطوة باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G 75 وصلت اعلى فعالية نوعية عند 7.5 وحدة/ ملغم بروتين بعدد مرات التنقية 19.74 مرة وبحصيلة انزيمية 68.18%, اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكريل

امايد المتعدد وجود حزمة بروتينية واحدة دليل على نقاوة الانزيم، بلغ الوزن الجزيئي للفايتيز المنقى 25.12 كيلودالتون. درس تأثيرالفايتيز المنقى من الفطر (11L) *P.ostreatus* مقارنة مع مصادر اخرى اذ شملت الفايتيز التجاري والاجسام الثمرية والوسط المستنفذ (بعد حصاد الاجسام الثمرية) في بعض معايير النمو في اناث الجرذان، واظهرت النتائج تسجيل اعلى مؤشرات النمو في معاملات الانزيم المنقى والانزيم التجاري مقارنة بالمعاملات الاخرى وبالسيطرة ولم يسجل اي فقدان في الوزن واي هلاكات في جميع معاملات التجربة, بين معاملات الانزيمات، سجلت اعلى زيادة وزنية واعلى معدل النمو اليومي في معاملة الانزيم المنقى عند التركيز 0.03% اذ بلغت 17.4 غم و 0.5 غم/يوم،على التوالي ، ، فضلا عن ادنى مستويات انزيمي AST و ALT سجلت في معاملات الانزيم المنقى والتجاري. واظهرت جميع تراكيز الانزيم المنقى والانزيم التجاري زيادة معنوية في معادن الدم التي شملت الفسفور والبوتاسيوم والمغنيسيوم والكالسيوم والحديد والكلور والصوديوم بينما سجلت ادنى تلك المعادن في براز الجرذان لتلك المعاملات.

المقدمة

يعمل انزيم التحلل المائي للفوسفات (الفايتيز) EC 3.1.3.8 او EC 3.1.3.8 على مادة الاساس ، الفايتيت، وبالتالي تحرر الفوسفات غير العضوية (Liu *et al.*, 1998; Woodzinski and Ullah, 1996). ، يحسن الفايتيز المايكروبي المضاف كمكمل غذائي في عليقة الخنازير الدواجن والاسماك بشكل فعال تجهيز الفسفور من الفايتيت من قبل هذه الحيوانات , كما يعزز الفايتيز التوافر البايولوجي للعديد من المعادن ولاسيما الفسفور والبروتين في معدة الحيوانات المجترة , ويقلل من التلوث بالمعادن المفرزة عن طريق فضلاتها (Augspurger *et al.*, 2003; Rutherfurd *et al.*, 2002; Olukosi *et al.*, 2007). فضلا عن اهمية الفايتيز في تصنيع اعلاف الحيوانات , فانه يستخدم في العديد من التطبيقات الصناعية مثل صناعة الغذاء , واعداد myo-inositol phosphate , وازالة السموم , وصناعة الورق وتحسين التربة والقضاء على التلوث البيئي (Soni, 2009).

الفايتيت (*myo*-inositol hexaphosphate) هو الشكل السائد لتخزين الفسفور في الحبوب و البذور الزيتية والخضراوات التي تمثل المكونات الرئيسية لاعلاف الحيوانات (Reddy *et al.*, 1982; Woodzinski and Ullah, 1996) . المجترات مثل الخنازير والدواجن والاسماك غير قادرة على استخدام الفايتيت بسبب المستويات الواطئة لفعالية الانزيم المحلل للفايتيت في قناتها الهضمية ولهذا فان الفسفور العضوي يضاف الى عليقتها من اجل تدعيم الفسفور (Bitar and Reinhold, 1972; Common, 1989) . وبالتالي الفايتيت المرتبط بالفوسفات يمر عبر الامعاء , وعلاوة على ذلك تعمل الفايتات ايضا باعتبارها عامل مضاد للتغذية في الحيوانات المجترة على خلب البروتينات و مختلف ,

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

ايونات المعادن التي يحتاجها الحيوان مثل Ca, Cu, Zn, ... , والخ . لذلك يخفض قابلية توافر هذه المواد الغذائية (Applegate *et al.*, 2003; Bohn *et al.*, 2008; Veum *et al.*, 2006).

تقوم جميع الاحياء المنتجة للفايتيز مع البيئات الزرعية السائلة المغمورة (الغاطسة) بانتاجه باستخدام التخمر ذو الكلفة العالية , في حين ركز باحثون اخرون على نوع الفطريات التي تدعى بفطريات العراهين او المشروم mushroom لانتاج الفايتيز كانزيم داخل خلوي , بسبب الكلفة الواطئة لتقنية انتاج المشروم . تم تنقية وتوصيف الفايتيز من انواع قليلة من المشروم مزروعة وصالحة للاكل وتضمنت *Peniophora lycii* ,*Cenporia sp.* , *Agrocybe pediades*, *Trametes pubenscence* , و *Agaricus bisporus*) Lassen, *et al.*, 2001; Collopy and *Volvariella volvacea*(Xu, *et* , (Zhang, *et al.*, 2013) *Lentenus edodes* (Royse,2004 .(*Flammulina velotipes*(Zhu, *et al.*, 2011 و ,*al.*, 2011)

في العراق اجريت دراسات سابقة في هذا المجال مرتبطة بتقييم الفايتيز التجاري حصرا لتحسين النمو والاداء الفسيولوجي للدواجن مع الفايتيز (Al-Baghdady and Al- Sa'aiddi, 2009; Abdel-Hameed, 2008). في حين لاتوجد اي دراسة في القطرلانتاج وتنقية وتوصيف الفايتيز من الفطريات .ونتيجة لعدم وجود دراسة سابقة لانتاج هذا الانزيم فضلا عن نجاح زراعة وانتاج زراعة فطريات المشروم وبكلفة منخفضة في المشروع الريادي /كلية الزراعة /جامعة تكريت, وكون فطريات المشروم مصدر للغذاء الامن والذي لا يحتوي على اي سموم . لهذه الاسباب تم تحقيق هذه الدراسة والتي هدفت الى :

1- غربلة عدد من فطريات المشروم الصالحة للاكل لتقييم كفاءتها في انتاج انزيم الفايتيز وانتخاب الفطر الاكفأ *Pleorotus ostereatus*(11L) لانتاجه .

2- تحسين ظروف تخمير الحالة الصلبة (الظروف الزراعية) لانتاج اعلى فعالية للفايتيز

3- تنقية وتوصيف الفايتيز .

4- تحديد دور الفايتيز المنقى في الجسم الحي لتحسين نمو الجرذان والاداء الفسيولوجي .

5- تقليل تكاليف تغذية الحيوانات .

المواد وطرائق العمل

انواع فطريات المشروم

استخدمت مجموعة من الفطريات البازيدية والكيسية المجهزة من مزرعة انتاج الفطريات الغذائية –كلية الزراعة/جامعة تكريت , والموضحة في الجدول (1):

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

جدول (1) انواع الفطريات المستخدمة في الدراسة الحالية

Mushroom species	**Source**	**Origin of strain**
Agaricus bisporus B62	Mushroom Research Unit/Tikrit University	Le lion Varrains,company France
A. campestris	Mushroom Research Unit/Tikrit University	Local isolate
Coprinus comatus	Mushroom Research Unit/Tikrit University	Local isolate
Ganoderma lucidium	Mushroom Research Unit/Tikrit University	Local isolate
Lentinus edodes	Mushroom Research Unit/Tikrit University	Mushroom Box company,UK.
Pleurotus ostreatus (White oyster-Whi)	Mushroom Research Unit/Tikrit University	Mushroom Box company,UK.
Pleurotus ostreatus	Mushroom Research Unit/Tikrit University	Local isolate (isolated in the present study)
Polyporus sp.	Mushroom Research Unit/Tikrit University	Local isolate
Terfezia claveryi (Black truffle)	Local market	Local isolate
T. hafizi (white truffle)	Local market	Local isolate

عزل وتشخيص الفطر البازيدي *Pleurotus ostreatus* من البيئة المحلية

اجري التحري على وجود الفطريات البازيدية من البيئة المحلية العراقية في محافظة صلاح الدين وتم عزل الفطر المحاري *P.ostreatus* ناميا على اشجار التفاح المحلية في منطقة سمرة ضمن ناحية العلم في قضاء تكريت محافظة صلاح الدين ،

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

احضرت ثمار الفطر الى مختبرات مزرعة الفطر النموذجية في جامعة تكريت / كلية الزراعة وباستخدام تقانة الزراعة النسيجية تم تحضير مزرعة نقية Pure colony . اعطي رمز لهذه العزلة (11L) *P. ostreatus* ، يعد هذا العزل الاول لهذه العزلة والدراسة الحالية هي الوحيدة التي استهدفت انتاج وتوصيف وتشخيص هذه العزلة وانتاج وتوصيف انزيم الفايتيز داخل خلوي من الاجسام الثمرية لهذه العزلة.

استخلاص الفايتيز

تمت مجانسة 100غم من الاجسام الثمرية لكل نوع فطري باستخدام محلول كاربونات الامونيوم المنظم (0.1M) ذو الرقم الهيدروجيني 8 باستخدام الهاون الخزفي ثم رشح باستخدام ورق الترشيح نوع واتمان رقم 1 ونبذ مركزيا بسرعة 5000 دورة بالدقيقة لمدة 25 دقيقة وجمع الرائق الذي اعتبر مصدرا للانزيم الخام (Xu *et al.*, 2011).

تقدير فعالية الفايتيز

قدر فعالية الفايتيز عن طريق تحضين مزيج التفاعل المكون من 0.1 مل من المستخلص الانزيمي و 0.9 مل من المادة الاساس فايتات الصوديوم (2 ملي مولر) في 0.1 مولاري من (Tris-HCl buffer (pH 7.0 وحضن مزيج التفاعل بدرجة 37°م لمدة 15 دقيقة. تم ايقاف التفاعل باضافة 0.75 مل من ثلاثي كلورو حامض الخليك بتركيز 5%، تم تقدير الفوسفيت المتحررة عند طول موجي 700 نانوميتر بعد اضافة 1مل من محلول اللون (المكون من خليط من اربعة احجام من 2,5% محلول موليبيدات الامونيوم في 5,5% حامض الكبريتيك مع حجم واحد من2,5% من محلول كبريتات الحديدوز). قدرت فعالية الفايتيز اعتمادا على منحنى الفوسفيت القياسي ، وعرفت الوحدة الانزيمية بانها كمية الانزيم المطلوبة لتحرير 1 مايكرومول من الفوسفيت بالدقيقة الواحدة تحت ظروف التفاعل(Zhu, *et al.*, 2011)

حسبت الفعالية النوعية لانزيم الفايتيز كما في المعادلة ادناه

الفعالية النوعية (وحدة/ملغم) =فعالية الانزيم(وحدة /مل) / تركيز البروتين (ملغم/مل) .(Berg, *et al.*, 2002)

تقدير تركيز البروتين

قدر البروتين حسب طريقة (Bradford, 1976) واستخرج التركيز من معادلة المنحنى القياسي المحضر باستخدام البومين المصل البقري

تحضير لقاح الفطر *Pleurotus ostereatus*11L وانتاج اجسامه الثمرية

استخدمت الطرائق التي ذكرها Hassan ، (1996) في تحضير اللقاح الفطري وانتاج الاجسام الثمرية اذ نقع قش الحنطة في الماء لليلة كاملة . ومن ثم تم التخلص من الماء الزائد (نسبة رطوبة الوسط 65%) وتم بسترتها على درجة 70 درجة مئوية ولمدة 6 ساعات , لقح قش الحنطة بلقاح الفطر النامي في الدوارق بنسبة 2% , وضع الخليط في اكياس البولي اثيلين

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/
Available online at http://proceedings.sriweb.org

(30×50 سم) و حضن على درجة 25 درجة مئوية من اجل تكوين الاجسام الثمرية . بعد 21 يوما (بعد نمو كل المايسيليوم) , تم تقليل درجة الحرارة الى 16 درجة مئوية مع رفع نسبة الرطوبة الى 90% و تطبيق دورة ضوئية (6 ساعات ضوء : 6 ساعات ظلام) باستخدام مصابيح الفلورسنت الاعتيادية ذات الضوء الابيض البارد . بعد ظهور الاجسام الثمرية , حسب زمن ظهور الاجسام الثمرية , تركيز البروتين فيها والفعالية الحيوية حسب المعادلة :

الكفاءة الاحيائية = وزن الاجسام الثمرية / الوزن الجاف للوسط (وسط النمو الصلب) ×100%

حساب المحتوى البروتيني في الاجسام الثمرية

تم حساب المحتوى البروتيني اعتمادا على طريقة كيلدال
kjeldahl's method (A.O.A.C. , 2004)

دراسة الظروف المثلى لانتاج انزيم الفايتيز

تضمنت الظروف الزراعية كل من الوسط الامثل و نسبة اللقاح و نوع المدعم العضوي المضاف (اضافة كسب ونخالات) و نسبة المدعم المضاف و درجة حرارة الاثمار و نضج الاجسام الثمرية .

تقييم انواع مختلفة من الاوساط الصلبة لانتاج الفايتيز

تم استخدام اوساط صلبة مختلفة رخيصة الثمن ومتوفرة في البيئة العراقية لتنمية الفطر *P. ostreatus* 11L وانتاج انزيم الفايتيز وتضمنت (قش الحنطة , قش الشعير , مجروش القصب البري , و مجروش اكواز الذرة) , هذه الاوساط اعدت كل على حدا وذلك بنقعها في الماء لمدة 12 ساعة , وتم تنمية الاجسام الثمرية فيها كما ذكر سابقا , بعدها تم حساب زمن الحضن , تركيز البروتين , و الفعالية الحيوية .

المدعمات العضوية

تضمنت المدعمات العضوية نخالة الحنطة و طحين الحنطة وطحين الذرة و طحين الشعير و طحين فول الصويا والتي خلطت مع وسط قش الحنطة بنسبة 2% وتم بسترتها ولقحت بلقاح الفطر *P. ostreatus* 11L كما ذكر سابقا . بعد انتاج الاجسام الثمرية , استخلص الانزيم وتم حساب فعاليته الانزيمية.

تاثير درجة الحرارة

ثبتت درجة حرارة نمو الغزل الفطري (المايسليوم –المرحلة الخضرية) عند 26± 2° م حسب (Hassan, 1996) وفي هذه الدراسة اجري تقييم تاثير درجة الحرارة اللازمة لتحفيز ظهور الاجسام الثمرية (المرحلة التكاثرية) من خلال تحضين وسط انتاج الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11L على (23,21,19,17) درجة مئوية , بمعدل 3 مكررات لكل درجة حرارية . بعد فترة التحضين لمدة 21 يوما , تم استخلاص الانزيم وقيست فعاليته كما ذكر سابقا .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

تنقية الفايتيز

تم استخلاص انزيم الفايتيز من الفطر *P.ostreatus*11L كما في الخطوات التالية :

الترسيب بكبريتات الامونيوم

تم ترسيب انزيم الفايتيز بواسة كبريتات الامونيوم (70%) في حمام ثلجي . مع التحريك المستمر للخليط لمدة 30-40 دقيقة . بعدها نبذ مركزيا بجهاز الطرد المركزي المبرد على 4 درجة سيليزية , 5000 دورة لمدة 30 دقيقة . غسل الراسب بكمية من محلول البفر (فوسفيت بفر 7 0.1M/pH) , بعدها تمت ديلزته لثلاث مرات بالماء المقطر ولمدة 24 ساعة , وفي نهاية هذه الخطوة تم حساب فعالية الفايتيز وتركيز البروتين .

كروماتو كرافيا التبادل الايوني

تحضير DEAE سليلوز

تم تحضير عمود DEAE سليلوز (20×2,5سم) اعتماد على (1972) Whitaker and Bernard , وضعت العينة الناتجة من خطوة الترسيب بكبريتات الامونيوم بهدوء على سطح المبادل DEAE – سيليلوز ,اجريت عملية الغسل باستخدام المحلول المنظم اعلاه ثم اجري الاسترداد بمحلول كلوريد الصوديوم (0-0,5)مولاري في البفر نفسه ((فوسفيت بفر 7 0.1M/pH)) جمعت الاجزاء المعزولة بمعدل جريان 3مل /جزء , ثم قدرت الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر وكذلك قدرت الفعالية الانزيمية للفايتيز لكل جزء . الاجزاء المعزولة لفعالية الفايتيز جمعت ووضعت في الثلاجة عند درجة 4 درجة مئوية لحين استخدامها في الخطوة اللاحقة من التنقية .

كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي

تحضير عمود السيفادكس G-75

استخدم عمود السيفادكس G-75 بابعاد (50×1,5) سم , حضر السيفادكس G-75 (pharmacia Fine chemicals) من خلال عمل معلق من 25 غم من جل السيفادكس في 500 مل محلول بفر الفوسفيت (pH7 ، بعد موازنة العمود , وضع 5مل من العينة المستحصلة من الخطوة السابقة بلطف على سطح الهلام ومن ثم تم الاسترداد بواسطة محلول (فوسفيت بفر 7 0.1M/pH) مع معدل جريان 20 مل / ساعة (3 مل لكل جزء) . ثم قدرت الامتصاصية على طول موجي 280 نانوميتر وكذلك قدرت الفعالية الانزيمية للفايتيز لكل جزء . الاجزاء المعزولة للفعالية الانزيمية للفايتيز عزلت ووضعت في الثلاجة على درجة 4 درجة مئوية للدراسات اللاحقة .

توصيف الفايتيز المنقى

درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم الفايتيز

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/
Available online at http://proceedings.sriweb.org

قدرت درجة الحرارة المثلى للفعالية القصوى لانزيم الفايتيز وذلك باجراء التفاعل الانزيمي (الانزيم مع مادة التفاعل) في درجات حرارية مختلفة (20-50) درجة سيليزية مع 5 قراءات تحت ظروف اختبار الانزيم وسجلت فعالية الانزيم ازاء كل درجة.

الاس الهيدروجيني الامثل لفعالية انزيم الفايتيز

قدرت قيم الاس الهيدروجيني المثلى للفعالية القصوى لانزيم الفايتيز وذلك باجراء التفاعل الانزيمي (الانزيم مع مادة التفاعل) عند قيم اس هيدروجيني مختلفة (4-8) (من محاليل فوسفيت وسترات والترس) وسجلت فعالية الانزيم ازاء كل قيمة.

استقرارية الانزيم عند درجات حرارة مختلفة

تم دراسة الثباتية الحرارية للفايتيز بواسطة تحضين الانزيم على درجات حرارة مختلفة (20-80) درجة مئوية بفارق 10 درجات مئوية, ثم اجري التبريد السريع باستخدام محلول ثلجي لوقف تاثير الحرارة واجري تقدير الانزيم بعد ساعة واحدة . تم اعتماد فعالية الانزيم للنماذج الاخرى والمحفوظة بدرجة حرارة 4 درجة مئوية كمجموعة سيطرة .ثم قدرت الفعالية المتبقية للانزيم

ثباتية انزيم الفايتيز عند قيم اس هيدروجيني مختلفة

تم تحديد ثباتية انزيم الفايتيز على مدى من الاس الهيدروجيني بقياس فعالية الانزيم المتبقية بعد تحضين الانزيم في محاليل منظمة مختلفة من الاس الهيدروجيني (4-8) مع زيادة 1 ولمدة ساعة واحدة .

حساب الوزن الجزيئي لانزيم الفايتيز

تم تقدير الوزن الجزيئي لانزيم الفايتيز المنقى بواسطة الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريل امايد -كبريتات الصوديوم دودوسايل SDS – PAGE وحسب (1970) Laemmli ، اذ تم الترحيل الكهربائي لكل من الانزيم المنقى والبروتينات القياسية فضلا عن صبغة البروموفينول الزرقاء، استخدمت كل من البروتينات القياسية (بتركيز 0.002 غم/مل) اللايسوزايم (وزنه الجزيئي 14300 دالتون) و البومين البيض (وزنه الجزيئي 43000 دالتون) و البومين المصل البقري (وزنه الجزيئي 68000 دالتون) و انزيم الكالاكتوسايديز (وزنه الجزيئي 116250 دالتون) وحسبت الحركة النسبية Relative mobility (Rm) لحزم البروتينات القياسية وللإنزيم من المعادلة الآتية :

$$\text{الحركة النسبية (Rm)} = \frac{\text{المسافة التي قطعتها الحزم البروتينية (سم)}}{\text{المسافة التي قطعتها الصبغة (سم)}}$$

استخرج الوزن الجزيئي للإنزيم برسم العلاقة بين لوغاريتم الأوزان الجزيئية للبروتينات القياسية مقابل حركتها النسبية في الهلام .

تقدير الفعالية المتبقية للانزيم

تمثل الفعالية المتبقية النسبة المئوية لفعالية الانزيم للعينة (وحدة / مل) بالنسبة لفعالية الانزيم لمجموعة السيطرة

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/
Available online at http://proceedings.sriweb.org

الفعالية المتبقية للانزيم %= فعالية النموذج (وحدة/مل) / فعالية مجموعة السيطرة (وحدة/مل) ×100 .

دراسة تطبيقية في داخل جسم الكائن الحي (*IN VIVO*) للفايتيز المنقى من سلالة الفطرالغذائي *P. ostreatus* 11 L

اعدت 33 من اناث الجرذان البيض تراوحت اوزانها بين 175,3-184 غم والمجهزة من البيت الحيواني لكلية الطب / جامعة السليمانية . قسمت عشوائيا الى 11 مجموعة وكل مجموعة تضمنت 3 حيوانات وضعت في اقفاص فولاذية بابعاد (21×19×25) سم . وضعت الجرذان في ظروف قياسية (12ساعة دورة ضوء وظلام , 25± 3 درجة مئوية ,). تمت تغذية الجرذان مع المعاملات التالية مع توفر الماء بشكل مستمر وشملت معاملات مجاميع الجرذان البيض استخدام المكونات التالية (%) (الفايتيز التجاري (0.025) ، الفايتيز المنقى من الفطر *P. ostreatus* 11L بنسب 0.01 و 0.02 و 0.03) ، الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11L والوسط المتبقي للفطر *P. ostreatus* 11L بنسب (1 و 2 و3)،على التوالي . كانت المعاملات كالاتي :

مجموعة الفايتيز التجاري:

اذ تم مزج العليقة بالفايتيز التجاري بالنسبة القياسية الموصى بها من قبل الشركة المجهزة **FarmazymeR Phytase 2400, Farmavet Ilac San. Ve Tic. –Istanbul-Turkiye**

مجموعة الفايتيز المنقى في هذه الدراسة:

اذ تم مزج العليقة بالفايتيز المنقى وبالنسب المذكوره اعلاه.

مجموعة الاجسام الثمرية : استخدمت الاجسام الثمرية كونها المصدر الرئيس للانزيم اذ خلطت باستخدام الخلاط الكهربائي ومزجت مع العليقة بالنسب المذكورة اعلاه.

مجموعة الوسط المتبقي للفطر: استخدم الوسط المتبقي بعد حصاد الاجسام الثمرية كونه غنيا بخيوط الفطر وهي الاساس بتكوين ثمار الفطر الحاوية على الانزيم ، مزجت مع العليقة بالنسب المذكورة اعلاه.

تم الحصول على العليقة القياسية من البيت الحيواني /جامعة السليمانية , تم قياس الوزن الابتدائي بعد اليوم الاول للتغذية وفي نهاية كل اسبوع ولمدة خمسة اسابيع . اضافة الى ذلك تم رفع فضلات الجرذان للدراسات والتحاليل الاخرى . خلال فترة التغذية حسبت المعايير التالية :

استهلاك العليقة حسبت من خلال رفض وقبول تناول العليقة وقدرت وزنيا .

الزيادة /النقصان في الوزن (غم)=الوزن النهائي (غم)- الوزن الابتدائي(غم)

معدل النمو اليومي (غم/ يوم) = الزيادة في الوزن (غم) / فترة التجربة الكلية (بالايام)

نسبة الهلاكات(%)= 100 – عدد الحيوانات الباقية على قيد الحياة / العدد الكلي للحيوانات ×100

الاجسام الثمرية كونها المصدر الرئيس للانزيم خلطت باستخدام الخلاط الكهربائي ومزجت مع العليقة.

جمع الدم وعزل المصل

في اليوم الاخير للتجربة , سحب الماء والغذاء من الحيوانات ليوم كامل وتم وزنها , تم تخدير الحيوانات في حاوية مشبعة ببخار الكلوروفورم , تم ذبحها ووضع الدم في انابيب (للتحاليل البايوكيميائية) والتي نبذت مركزيا على 3000 دورة ولمدة 15 دقيقة من اجل الحصول على المصل والذي وضع عند درجة –20 درجة مئوية لحين اجراء التحاليل (Tietez, 2005).

التحاليل البايوكيميائية

تم الحصول على العدد القياسية من شركة Biolabo(France) والتي استخدمت لقياس الالبومين والكلوبيولين (ملغم/ديسيلتر) . واستخدمت عدة قياسية اخرى من (Spain) Spinreact لقياس قيمة الكلوكوز في حين قيس كل من الكولسترول والكرياتينين واليوريا (ملغم/ديسيلتر) بواسطة عدة قياسية من شركة (Tunisia) Biomaghreb . التحاليل اجريت بواسطة جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer حسب تعليمات كل شركة وكما موضح في (Titez, 2005) . وتم قياس فعالية كل من اسبارتيت امينو ترانسفيريز(ALT) و الالكلاين فوسفاتيز (ALP) بواسطة عدة فحص من Randox laboratories Ltd., UK , وذلك باعتماد التعليمات الموجودة فيه.

تقدير المعادن في الدم

تضمنت المعادن المقاسة في دم الجرذان كل من P, Fe, Mg, Ca, K, Na,Cl والتي قيست باستخدام جهاز تحليل الالكتروليتات وذلك باستخدام عدة قياسية لكل معدن .

تقدير المعادن في فضلات الجرذان

تضمنت المعادن المقاسة في دم الجرذان كل من Mg, Fe, Zn Na , K وذلك باستخدام جهاز Fast Sequential Atomic absorption Spectrometer نوع Varian ,وقيس النيتروجين حسب طريقة colorimetric method باستخدام جهاز Flame Emission Spectrophotometer , وقيس الفسفور باستخدام جهاز Micro Kjeldahl (A.O.A.C. , 2004)

التحاليل الاحصائية

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

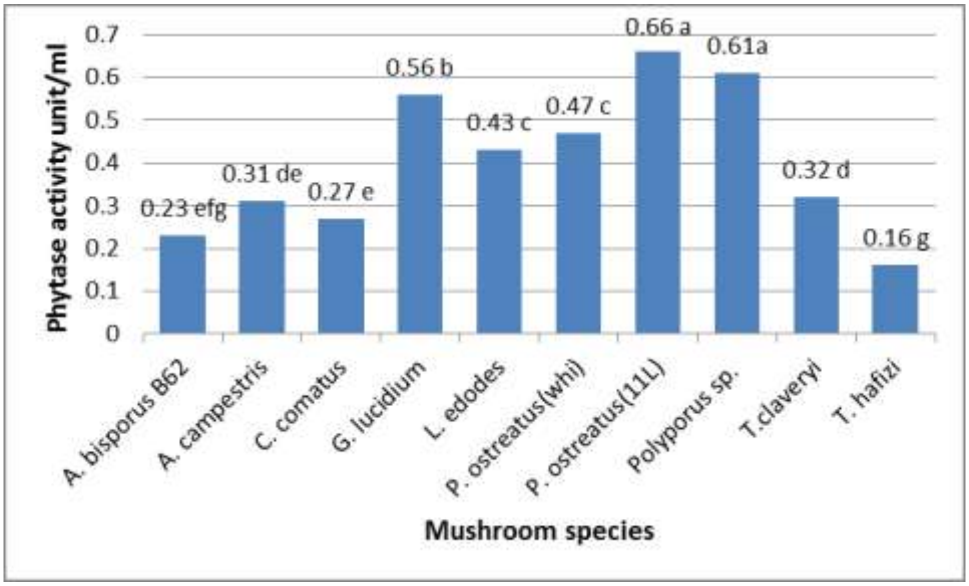
اجري التحليل الاحصائي لنتائج البحث باستخدام تحليل التباين (ANOVA) باستخدام برنامج SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 19.0, IBM Corporation Somers, NY, USA ، و قورنت بين المتوسطات باستخدام الفرق المعنوي الاصغر (LSD) و دنكن متعدد الحدود (عند مستوى 0.01 و 0.05) حسب نوع التجربة.

النتائج والمناقشة:

غربلة انواع مختلفة من الفطريات لانتاج الفايتيز

يوضح الشكل (1) ان الفطر *Pleurotus ostreatus11L* تفوق في انتاج الفايتيز اذ انتج 0.66 وحدة/ مل , تلاه الفطر *Polyporus sp.* اذ انتج 0.61 وحدة/ مل (دون اي فروق معنوية بينهما). اقل انتاجية للفايتيز كانت 0.16 م وحدة/ مل من الفطر *T. hafizi* , بينما تراوحت فعالية الفايتيز للفطريات المنتجة الاخرى بين 0.23 و 0.56 وحدة/مل, واستنادا لهذه النتائج انتخب الفطر *P. ostreatus* الاعلى انتاجا للانزيم لتجارب انتاج الفايتيز الامثل الاخرى تختلف الفطريات في تركيبها الوراثي , لذا فالفايتيز كاي منتج حيوي يشفر ببعض الجينات . كذلك الفطريات التي لها جينات الفايتيز يتم تشفيرها , بينما تلك التي لا يكون لها جيناته لا يمكنها انتاجه . ولوحظ ان اعلى تعبير جيني كان *G.* *leucidium* , *polyporus sp.* , *P. ostreatus*11L وبما ان سلالة الفطر المحلية *P. ostreatus*11L عزلت لاول مرة في هذه الدراسة فان جميع دراسات انتاج الانزيم وتنقيته وتوصيفه تنجز لاول مرة ايضا. ويمكن ايضا ان يعزى الاختلاف في انتاج الفايتيز من الفطريات المدروسة الى ظروف انتاج اجسامها الثمرية كنوع الوسط والرقم الهيدروجيني pH و درجة الحرارة ونوع المدعمات في الوسط .. الخ التي سيتم تعييرها في هذه الدراسة للوصول الى اعلى فعالية انزيمية.

.



شكل (1) فعالية الفايتيز(وحدة/مل) من الانواع الفطرية قيد الدراسة

تحديد الظروف المثلى لانتاج الفايتيز من الفطر 11L *Pleurotus ostreatus*

الوسط الصلب

اختبرت خمسة اوساط صلبة (مخلفات رخيصة الثمن ومتوفرة محليا ي البيئة العراقية) لانتاج الفايتيز من الفطر *Pleurotus ostreatus* 11L والتي تضمنت قش الحنطة , قش الذرة , قشور الرز, قش القصب , قش الشعير, والجدول (2) يبين تاثير تلك الاوساط والنسبة المئوية للبروتين , وزمن انتاج ثمار الفطر , والنسبة المئوية للكفاءة البايولوجية , وفعالية انزيم الفايتيز , وبينت النتائج ان الاثمار المبكر للفطر 11L *Pleurotus ostreatus* كان 24 يوما (من التلقيح) عندما زرع في وسط قش الحنطة والذرة و قش القصب , الحد الاقصى للمحتوى البروتيني لقش الحنطة ومجروش الذرة كان 0.72, 0.70% بينما كان الحد الادنى 0.51% في وسط قش القصب وقش الشعير . انتاجية الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus*11L تم تحديدها ككفاءة حيوية متفوقة في الاجسام الثمرية الماخوذة من وسط قش الحنطة اذ اعطت 71.07%, وبلغ الحد الادنى للكفاءة الحيوية كان 66% في الاجسام الثمرية النامية على قشور الرز , واعلى فعالية للفايتيز كانت 0.63 وحدة/ مل في الاجسام الثمرية النامية في وسط قش الحنطة وتلاه مجروش الذرة 0.60 وحدة/ مل (بدون اي فروق معنوية بينهما). في حين ادنى فعالية انزيمية كان 0.43 وحدة/ مل في الفطر *P. ostreatus*11L النامي في وسط قش القصب.

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

اعطى وسط قش الحنطة اعى كفاءة حيوية و اعلى فعالية انزيمية, وهذا يثبت ان مكونات الوسط الزرعي تؤدي دورا مهما في نمو الفطر وانتاج الانزيم. ان اختلاف الوسط الصلب في مكوناته الكيميائية كالسليلوز , الهيمي سيليلوز و اللكنين و البروتينات و اللبيدات و المعادن وغيرها وحسب احتياجات الفطر الغذائية ينعكس ذلك على كافة الفعاليات الحيوية للفطر (Hassan, *et al.*, 1996) ومن تلك الفعاليات هي زمن ظهور الاجسام الثمرية , الكفاءة الحيوية و كمية الانزيم المنتج . واستنادا الى النتائج فان قش الحنطة يعد افضل وسط ليس فقط في انتاج الاجسام الثمرية ذات الفعالية الانزيمية العالية وانما في انتاجية الفطرنفسه (كفاءة حيوية) تؤدي الى ان انتاج كمية اكبر من الانزيم .

جدول (2) تقييم اوساط صلبة مختلفة لاوقات انتاج الاجسام الثمرية , الكفاءة الحيوية , و انتاج انزيم الفاايتيز من الفطر *P. ostreatus*11L

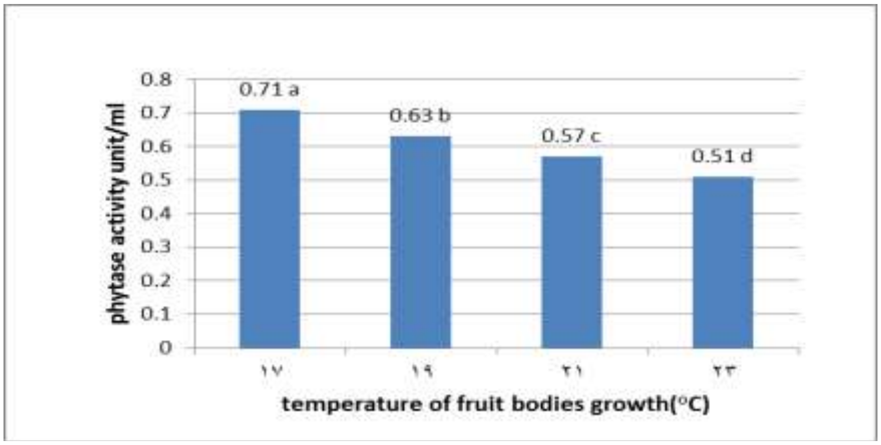
الوسط الصلب	محتوى البروتين(%)	زمن انتاج الاجسام الثمرية(بالايام)	الكفاءة الحيوية(%)	فعالية الفايتيز (unit/ml)
قش الحنطة	0.72 a	24 b	71.07 a	0.63 a
قش الذرة	0.70 a	24 b	68.12 b	0.60 a
قشور الرز	0.64 b	26 c	66.0 c	0.51 b
قش القصب البري	0.51 c	24 a	68.42 b	0.43 c
قش الشعير	0.51 c	24 a	68.0 b	0.50 b

تشير الحروف الابجدية المتشابهة الى عدم وجود فروق معنوية والمختلفة الى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى 0.05

درجة الحرارة المثلى لانتاج الفايتيز

درس تاثير درجة حرارة تكوين الاجسام الثمرية على فعالية انزيم الفايتيز بمعدل (17-23ْ م) وبينت النتائج في الشكل (2) زيادة في فعالية انزيم الفايتيز عن انخفاض في درجة حرارة تكوين الاجسام الثمرية , درجة الحرارة المثلى لنضج الاجسام الثمرية وفعالية انزيم الفايتيز كانت 17 °م, وسجلت عندها اعلى فعالية انزيمية 0.71 وحدة/ مل , و انخفضت فعالية انزيم الفايتيز عن هذا المعدل عند درجة حرارة 21 و 23ْ م التي سجلت فعالية انزيمية 0.51, 0.57 وحدة/ مل ،على التوالي . تتأثر العمليات الحيوية لانتاج اي منتج حيوي بدرجة الحرارة ولهذا السبب , واستنادا للنتائج فانه يبدو ان الانتاج العالي للفايتيز من سلالة الفطر *P. ostreatus 11L* كان عند درجات حرارة منخفضة (اقل من 20ْ م). وهذا يؤدي الى الاعتقاد بان

مسار انتاج هذا الانزيم مرتبط مع تحفيز انتاج الاجسام الثمرية . دراسات (Chang and Miles, 2004; Hassan, 1996) , سجلت ان افضل تحفيز لانتاج الاجسام الثمرية كان بين (16-19 °م).ان دراسة تاثير درجات الحرارة في هذه الدراسة كانت في تكوين الاجسام الثمرية (مرحلة النمو التكاثرية) وليس في نمو الخيوط الفطرية (مرحلة النمو الخضرية) اذ ثبتت درجة الحرارة لمرحلة النمو الاخيرة والسبب هو ان الانزيم المنتج هو داخل خلوي اي داخل انسجة الاجسام الثمرية للفطر. ان عدد من الدرسات السابقة استعرضت من قبل Olivoto واخرون ،2017 بأن سبب انتاج الانزيم عند الدرجات الحرارية المنخفضة قد يعزى الى ان انخفاض درجات الحرارة التي تؤدي الى تحفيز التعبير الجيني gene expression للجينات النوعية المهمة في المسار الايضي لبناء بعض الانزيمات.



شكل (2) تاثير درجة الحرارة على انتاج الفايتيز من ثمار الفطر *P. ostreatus*11L

تشير الحروف الابجدية المتشابهة الى عدم وجود فروق معنوية والمختلفة الى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى 0.05

تاثير اضافة المدعمات الى الوسط الزرعي في انتاج انزيم الفايتيز

تاثير عدد من المدعمات الغذائية في انتاج انزيم الفايتيز والتي شملت اضافة مواد رخيصة متوفرة محليا مثل نخالة الحنطة ومسحوق الذرة الصفراء ومسحوق الحنطة و مسحوق الشعير ومسحوق فول الصويا بنسبة 2% (من اساس الوزن الجاف للوسط). ويبين الجدول (3) تاثير اضافة هذه المواد العضوية و النسبة المئوية لمحتواها البروتيني في زمن انتاج الاجسام الثمرية , والكفاءة الاحيائية و انتاجية الفايتيز ، اذ لوحظ ان زمن انتاج الاجسام الثمرية كان مبكرا (22 يوما) عند اضافة نخالة الحنطة , تلاها اضافة مسحوقي الذرة و الحنطة اذ انتجت الاجسام الثمرية بعد 24 يوما, هذا ربما يعزى الى طبيعة المادة المدعمة ومكوناتها اذ تتطلب وقت اكثر لتحللها وللاستفادة من قبل الفطر . اعطت نخالة الحنطة و مسحوق فول الصويا كفاءة احيائية عالية اذ ابلغت 76.76 و 74.42% على التوالي (بدون اي فروف معنوية بينهما).

بينت النتائج ان افضل فعالية للانزيم لوسط قش الحنطة المدعوم نخالة الحنطة اذ اعطت فعالية 0.74 وحدة/ مل, تلتها اضافة مسحوق فول الصويا التي اعطت فعالية انزيمية 0.73 وحدة/ مل (بدون اي فروق معنوية بينهما).

بينت النتائج عدم وجود علاقة بين المحتوى البروتيني للمادة المدعمة لوسط قش الحنطة مع فعالية الفايتيز , المحتوى البروتيني كان اعلى (9.82, 5.78 %) في وجود مسحوقي فول الصويا والذرة , من نخالة الحنطة (5.4%) لكن فعالية الفايتيز عند اضافة نخالة الحنطة كانت اعلى من مسحوقي فول الصويا و الذرة كما بينه الجدول (3) . واستنادا الى هذه النتائج فقد اختيرت نخالة الحنطة كافضل مادة مدعمة لانتاج اعلى من الفايتيز في اجسام ثمار الفطر المدروس. كان لاضافة نخالة الحنطة في هذه الدراسة تاثير معنوي في زيادة انتاج انزيم الفايتيز وهو السبب الذي ربما يعزى اليه كون هذا المصدر البروتيني يلائم التصنيع الحيوي لانزيم الفايتيز من الفطر *P. ostreatus*

جدول (3) تاثير اضافة مدعمات مختلفة الى وسط انتاج الاجسام الثمرية (قش الحنطة) على انتاج انزيم الفايتيز من الفطر *P. ostreatus*11L

المدعمات	محتوى البروتين(%)	زمن انتاج الاجسام الثمرية(بالايام)	الكفاءة الاحيائية(%)	فعالية الفايتيز (unit/ml)
نخالة الحنطة	5.4 bc	22 c	76.76 a	0.74 a
دقيق الذرة	5.78 b	24 b	71.30 b	0.67 b
دقيق الحنطة	5.31 bc	24 b	69.16 b	0.65 bc
دقيق الشعير	4.06 c	26 a	65.50 c	0.64 c
دقيق فول الصويا	9.82 a	27 a	74.42 a	0.73 a
السيطرة	0.72 d	24 b	71.07 b	0.63 c

تشير الحروف الابجدية المتشابهة الى عدم وجود فروق معنوية والمختلفة الى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن متعدد الحدود تحت مستوى 0.05

تبين الصورة في الشكل (3) انتاج العزلة المحلية *P. ostreatus*11L لاول مرة مختبريا في وسط قش الحنطة المدعم بـ 3% نخالة حنطة وبنسبة لقاح 4% وبدرجة حرارة تحفيز الاثمار17م (كافضل ظروف زراعية لانتاج الفايتيز من اجسام ثمار هذا الفطر)

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

شكل (3) انتاج الاجسام الثمرية التي نميت مختبريا للفطر 11L *P. ostreatus* في وسط قش الحنطة المدعم بـ 3% نخالة حنطة وبنسبة لقاح 4% وبدرجة حرارة تحفيز الاثمار17م (كافضل ظروف زراعية لانتاج الفايتيز)

استخلاص الفايتيز وتنقيته

استخلاص الفايتيز

تم استخلاص الفايتيز بالمجانسة من الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11 L المنمى على وسط قش الحنطة والمدعم بكسبة نخالة الحنطة بنسبة 3% ودرجة 17°م لمرحلة نضج الاجسام الثمرية باستخدام محلول كاربونات الامونيوم احادية الهيدروجين المنظم pH 6 لاستخلاص انزيم الفايتيز الداخل خلوي , واعتباره انزيم خام اعتمادا على تلك الظروف . والنتائج في الجدول(4) بينت ان فعالية الفايتيز كانت 0.88 وحدة/ مل مع فعالية نوعية 0.38 وحدة/ ملغ بروتين.

التنقية

تم تنقيته انزيم الفايتيز المنتج من الفطر الغذائي *P.ostreatus* 11L على ثلاث خطوات شملت الترسيب باستعمال ملح الامونيوم (بنسبة اشباع 70%), وفيها ارتفعت الفعالية النوعية للفايتيز من 0.38 وحدة/ ملغ بروتين في الانزيم الخام الى 0.77 وحدة/ ملغ بروتين وبلغ عدد مرات التنقية 2,03 ضعف وبلغ ناتج حصيلة الانزيم 92,05% كما يوضحه الجدول .(4)

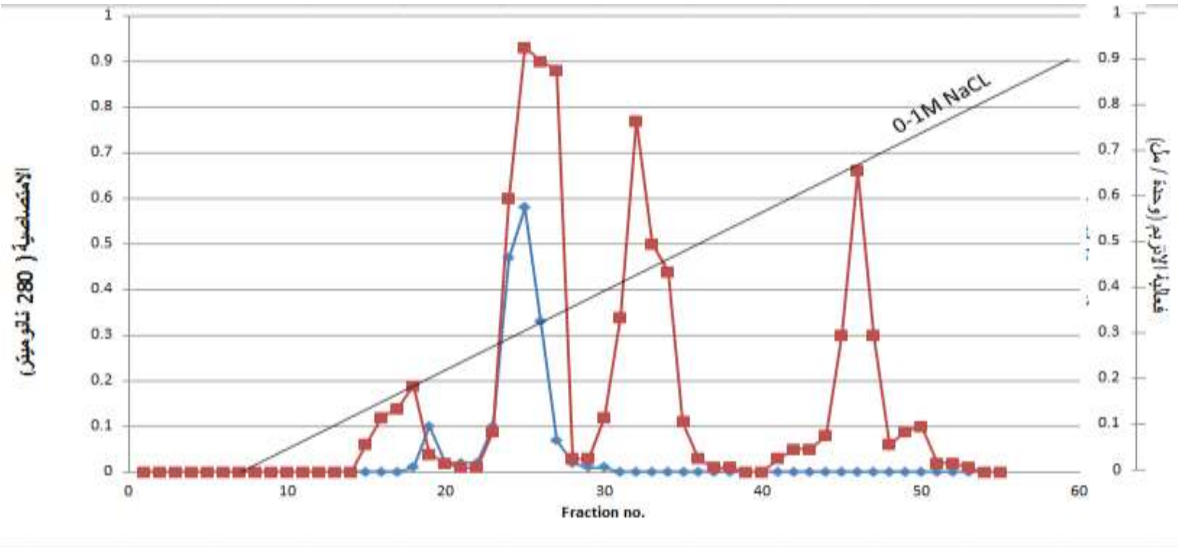
ترسيب البروتينات عادة يتم في المراحل المبكرة من تنقية الانزيم والتخلص من نسبة كبيرة من من الماء والحصول على درجة نقاوة وغالبا ما تستخدم لهذا الغرض الاملاح كملح كبريتات بسبب بسبب ذوبانيته الجيدة في الماء , ويحدث الترسيب بالاملاح نتيجة معادلة الشحنة للبروتين المشحون بالملح , مما يؤدي الى انخفاض ذوبان البروتين وترسيبه وهذا ما يسمى بالترسيب بالملح .
الخطوة الثانية , كروماتوكرافيا التبادل الايوني باستخدام DEAE-cellulose كما في الشكل (4) اظهرت ان هناك 5 قمم للبروتين الناتج من هذه الخطوة , قمة واحدة للفايتيز نتجت في ذروة البروتين الثاني , وظهرت فعالية الفايتيز في الاجزاء المفصولة من العمود من (40-45) واعلى واحدة كانت على الجزء المفصول 42 . في خطوة كروماتوكرافيا التبادل الايوني الفعالية النوعية للفايتيز بلغت 3.6وحدة/ ملغ بروتين مع تنقية 9.74 ضعف مع حصيلة انزيمية بلغت 82 .71%.

الخطوة الاخيرة من التنقية والتي كانت باستخدام كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G75 كما يوضح الشكل (5) ان هناك فقط قمة بروتينة واحدة نتجت من هذه الخطوة , وقمة فايتيز واحدة وفعالية الفايتيز ظهرت في الاجزاء بين (37-41) واعلاها كانت عند الجزء 39 .خطوة كروماتوكرافيا الجل اعطت فعالية فايتيز نوعية 7.5 وحدة/ ملغ بروتين مع تنقية وصلت 19,74 ضعف وحصيلة انزيمية بلغت 68.18% كما في الجدول (4).

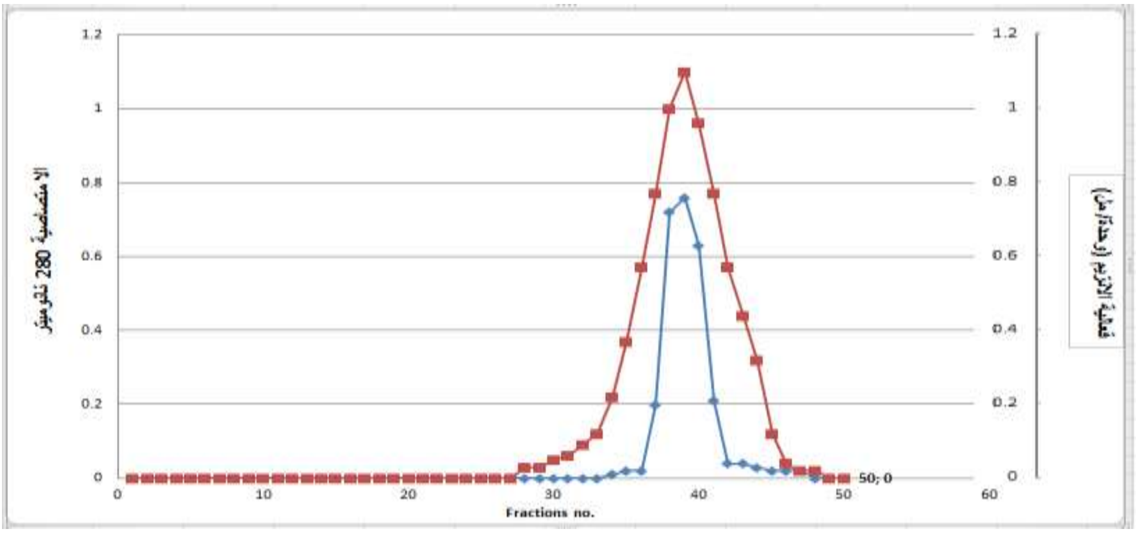
جدول (4)خطوات تنقية انزيم الفايتيز من الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11 L

الخطوات	الحجم (مل)	الفعالية (unit/ml)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (U/mg protein)	الفعالية الكلية (unit)	عدد مرات التنقية	الحصيلة%
الانزيم الخام	10	0,88	2,33	0,38	8,8	1	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم(70%)	10	0,81	1,05	0,77	8,1	2,03	92,05
المبادل الايوني (DEAE-cellulose)	8	0,79	0,22	3,6	6,32	9,47	71,82
الترشيح الهلامي باستعمال Sephadex G-75	8	0,75	0,1	7,5	6.0	19,74	68.18

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/



شكل (4) كروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام عمود DEAE سليلوز ابعاده (20×2,5سم) اجري الغسل عدة مرات بـ 0,25 مولاري محلول حامض الهيدروكلوريك وغسل بالماء المقطر اجري موازنة العمود بالمحلول المنظم (فوسفيت بفر 7 0.1M/pH) بسرعة جريان 1/دقيقة وجمعت الاجزاء بواقع 3مل /جزء

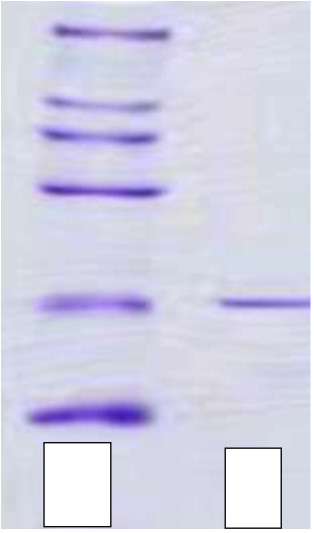


شكل (5) كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي للفايتيز المنقى من الفطر 11L *P. ostreatus* باستخدام عمود هلام السيفادكس G-75 بابعاد (50×1,5) سم اجري غسل العمود مرتين بقدر حجمه باستخدام (فوسفيت بفر 7 0.1M/pH)أجريت الموازنة والاسترداد باستعمال محلول فوسفات المنظم نفسه، سرعة الجريان 20 مل/ساعة جمعت الاجزاء بواقع 3 مل / جزء.

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

نقاوة الانزيم

يوضح الشكل (B6) ان هناك حزمة واحدة ظهرت في تقنية الترحيل الكهربائي (باستخدام هلام متعدد الاكريل امايد تحت ظروف ماسخة باستخدام صوديوم دودو سيل سلفيت SDS-PAGE) بعد اخر خطوة من تنقية الانزيم وقورنت مع مستخلص الانزيم الخام الذي اظهر 6 حزم كما في الشكل (6 A) بين الانزيم المنقى ان هناك حزمة واحدة تشير الى النقاوة العالية لانزيم الفايتيز . كان موقع حزمة الانزيم قريبا من حزم البروتين الخامس في المستخلص الخام , ويشير هذا بان هناك تطابق بينهما. يبين ظهور حزمة واحدة من الفايتيز المنقى في تقنية SDS-PAGE مع اختفاء بقية الحزم (البروتينات الاخرى) التي ظهرت في المستخلص الخام الى نقاوة الانزيم ونجاح عملية التنقية.



شكل (6) الكشف عن نقاوة الفايتيز المنقى من لفطر الغذائي ***P. ostreatus* 11L** بواسطة **SDS-PAGE** :
A- المستخلص الخام , B- انزيم الفايتيز المنقى

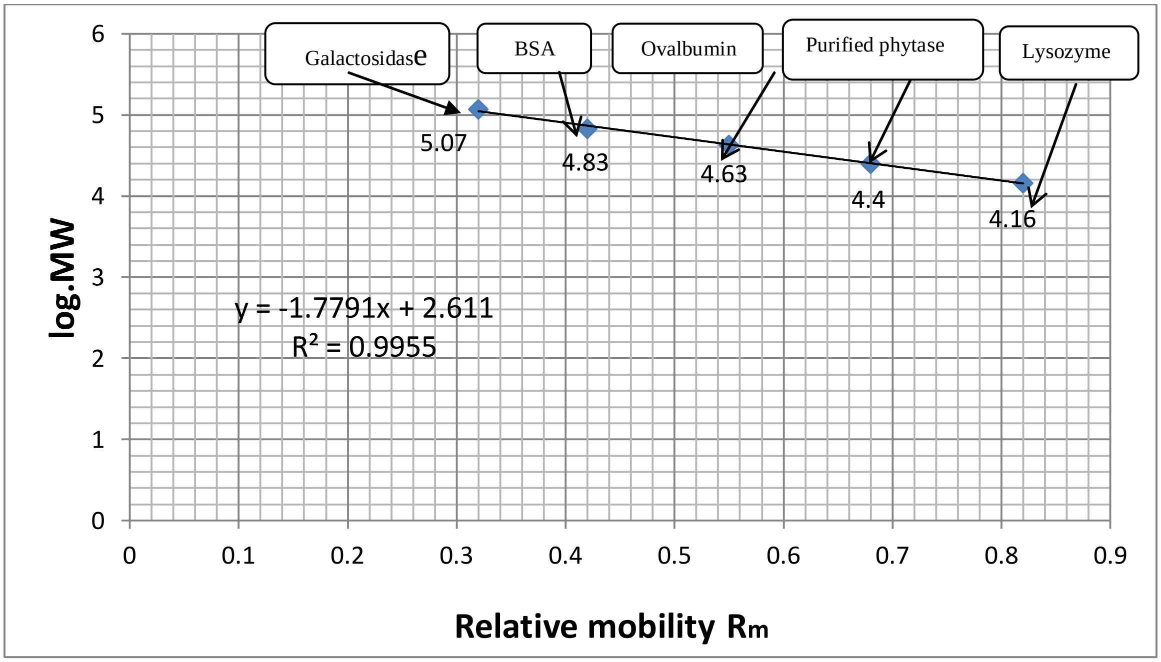
توصيف انزيم الفايتيز المنقى

الوزن الجزيئي للفايتيز

اوضح شكل (7) العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي لاربع بروتينات قياسية و السرعة النسبية Rm بوساطة SDS-PAGE لتحديد الوزن الجزيئي لانزيم الفايتيز المنقى, سلك انزيم الفايتيز المنقى سلوك بروتين احادي ذو كتلة جزيئية حوالي 25.12 كيلو دالتون .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

يعتمد مبدا الترحيل الكهربائي بواسطة SDS-PAGE على الوزن الجزيئي بما ان حزمة الانزيم مفصولة بشكل مفرد .الفايتيز يختلف في وزنه الجزيئي اعتمادا على مصدره , اذ تراوحت الاحجام الجزيئية للفايتيز المنتج خارج خلويا من الفطريات الخيطية كيلو دالتون (85-49) , بينما في بعض الانواع من الفطريات الغذائية كان الوزن الجزيئي للفايتيز يتراوح بين- 45 14 كيلو دالتون (Watanabe, *et al.*, 2009; Greiner, *et al.*, 2009 ,Zhang, *et al.*, 2013; Onem and Nadaroglu, 2014 Zhang, *et al.*, 2011). في هذه الدراسة كان الوزن الجزيئي للفايتيز المنقى من الفطر *P. ostreatus* 11L مختلفا عند المقارنة مع انزيمات فايتيز منتجة من فطريات اخرى والذي يمتلك وزن جزيئي 25.12 كيلو دالتون وهذا ادى الى اعتباره انزيم فريد novel enzyme تنفرد الدراسة الحالية بانتاجه وتوصيفه.



شكل (7) المنحني القياسي للعلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي (log. MW) والمسافة المقطوعة (R_m) للبروتينات القياسية باستخدام تقنية SDS-PAGE

تحديد درجة حرارة المثلى لفعالية الفايتيز

بينت النتائج المبينة في الشكل (8) ان اقصى فعالية كانت 0.83 وحدة/ مل عندما كانت درجة حرارة التفاعل الانزيمي 30̊ م وتلتها 0.81 و 0.78 وحدة/ مل عندما كانت درجة حرارة التفاعل الانزيمي 35و40̊م على التوالي (بدون اي فروق معنوية بينهما). في حين لوحظ فقدان فعالية انزيم الفايتيز وبسرعة عند درجة حرارة 50̊ م .

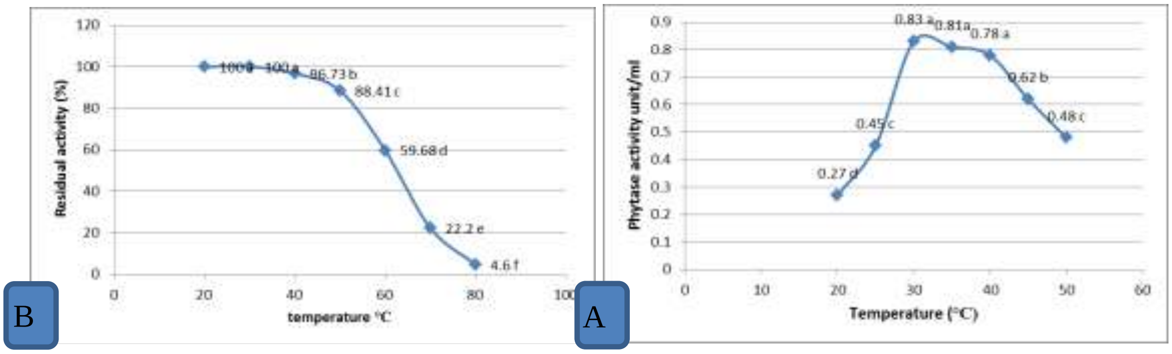
Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

تمتلك الإنزيمات درجة حرارة مثلى (تساوي أو أعلى أو أقل بقليل) من درجة حرارة الخلية التي تحويها ، إذ تزداد سرعة التفاعل الإنزيمي بارتفاع درجات الحرارة حتى تصل الدرجة المثلى للتفاعل بعدها تبدأ بالانخفاض تدريجياً ويعزى ذلك لحصول عملية مسخ أو إتلاف جزيئة الإنزيم إذ يعمل ذلك على خفض أو فقدان فعالية الإنزيم ويُفسر هذا الانخفاض من خلال تأثير درجات الحرارة العالية إلى حالة التأين للمجاميع الموجودة على سطح الإنزيم ومادته الأساس ولكون الإنزيمات جزيئات بروتينية معقدة يتأثر نشاطها التحفيزي في التركيب البنائي الثلاثي المنتظم لذا فإنّ ارتفاع درجات الحرارة يعمل على تغير الشكل الهندسي والطبيعي للإنزيم مما يسبب فقدان الإنزيم لنشاطه (Ahmed, 2014).

الثبات الحراري للفايتيز

من خلال النتائج الموضحة في الشكل (9) الذي بين ان الفايتيز المنقى من الفطر *P. ostreatus* كانت له درجة استقرار حراري بمدى (20– 60) ْم ولمدة ساعة, اذ تم الاحتفاظ باكثر من 50%من نشاط الانزيم النسبي بعد ساعة من بدء التفاعل الانزيمي.

الانخفاض في فعالية الانزيم مع الارتفاع في درجة الحرارة ربما يؤدي الى مسخ الانزيم من خلال تحطيم الشكل البروتيني ثلاثي الابعاد والذي يسبب تغييرات في الموقع الفعال والذي يؤدي الى عدم تفاعل الانزيم عند درجات الحرارة العالية (Khalaf, 2012). درجة الحرارة يمكن ان تؤثر على بناء البروتين بواسطة تحطيم او كسر الروابط للبروتين المستقر الثانوي والثالثي الذي ينتج عن المسخ (Chesworth *et al.*, 1998) .



شكل (8) تاثيردرجة الحرارة على فعالية انزيم الفايتيز (A) الاستقرار الحراري لانزيم الفايتيز بدرجات حرارة مختلفة (**B**)

تحديد قيم الرقم الهيدروجيني الامثل لفعالية الانزيم

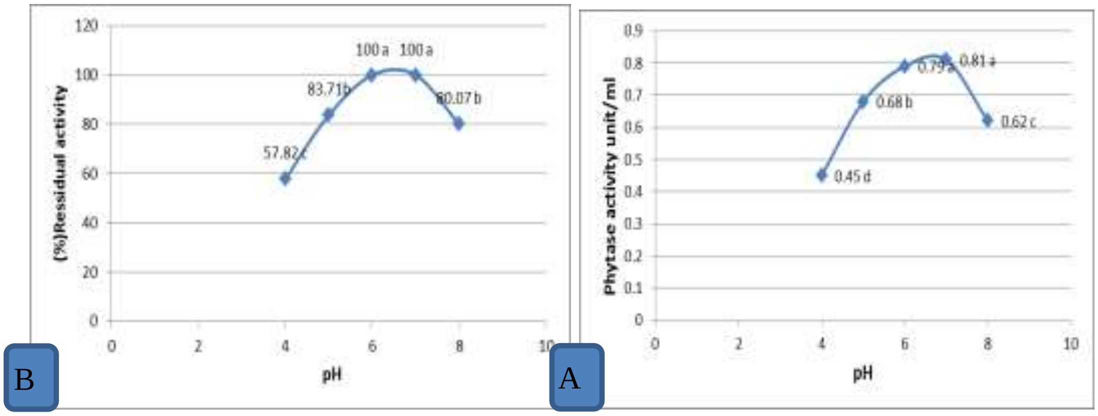
اوضحت النتائج في الشكل (9) ان انزيم الفايتيز كان فعالا عند مدى من الرقم الهيدروجيني (4–8), اعلى فعالية كانت 0.81 وحدة/ مل عندما كان الرقم الهيدروجيني للتفاعل الانزيمي 7, وتلاه 0.79وحدة/ مل عندما كان الرقم الهيدروجيني للتفاعل الانزيمي 6 (بدون اي فروق معنوية بينهما) .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org

شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

استقرارية انزيم الفايتيز في قيم مختلفة من الرقم الهيدروجيني

اظهرت نتائج الشكل (10) ان انزيم الفايتيز مستقر تماما عند الرقم الهيدروجيني 6 و 7 ولمدة ساعة من التفاعل الانزيمي في درجة حرارة 37ْ م. فعالية الفايتيز بلغت 80.07 و 83.71 وحدة/ مل عند رقم هيدروجيني 8 و 5 على التوالي, , وبالتالي تم الاستنتاج ان فعالية الفايتيز كانت ثابتة عند مدى 5-8 من الاس الهيدروجيني.



شكل (9) (A)تاثيرالرقم الهيدروجيني على فعالية انزيم الفايتيز (B) ثبات انزيم الفايتيز بقيم رقم هيدروجيني مختلفة

وجد Whitaker و Bernard (1972) ان اغلب الانزيمات تخضع لتغيير الشكل في الظروف الحامضية والقاعدية القوية . الرقم الهيدروجيني للمحلول له عدة تاثيرات على التركيب البنائي وفعالية الانزيمات . فهو يؤثر على المجموعة المتاينة الحامضية او القاعدية من الاحماض الامينية . الاحماض الامينية القاعدية لها مجاميع كاربوكسيل فعالة عند طرف السلسلة . الاحماض الامينية القاعية لها مجاميع امين فعالة في طرف سلسلتها . اذا كان موقع الايونات للحوامض الامينية في البروتين تغيرت فان الروابط الايونية التي تساعد في تحديد الشكل الثلاثي للبروتين ممكن ان تتغير. هذا يمكن ان يؤدي الى بروتين او انزيم غير فعال . التغيرات في الرقم الهيدروجيني لاتشمل فقط التاثير في شكل الانزيم الانه ايضا يؤدي الى تغيير في شكل وخصائص المادة الاساس بحيث اما ان المادة الاساس لا تستطيع الارتباط بالموقع الفعال للانزيم او لايمكنها ان تخضع للتحفيز Moat واخرون , 2002 Chesworth *et al.*,1998).

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

دراسة تطبيقية في داخل جسم الكائن الحي (*IN VIVO*) للفايتيز المنقى من سلالة الفطرالغذائي *P. ostreatus* 11 L

تقييم الفايتيز و الاجسام الثمرية و الوسط المتبقي بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L لمعايير نمو الجرذان

يوضح الجدول (5) تاثير الفايتيز المنقى من الفطر *P. ostreatus* 11 L مقارنة مع انزيم الفايتيز التجاري و الاجسام الثمرية نفسها التي استخلص الانزيم منها و الوسط المتبقي (بعد نمووحصاد ثمار الفطر *P. ostreatus* 11 L)على بعض معايير النمو في ذكور الجرذان البيض . بينت النتائج ان معايير النمو العالية كانت في الفايتيز التجاري والفايتيز المنقى من الفطر *P. ostreatus* 11 L بالمقارنة مع معاملة السيطرة وباقي المعاملات الاخرى . اذ ليس هناك اي فقدان وخسارة في اوزان الجرذان لكل المعاملات .

كمقارنة بين نوعي الانزيم (المنقى والتجاري) فان كل من زيادة الوزن ومعدل النمو اليومي (ADG) (غم/يوم) قد سجلت في الفايتيز المنقى من الفطر *P. ostreatus* 11 L بنسبة 0,03% اعلى القيم اذ بلغت 17.4 و 0.5 غم/يوم ، على التوالي (بدون فروق معنوية بين نسب الفايتيز التجاري والمنقى) .

في معاملة الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11L وضح الجدول (5) ارتفاع في زيادة الوزن و ADG, مع زيادة تركيز الاجسام الثمرية المضافة , واعلى قيم كانت عند المعاملة بتركيز 3%, اذ بلغت 12.5 غم و 0.36 غم/يوم على التوالي.

في معاملة الوسط المتبقي بعد حصاد الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11L وجد ايضا ارتفاع في عامل زيادة الوزن و ADG, مع زيادة تركيز الوسط المتبقي , وبينت النتائج ان اعلى قيمة كانت مع استخدام نسبة 3% اذ بلغت 12.8غم و 0.37 غم/يوم على التوالي. وتبين من النتائج ايضا عدم وجود اي هلاكات في الحيوانات.

قد يعزى سبب ارتفاع في عامل زيادة الوزن و ADG فضلا عن انخفاض في استهلاك العليقة بفعل الفايتيز المنقى و الفايتيز التجاري مقارنة مع معاملة الاجسام الثمرية والوسط المتبقي تشير الى الدور المباشر للفايتيز نحو التغذية عن طريق تحرير البروتينات والفسفور (و المعادن الاخرى) من الفايتيت الموجود في العليقة, بالرغم من وجود زيادة في كسب الوزن و ADG وانخفاض في العلف المستهلك عند معاملتي الاجسام الثمرية والوسط المتبقي مقارنة مع معاملة السيطرة, ورغم انخفاض محتواهما من الفايتيز فقد يفسر تفوقهما على السيطرة بوجود بعض المكونات الغذائية في الاجسام الثمرية و المايسيليوم . تتفق نتائج زيادة الوزن وقلة استهلاك العليقة (في حيوانات مختلفة مثل الدواجن والماشية والارانب والخنازير) بفعل الفايتيزات من مصادر مختلفة مع العديد من الدراسات السابقة(Kumar ; Mateus, *et al.*, (2015) ; &Maria ,2015, Rural (Sabha, (2008) ; Grases *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, (2011) ; *et al.*, (2014).

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

جدول رقم (5) تقييم الفايتيز و الاجسام الثمرية و الوسط المتبقي بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L لمعايير نمو الجرذان

المعاملة	Intial weight	Final Wt g	Gain/loss In wt(g)	ADG g day^{-1}	Feed Intake(g)	Mortality (%)
الانزيم التجاري	180.5	195.8	15.3	0.44	14.21	0
الفايتيز المنقى 1%	182	195.5	13.5	0.39	15.72	0
الفايتيز المنقى 2%	180	195.5	15.5	0.44	15.03	0
الفايتيز المنقى 3%	177.3	194.7	17.4	0.50	14.00	0
الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus 11L* (1)	183.6	194.4	10.8	0.31	18.77	0
الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus 11L* (2)	175.3	186.7	11.4	0.33	18.03	0
الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus 11L* (3)	180	192.5	12.5	0.36	17.0	0
الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus 11L* (1)	184	196.3	12.3	0.35	19.5	0
الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus 11L* (2)	180.7	193.3	12.6	0.36	19.5	0
الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus 11L* (3)	181	193.8	12.8	0.37	19.0	0
معاملة السيطرة	176.2	188.6	12.4	0.35	20.66	0
L.S.D (P<0.01)	2.12	1.82	1.31	0.07	1.12	0

تقييم الفايتيز , الاجسام الثمرية , الوسط المتبقي بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L للمعايير الدموية البايوكيميائية للجرذان

اظهر الجدول (6) تاثير اضافة الفايتيز التجاري, الفايتيز المنقى , الاجسام الثمرية , الوسط المتبقي من بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L لمعايير الدم البايوكيميائية للجرذان البيض , اذ بينت النتائج ان ادنى قيمة من كل المعاملات كانت مع الفايتيز التجاري والفايتيز المنقى من الفطر *P. ostreatus* 11 L مقارنة مع معاملة السيطرة وباقي المعاملات الاخرى . من بين انواع انزيم الفايتيز كانت ادنى قيمة للكرياتنين , اليوريا , الكلوكوز , والكولسترول في التركيز 3% من الفايتيز المنقى

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

حيث كانت 0.54, 122.55,16.61 , و 77.06 mg/dL , على التوالي وبدون اي فروق معنوية بينها عند مستوى معنوية (P>0.01) وبين قيم الفايتيز التجاري وباقي تراكيز الفايتيز المنقى (2و3%).

اظهرت النتائج في الجدول (6) ان اعلى قيمة للبروتين في دم الجرذان البيض كانت باستخدام الفايتيز التجاري والفايتيز المنقى من الفطر *P. ostreatus* 11 L بالمقارنة مع مجموعة السيطرة وباقي المعاملات الاخرى . بين معاملات انواع الانزيم , اعلى قيمة للالبومين , الكلوبيولين والبروتين الكلي g/dL كانت مع التركيز 3% من الفايتيز المنقى اذ انتج 4.8, 3.83, و 8.63g/dL , في حين انخفض AST, ALT مع زيادة تركيز الانزيم المنقى , وكانت اقل قيم لها 24.60 و 43.53 u/L مع التركيز 3% من انزيم الفايتيز المنقى على التوالي وبدون اي فروق معنوية بينها وبين تراكيز انزيم الفايتيز المنقى الاخرى (1و2%). بين الجدول (7) ان الكرياتنين , اليوريا , الكلوكوز و الكولسترول قد انخفضت مع زيادة تركيز الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11 L المضافة , وكانت اقل قيمة لها 0.62, 19, 111.50, و 68.14mg/dl عند التركيز 3% من الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11 L المضافة على التوالي وبدون اي فروق معنوية بينها وبين تراكيز انزيم الفايتيز المنقى الاخرى (1و2%). بين الجدول (6) ايضا ان قيم الالبومين , الكلوبيولين والبروتين الكلي g/dL قد ازدادت مع زيادة تركيز الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11 L المضافة , وكانت اعلى قيمة لها 3.84 , 3.20 , و 7.04 g/dl عند التركيز 3% على التوالي , في حين انخفض AST, ALT مع زيادة تركيز زيادة تركيز الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11 L اذ كانت 28.50 , u/L 48.21 على التوالي وبدون اي فروق معنوية بينها وبين تراكيز انزيم الفايتيز المنقى الاخرى (1و2%). سجل الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus* 11 L النقصان في الكرياتنين , اليوريا , الكلوكوز و الكولسترول مع زيادة تركيز الوسط المتبقي للفطر *P. ostreatus* 11 L المضافة , وكانت اقل قيمة لها 120.67, 20.07,0.86 , و 71.13mg/dL عند التركيز 3%, على التوالي وبدون اي فروق فردية بينها وبالمقارنة مع وحدة السيطرة.

كما اظهرت معاملة الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus* 11 L زيادة في قيم بروتينات الدم مع زيادة تركيز الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus* 11 L المضاف واعلى قيم للالبومين , الكلوبيولين والبروتين الكلي g/dL كانت قد سجلت مع التركيز 3% من الوسط المتبقي المستخدم اذ كانت 3.27 , 2.57 , و 5.84 g/dL , في حين انخفض تركيز كل من AST و ALT مع زيادة تركيز الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus* 11 L واقل قيم لكل من AST و ALT كانت 28 و 55.55 u/L مع التركيز 3% المستخدم من الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus* 11 L على التوالي وبدون اي فروق فردية بينها وبين التراكيز (2و3%) الاخرى .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

جدول رقم (6) تقييم الفايتيز , الاجسام الثمرية , الوسط المتبقي بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L للمعايير الدموية البايوكيميائية للجرذان

ALT unit/L	AST unit/L	T.P g/dL	Glo g/dL	Alb g/dL	Chol mg/dL	Gl mg/dL	Urea mg/dL	Cr mg/dL	المعاملة
42.86	25.83	8.33	3.66	4.67	78.00	121.31	16.50	0.57	الانزيم التجاري
44.50	26.40	5.96	2.43	3.53	78.00	122.60	18.31	0.63	الفايتيز المنقى 1%
44.50	26.54	7.67	3.50	4.17	77.82	122.57	18.0	0.51	الفايتيز المنقى 2%
43.53	24.60	8.63	3.83	4.8	77.06	122.55	16.61	0.54	الفايتيز المنقى 3%
53.06	28.06	5.81	2.67	3.14	71.5	116.23	19.76	0.78	الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus 11L* (1)
50.11	27.31	6.31	2.80	3.33	65.22	114.00	19.50	0.74	الاجسام الثمرية للفطر P. ostreatus 11L (2)
48.21	28.50	7.04	3.20	3.84	68.14	111.50	19	0.62	الاجسام الثمرية للفطر P. ostreatus 11L (3)
56.3	28.50	5.29	2.23	3.06	73.62	124.06	21.14	0.94	الوسط المتبقي من الفطر P. ostreatus 11L (1)
56.0	28.50	5.76	2.55	3.21	73.00	120.81	20.03	0.90	الوسط المتبقي من الفطر P. ostreatus 11L (2)
55.55	28.0	5.84	2.57	3.27	71.13	120.67	20.07	0.86	الوسط المتبقي من الفطر (3) P. ostreatus 11L
57.23	29.5	5.28	2.22	3.06	77.82	124.6	21.55	1.22	معاملة السيطرة
2.68	1.43	0.94	0.31	0.63	1.22	2.08	1.56	0.13	L.S.D (P>0.01)

Cr=creatinine , Glu=glucose, Cho=cholesterol, Alb=albumin, Glo=globulin,T.P= Total protein

تقييم الفايتيز , الاجسام الثمرية , الوسط المتبقي بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L على معادن الدم للجرذان البيض

يوضح الجدول (7) تاثير اضافة الفايتيز التجاري, الفايتيز المنقى , الاجسام الثمرية , الوسط المتبقي من بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L على معادن دم الجرذان البيض وبينت النتائج ان اعلى قيمة لكل المعادن كانت مع استخدام الفايتيز التجاري والفايتيز المنقى من الفطر *P. ostreatus* 11 L مقارنة مع معاملة السيطرة وباقي المعاملات الاخرى من بين انواع انزيم الفايتيز المضافة كانت اعلى قيمة لكل من المعادن Ca,Na ,Cl , Mg , Fe , P و K عند التركيز 3% من الفايتيز المنقى حيث كانت 101.61 mmol/L , 151.06 mmol/L , 11.76mg/dl , 2.41mg/dl , 161.7mg/dl , 3.88mg/dl و 4.03 mmol/L على التوالي وبدون اي فروق فردية بينها وبين التراكيز (1و2%) الاخرى . بين الجدول (7) ايضا ان هناك انخفاض لكل من المعادن Na ,Cl مع زيادة تركيز الاجسام الثمرية

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

للفطر *P. ostreatus* 11 L وكانت اقل قيمة لها 90.07 و 133.03 mmol/L عند التركيز 3% على التوالي . في حين كانت باقي المعادن الاخرى Ca , Mg , Fe , P , و K ازدادت مع زيادة تركيز الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11 L , وكانت اعلى قيمة لها مع التركيز 3% المستخدم اذ كانت 10.05 , 2.45 , 158.36 , 3.62 mg/dl , nm/L 3.36 على التوالي . اظهرت ايضا معاملة الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus* 11 L زيادة في قيم معادن الم للجرذان البيض مع زيادة تركيز الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus* 11 L وكانت اعلى قيم للمعادن Cl, Na, Ca , Mg , Fe , P , و K عند الركيز 3% المستخدم اذ كانت mmol/L 104.51 , 147.6 mmol/L , 9.0 , 1.91 , 146.54 , 2.4mg/dl, و mmol/L 2.88 , على التوالي وبدون اي فروق فردية بينها وبين التراكيز (1و2%) الاخرى .

جدول رقم (7) تقييم الفايتيز , الاجسام الثمرية , الوسط المتبقي بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L على معادن الدم للجرذان البيض

K mmol/L	P mg/dL	Iron mg/dl	Mg mg/dL	Ca mg/dl	Na mmol/L	Cl mmol/L	المعاملة
3.77	3.17	161.22	2.23	10.25	151.12	100.73	الانزيم التجاري
3.38	2.85	158.76	2.06	9.73	146.21	99.06	الفايتيز المنقى 1%
3.61	3.32	160.03	2.11	10.33	151.00	101.50	الفايتيز المنقى 2%
4.03	3.88	161.70	2.41	11.76	151.06	101.61	الفايتيز المنقى 3%
3.04	2.93	148.33	2.02	9.63	141.0	97.00	الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus 11L* (1)
3.17	3.31	153.71	2.31	9.66	137.31	93.18	الاجسام الثمرية للفطر P. ostreatus 11L(2)
3.36	3.62	158.36	2.45	10.05	133.03	90.07	الاجسام الثمرية للفطر P. ostreatus (3) 11L
2.78	2.16	144.0	1.75	8.67	143.41	98.33	الوسط المتبقي من الفطر P. ostreatus (1)
2.80	2.32	144.53	1.87	8.82	144.21	101.26	الوسط المتبقي من الفطر P. ostreatus (2) 11L
2.88	2.40	146.54	1.91	9.0	147.60	104.51	الوسط المتبقي من الفطر P. ostreatus 11L (3)
2.78	2.13	143.7	1.71	8.55	143.60	97.42	معاملة السيطرة
0.1	0.11	2.55	0.62	1.02	3.05	2.57	L.S.D(P<0.01)

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

تقييم الفايتيز , الاجسام الثمرية , الوسط المتبقي بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L على معادن فضلات

المعاملة	Na mg/dL	K mg/dL	Zn mg/dL	Mg mg/dL	Fe mg/dL	P mg/dL	N mg/dL

الجرذان البيض

بين الجدول (8) تاثير الفايتيز و الاجسام الثمرية و الوسط المتبقي من بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L على قيم معادن فضلات الجرذان البيض ومن خلال النتائج وجد ان اقل قيم للمعادن كانت مع الفايتيز التجاري والفايتيز المنقى من الفطر *P. ostreatus* 11 L بالمقارنة مع معاملة السيطرة وباقي المعاملات الاخرى .

من بين انواع انزيم الفايتيز المضافة , الحد الاعلى لقيم كل من المعادن Na, K , Zn , Mg , Fe , P , و N كان عند التركيز 1% من الفايتيز المنقى اذ كانت 0.24 , 1.10, 0.35 , 0.30 , 0.57 , 0.92 , و9.07 mmol/L على التوالي وبدون اي فروق فردية بينها وبين التراكيز (2و3%) الاخرى .

بين الجدول (8) ايضا ان هناك انخفاض في قيم المعادن مع زيادة تركيز الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11 L وكان الحد الادنى لقيم كل من المعادن Na, K , Zn , Mg , Fe , P , و N كان عند التركيز 3% من الاجسام الثمرية للفطر *P. ostreatus* 11 L حيث كانت 0.25 , 1.43 , 0.43 , 0.73 , 0.88 , و 9.23 , على التوالي وبدون اي فروق فردية بينها وبين التراكيز (1و2%) الاخرى .

معاملة الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus* 11 L اظهرت ايضا نقصان في قيم معادن فضلات الجرذان البيض مع زيادة تركيز الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus* 11 L وكانت اقل قيم للمعادن Na, K , Zn , Mg , Fe , P , و N عندما كان التركيز المستخدم 3% من الوسط المتبقي من الفطر *P. ostreatus* 11 L اذ كانت 0.27 , 1.71 , 0.52 ,0.38 , 0.81 , 1.03 , و 9.64 , على التوالي وبدون اي فروق فردية بينها وبين التراكيز (1و2%) الاخرى .

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

8.81	0.83	0.51	0.26	0.28	1.22	0.17	الانزيم التجاري
9.07	0.92	0.57	0.30	0.35	1.10	0.24	الفايتيز المنقى 1%
8.85	0.84	0.51	0.26	0.31	0.99	0.19	الفايتيز المنقى 2%
8.73	0.66	0.47	0.21	0.22	0.97	0.19	الفايتيز المنقى 3%
10.22	1.05	0.85	0.40	0.55	1.83	0.31	الاجسام الثمرية للفطر ***P. ostreatus* 11L** (1)
9.61	0.93	0.81	0.37	0.51	1.71	0.29	الاجسام الثمرية للفطر ***P. ostreatus* 11L** (2)
9.23	0.88	0.73	0.34	0.43	1.43	0.25	الاجسام الثمرية للفطر ***P. ostreatus* 11L** (3)
10.55	1.43	0.88	0.42	0.60	1.86	0.33	الوسط المتبقي من الفطر ***P. ostreatus* 11L** (1)
9.83	1.40	0.84	0.40	0.57	1.78	0.30	الوسط المتبقي من الفطر ***P. ostreatus* 11L** (2)
9.64	1.03	0.81	0.38	0.52	1.71	0.27	الوسط المتبقي من الفطر ***P. ostreatus* 11L** (3)
10.54	1.45	0.88	0.43	0.59	1.86	0.33	معاملة السيطرة
1.07	0.12	0.1	0.08	0.086	0.11	0.04	L.S.D (P<0.01)

جدول رقم (8) تقييم الفايتيز , الاجسام الثمرية , الوسط المتبقي بعد نمو الفطر *P. ostreatus* 11 L على معادن فضلات الجرذان البيض

References : المراجع

Abdel-Hameed, N. S. (2008). The use of enzymes in poultry feed. Symp. of poul. feed diet. prep. Vol.3.June 3-2.

Ahmed, W. Khalid. (2014). Kinetic studies of Rhodanase partially purified from serum of chronic renal failer patients. Msc. thesis, University of Tikrit.

Al-Baghdadi, R. J. T. , and Al-Sa,adi, J. A. (2009). Effect of dietary microbial phytase and alfalfa leaves extract supplementation on some blood parameters in Broiler. J. Veter. Med, 1(2) 6572. 57- 63.

AOAC, (2004). Offcial Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington, VA, USA.

Applegate, T. J., D. M. Webel, and X. G. Lei. (2003). Efficacy of a phytase derived from *Escherichia coli* and expressed in yeast on phosphorus utilization and bone mineralization in turkey poults. Poult. Sci. 82:1726–1732.

Augspurger, N. R., Webel D. M., Lei X. G., and Baker D. H. (2003). Efficacy of an *E. coli* phytase expressed in yeast for releasing phytate-bound phosphorus in young chicks and pigs. J. Anim.

Berg, J. M. ; Tymoczk, J. K. and Stryer, L. (2002). Biochemistry . (5th Ed.) pP:196-219. W. H. Freeman and Company. New York.

Bitar K. and Reinhold J.G. (1972). Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf and man. Biochim, Biophys. Acta ; 268: 442-452.

Bohn L, Meyer A. S. and Rasussen S K (2008) J Zhejiang Univ Sci B 9, 165-191

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.

Chang, S. T. and P. G. Miles.(2004). Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact (Second Edition).CRC Press. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 451pp.

Chesworth, J. M.; Stuchbury, T. and Scaif, J. R. (1998).An Introduction to agricultural biochemistry.Chapman & Hall, London. 5 (2): 215-223.

Collopy P. D. and Royse D. J. (2004). Characterization of Phytase Activity from Cultivated Edible Mushrooms and Their Production Substrates. J. Agric. Food Chem. 52: 7518-7524.

Common F. H.(1989). Biological availability of phosphorus for pigs. Nature 143:370- 380.

Grases, F., Simonet, B. M., Vucenik, I., Prieto, R. M., Costa-Bauza, A., March, J. G. (2001) . Phytate prevents tissue calcifications in female rats . BioFactors 11 (2000) 171-177. IOS Press.

Greiner, Ralf. Gomes, Lucineia. Silva, da. Couri, Sonia. (2009). Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger*11T53A9. Brazilian Journal of Microbiology 40: 795-807.

Hassan, A. A.(1996).Production of *Pleurotus* spp. for human consumption on agricultural wastes and utilization its by-products for animal feed, MS.C. thesis . University of Baghdad, Iraq.

Khalaf, A. Z. (2012). Extraction and Purification of Asparaginase enzyme from *Pisum sativum* plant and studying their cytotoxicity against L20B tumor cell line. Msc. Theises. Al-Nahrain University.

Kim, M., Lee1, H. A., Park, J., Kang, S. and Choi, Y. (2011). Recycling of Fermented Sawdust-based Oyster Mushroom Spent Substrate as a Feed Supplement for Postweaning Calves. Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 24, No. 4 : 493 – 499 .

Kumar K., Yong-hyun Y., Gunhyun P., Jeong-Yeol L., Gwangyeol Y., and Sungchul C. B.(2014). Evaluation of the Efficacy of Fermented By-product of Mushroom, *Pleurotus ostreatus*, as a Fish Meal Replacer in Juvenile Amur Catfish, Silurus asotus: Effects on Growth, Serological

Characteristics and Immune Responses. Asian Australas. J. Anim. Sci. Vol. 27, No. 10 : 1478-1486

Laemmli, D. K. 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage T4. Nature, London, 227: 680-685.

Lassen SF, Breinholt J, Ostergaard PR, Brugger R, Bischoff A, Wyss M, Fuglsang CC (2001). Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *A. ceriporia* sp and *Trametes pubescens*. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4701-4707.

Liu, J., D. W. Bollinger, D. R. Ledoux, and T. L. Veum. (1998). Lowering the dietary calcium to total phosphorus ratio increases phosphorus utilization in low-phosphorus corn-soybean meal diets supplemented with microbial phytase for growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 76:808–813

Mateus P. Santos,1 Rafael C. Marcante,1 Thiago T. Santana,1 Henrique S. Tanaka,1 Pascoal Funari, Jr.,2 Luiz R. Alberton,3 Eliete V. Faria,4 Juliana S. Valle,1 Nelson B. Colauto,1, & Giani A. Linde1. 2015. Oyster Culinary-Medicinal Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes), Growth in Grain-Based Diet Improves Broiler Chicken Production. International Journal of Medicinal Mushrooms, 17(2): 169–178.

Moat, A. G. ; Foster, J. W. and Spector, M. P.(2002). Microbial Physiology. 4th ed. Wiley-Liss, Inc., New York. 1: 1-28.

Olukosi, O.A., A.J. Cowieson, and O. Adeola. 2007. Age-related influence of a cocktail of xylanase, amylase, and protease or phytase individually or in combination in broilers. Poult Sci. 86: 77 – 86.

Onem H., Nadaroglu H. (2014). Preparation and Properties of Purified Phytase from Oakbug Milkcap (*Lactarius Quietus*) Immobilised on Coated Chitosan with Iron Nano Particles and Investigation of Its Usability in Food Industry. Journal of Food and Nutrition Research, 2014, Vol. 2, No. 12, 938-945.

Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK (1982). Phytates in legumes and cereals. Adv. Food Res. 28: 1-92.

Rutherfurd, S. M., T.K. Chung, and P.J. Moughan. (2002). The effect of microbial phytase on ileal phosphorus and amino acid digestibility in the broiler chicken. Brit. Poult.Sci. 43: 598-606.

Sabha, R. I. A. (2008). Effects of different level of Phytase on Broilers Performance and Body Status of Phosphorus. An _ajah _attional University Faculty of Graduate Studies.

Soni, S. K., (2009). Phytase from Aspergillus niger NCIM 563: Isolation, Purification, Characterization and its Applications. PHD thesis, University of Pune.

Tietz, N. ed., (2005). Fundamentals of clinical chemistry. W. B. Sauders, Philadelphia. Pp. 723-750.

Veum, T.L., Bollinger, D.W., Buff, C.E. and Bedford, M.R. (2006). A genetically engineered *Escherichia coli* phytase improves nutrient utilization, growth performance, and bone strength of young swine fed diets deficient in available phosphorus. J. Anim. Sci. 84, 1147-1158.

Whitaker, J. R. and Bernard, R. A. (1972). Experiments For An Introduction To Enzymology. The Wibber Press. Davis.

Global Proceedings Repository
American Research Foundation
ISSN 2476-017X
Available online at http://proceedings.sriweb.org
شبكة المؤتمرات العربية
http://arab.kmshare.net/

Woodzinski RJ, Ullah A. (1996) Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). Adv Appl Microbiol 42:263–302.

Xu L., Zhang G., Hexiang W., and Tzi B. Ng .(2011). Purification and characterization of phytase with a wide pH adaptation from common mushroom *Volvariella volvacea*(straw mushroom). Indian journal of Biochemistry and Biophysica Vol, 49, pp 49-54.

Zhang, G. Q., Dong, X.F., Wang, Z.H., Zhang, Q., Wang, H.X., Tong, J.M. (2010). Purification , characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *A. ficuum* NTG-23. Bio resource Technology 101: 4125-4131.

Zhang, G-Q., Wu, Y-Y., Ng, T-B., Chen, Q-J and Wang, H-X. (2013). A Phytase Characterized by Relatively High pH Tolerance and Thermostability from the Shiitake Mushroom *Lentinus edodes* . Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2013, Article ID 540239, 7 pages

Zhu M. J. Wang H. X. and Ng T. B. (2011) .Purification and identification of a phytase from fruity bodies of the winter mushroom, *Flammulina velutipes* . African Journal of Biotechnology. 10(77: 17845-17852.