مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ــ (2014) المجلد (30) ــ العدد 2 ــ الصفحات: 225-240

أمثلة إنتاج إنزيم السلولاز من عزلات محلية من فطر *Trichoderma.spp* باستخدام تبن القمح كركيزة بالطريقة السائلة

رشا الحداد[1] و صباح اليازجي[2] و أنور الحاج علي[2]

الملخّص

جمعت 45 عينة تتضمنت عينات تربة وخشباً متحللاً وكمبوست فطر زراعي مستنزفاً من ثلاث محافظات (دمشق، حمص، اللاذقية). شخصت منها مجهرياً 18 عزلة من جنس الفطر *Trichoderma* وغُربلتْ العزلات من حيث قدرتها على إنتاج إنزيمات السلولاز من خلال تنميتها على أطباق بتري حاوية على آغار كربوكسي ميتيل السلولوز كمصدرللكربون مدة 5 أيام، ثم حُدّد مقدار إنتاج الإنزيم بالاعتماد على الهالة الشفافة المتشكلة حول المستعمرات بعد إضافة صبغة أحمر الكونغو. أوضحت الدراسة أن العزلات Ti، Tg، Tr كانت الفُضلى في إنتاج السلولاز مقارنة بباقي العزلات، وتميّزت العزلة Tr بأعلى كفاءة إنزيمية إذْ وصل متوسط قطر الهالة حول المستعمرة إلى 7 ± 0.2 سم، ثم جرت أمثلة ظروف الإنتاج في الوسط السائل باستخدام التصميم الإحصائي response surface methology (RSM)، فكانت درجة الحرارة المثلى 29.50°م ودرجة الحموضة المثلى pH = 6 وأفضل مدة تحضين 4 أيام، وأفضل سرعة دوران 175 دورة في الدقيقة ونسبة الركيزة (مسحوق تبن القمح) المثلى 3%، وبيّنت النتائج تأثيراً معنوياً للقيم المدروسة لكل من درجة الحرارة، ودرجة الحموضة، ومدة التحضين، وسرعة التهوية، وتركيز الركيزة في فعالية الإنزيم.

الكلمات المفتاحية: الإنزيمات، سلولاز، *Trichoderma*، الزراعة السائلة، بقايا القمح (التبن).

[1] طالبة ماجستير، [2] أستاذ في قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

Optimization of cellulase enzyme production by local isolates of *Trichoderma.spp* using wheat straws as substrates in submerged culture

Haddad, R.[(1)], S. Yazeji[(2)] and Alhajali[(2)]

Abstract

45 samples were collected from various sources (soil, degraded wood and mushroom compost) from three cities (Damascus, Homs and Lattakia). 18 *Trichoderma* isolates were isolated and identified by microscope. These isolates were screened using CMC medium with Congo red dy to identify their ability to produce cellulase complex. The amount of enzyme production was determined depending on the radius of clear zone around the colony. Results showed that the most productive isolate was Tr with radius 7 ± 0.2 cm followed by Tg and Ti. Optimization of cellulase production was performed using response surface methodology (RSM). The optimal parameters were: temperature 29.5 ˚C, pH = 6، incubation time 4 days, aeration speed 175 rpm and wheat straw concentration 3%. All studied parameters had significant effect on cellulase enzyme activity.

Keywords: Cellulase production, *Trichoderma*, Submerged culture, Wheat straws.

[(1)] Msc student, [(2)] Prof. Food Sci. Dep., Fac. Agric., Univ. Damascus, Syria.

المقدمة

الإنزيمات مواد عضوية ذات طبيعة بروتينية تصنعها الخلايا الحية لتقوم بدور الوسيط في التفاعلات الكيميائية الحيوية دون أن يطرأ عليها أي تغيير في أثناء التفاعل الكيميائي (Schallmey وزملاؤه، 2004). تنتج بعض الإنزيمات على نطاق تجاري بكميات كبيرة سنوياً لتستعمل في العديد من المجالات الطبية والصناعية (Aehle، 2007). ازداد مؤخراً اهتمام الباحثين بإنتاج الإنزيمات المحللة للسكريات العديدة (اللغنين، السيللوز، الهيمي سيللوز) نظراً إلى أهميتها التطبيقية، ومن هذه الإنزيمات معقد إنزيمات السيلولاز، وتعود دراسة إنزيمات السيلولاز إلى بداية الخمسينيات بالدرجة الأولى من خلال استخدام الفطر *Trichoderma reesei* وغيره من الفطور، بعد ذلك اتسعت معرفة هذه الإنزيمات خلال مدة وجيزة لتدخل مجال الاستخدام الصناعي، إذ بدأ الاستخدام الصناعي لإنزيم السلولاز عام 1980 في أوربا بهدف إعطاء قماش الجينز الملمس الناعم والأكثر طراوة من خلال تقنية "biostoning" (Himmel وزملاؤه، 1999). وتكونً المعقد الإنزيمي من الإنزيمات الثلاثة الآتية:

1- 1)، Endo -β-glucanase (4-ß-D-glucan glucanohydrolase، CMCase، Cx) (EC 3.2.1.4)

2- Exo -β-glucanase (4-ß-D-glucan cellobiohydrolase،1) (C1: exo) (EC 3.2.1.91)

3- ß-glucosidase، cellobiase (cellobiase،ß-glucosidase) (EC 3.2.1.21) بحسب (Li وزملاؤه، 2006؛ Gao وزملاؤه، 2008)، إذْ تعمل هذه الإنزيمات بشكل تآزري لفكيك لسلة السلولوزو إنتاج الغلوكوز كناتج نهائي لعملية التخمر (Bguin وAubert، 1994؛ Chapin وزملاؤه، 2002 ؛ Lynd وزملاؤه، 2002).

حازت هذه الإنزيمات على اهتمام كبير من الباحثين، حيث درست بشكل موسع بسبب أهميتها التطبيقية في كثير من المجالات (Ahmed وزملاؤه، 2005؛ Jamil وزملاؤه، 2005) ولاسيّما مجال الصناعات النسيجية، وصناعة مساحيق الغسيل والمنظفات، وصناعة الورق، واستخلاص عصائر الخضار والفاكهة والكاروتينات وزيت الزيتون، وصناعة النبيذ وفي مجال تغذية الحيوان، والإفادة من المخلفات السلولوزية للمحاصيل الزراعية ومصانع الأغذية وتحويلها إلى مواد ذات أهمية اقتصادية كالإيتانول المستخدم كوقود حيوي (Karmakar وRay،2011).

يستطيع عدد كبير من الكائنات الحية الدقيقة المجهرية تفكيك السللوز، إلا أنَّ عدداً قليلاً منها ينتج كميات كبيرة من المعقد الإنزيمي خارج الخلية. تعدُّ الفطور الكائنات المجهرية الرئيسة المنتجة لإنزيم السلولاز (Immanuel وزملاؤه، 2006). يعد جنس

Trichoderma.spp واحد من أهم الفطور المحللة للمواد السلولوزية، ودرس إنتاجه لهذه الإنزيمات بشكل موسع نظراً إلى أنَّ معقد إنزيمات السلولاز المنتجة بواسطة هذا الفطر ذو فعالية عالية تفوق فعالية الإنزيمات ذات الأصل البكتيري بنحو مئة ضعف. (غانم، 2012) (Amouri وGargouri، 2006؛ Adsul وزملاؤه، 2007؛ Kumar وزملاؤه، 2008؛ Martins وزملاؤه، 2008). يوجد هذا الجنس في التربة، وعلى بقايا النباتات، والأخشاب المتحللة. معظم الأنواع التابعة لهذا الجنس تقوم بتحليل السلولوز وأهمها *T.viride T.reesei*، (Kubicek وزملاؤه، 2001)، ولبعض الأنواع القدرة على إنتاج المواد المضادة للفطور (Haran وزملاؤه، 2006) لذا تستخدم في المكافحة الحيوية ضد الممرضات النباتية (Chet وInbar، 1994؛ Kucuk، 2000؛ Harman، 2006)، ويتبع هذا الجنس لمملكة الفطور (من حقيقيات النوى Eukaryota)، صف *Sordariomycetes*، رتبة *Hypocreales*،عائلة *Hypocreaceae*.

وهناك العديد من الدراسات عن إنتاج إنزيمات السلولاز من هذا الفطر باستخدام أنواع مختلفة من المخلفات النباتية مثل قوالح الذرة، والتبن، وقشور الرز، ودقيق فول الصويا، وتفل قصب السكر، وتفل التفاح، وأوراق الأشجار، وبقايا الأخشاب...وغيرها من المخلفات رخيصة الثمن الأمر التي تسهم في خفض تكاليف إنتاج هذا الإنزيم (Irfan وزملاؤه، 2012)، وقد درس Ahmed وزملاؤه (2009) إنتاج إنزيم السيلولاز من فطر *T.harzianum* باستخدام مصادر كربونية مختلفة: كربوكسي متيل السلولوز، وقوالح الذرة، والتبن، والإكزيلوز، ووجد أن درجة الحرارة المثالية 28°م ودرجة الحموضة المثالية pH =5.5 ومدة التحضين 120 ساعة.

وقد هدف البحث إلى الحصول على عزلات فطرية نقية من جنس *Trichoderma.spp* من ترب محلية، وغربلة السلالات المنتجة للإنزيم، وأمثلة ظروف إنتاج الإنزيم بواسطة الفطر المعزول من التربة من حيث درجة الحرارة، pH، وسرعة التهوية، ومدة التحضين باستخدام تراكيز مختلفة من تبن القمح كمصدر كربوني وحيد.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات ومصادرها: جمعت 45 عينة وبشكل عشوائي من مناطق مختلفة من القطر(دمشق- كلية الزراعة، حمص، اللاذقية)، وتضمنت العينات 30عينة تربة، 8عينات من الخشب المتحلل و7عينات كمبوست مستنزف (مخلفات إنتاج الفطر الزراعي). جففت هوائياً على درجة حرارة الغرفة مدة 24 ساعة، وغربلت ثم طحنت وجمعت في أكياس من البولي اتيلين لإجراء عملية العزل لاحقاً (الجدول1).

الجدول (1) مصادر العينات التي عزل منها الفطر ونوعها

نوع العينة	المحافظة		
	دمشق	حمص	اللاذقية
تربة	16	7	7
خشب متحلل	ــ	3	5
كمبوست الفطر الزراعي	7	ــ	ــ

أوساط الزرع والكواشف المستخدمة: وسط آغار البطاطا والدكستروز (PDA) Dextrose Agar: حُضّر بحسب تعليمات الشركة الصانعة Himedia ووسط آغار تشابيك: حُضّر بحسب Hoking و Pitt (1997) ويتكون من 30غ سكروز، و1غ نترات الصوديوم1غ، وفوسفات البوتاسيوم الثنائية1غ، وكلور البوتاسيوم 0.5غ، وفوسفات المغنزيوم المائية 0.5غ، وكبريتات الحديدي المائية 0.01غ، وآغار15غ وماء مقطر 1000 مل ضبط الـ PH النهائي على 6.2 ثم عقم الوسط بالأوتوكلاف على درجة حرارة 120°م مدة 15 دقيقة ثم برد إلى درجة حرارة 45°C ووزع في أطباق بتري معقمة وترك حتى التصلب، ووسط اختبار الفعالية الإنزيمية: حضر الوسط بحسب Shahriarinour وزملائه (2011) ويتكون من كربوكسي ميتيل سلولوز CMC 10غ/ل، ونترات صوديوم $NaNO_3$ 6.5غ/ل، وفوسفات ثنائية البوتاسيوم K_2HPO_4 6.5غ/ل، مستخلص الخميرة 0.3غ/ل، وكلور البوتاسيوم 6.5غ/ل، وكبريتات المغنزيوم المائية 6.5غ/ل، وآغار 17.5 غ/ل وعقم وسكب كما ذكر أعلاه.

الوسط المستخدم لإنتاج إنزيمات السلولاز: وحُضّر بحسب Vintila وزملائه (2010)، ويتكون من كبريتات الأمونيوم 0.14%، وفوسفات البوتاسيوم الأحادية 0.2%، وكبريتات المغنزيوم المائية 0.03%، وكلور الكالسيوم المائي 0.04 %، ويوريا 0.03%، وتوين 80 0.05% فضلاً عن العناصر الصغرى الآتية: كبريتات الحديدي المائية 5مغ/100مل، وكبريتات الزنك المائية 1.4 مغ/100مل، وكبريتات المنغنيز المائية 1.56مغ/100مل، وكلور الكوبالت 2 مغ/100مل يؤخذ 1مل من كل من المحاليل السابقة ويضاف إلى الوسط ويكمل الحجم حتى ليتر.

يحضر الوسط ويوزع 50 مل في كل دورق مخروطي سعة 250 مل، يضبط الـ pH بحسب القيم المدروسة وتضاف الركيزة بالتركيز المطلوب كمصدر كربوني وحيد ويعقم الوسط بالأوتوكلاف على درجة حرارة 120°م مدة 15 دقيقة ثم تُبرَّد إلى درجة حرارة 45°م

عزل فطر *Trichoderma.spp* وتشخيصه: عُزِلَ فطر *Trichoderma.spp* من عينات مصادرمختلفة باستخدام طريقة تخفيف محلول التربة إذ حضرت التخفيفات (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6}) باستخدام الماء المقطر المعقم. أخذ 1مل من كل تخفيف ووضع في طبق بتري فوق وسط PDA ثم حرك الطبق حركة رحوية لضمان

توزيعه على سطح الوسط وحضرت 3 أطباق بتري لكل تخفيف. وضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25±1°م مدة أسبوع مع الفحص يومياً بعد اليوم الثالث. شخصت استناداً إلى الصفات الشكلية: لون مستعمرة الفطر وشكل الجوامل الكونيدية وطريقة تفرعها وصفات الأبواغ من حيث الشكل واللون.

الكشف عن إنتاج إنزيمات السلولاز: لقحت أطباق بتري الحاوية على وسط اختبار الفعالية بمعلق بوغي مأخوذ من مستعمرات نامية على آغار البطاطا والدكستروز (PDA) وبعمر 5 أيام؛ وذلك بعمل حفرة في طبق المستنبت بواسطة الثاقب الفليني بقطر 5 مم ووضع بداخلها 200 ميكروليتر من المعلق البوغي المحضر، ثم حضنت الأطباق على درجة حرارة 28°م مدة 5 أيام تلاها تحضين على درجة حرارة 50°م مدة 18 ساعة؛ وذلك بواقع ثلاثة مكررات لكل عينة قيس بعدها قطر الهالة الشفافة المتشكلة بعد غمر الأطباق بمحلول أحمر الكونغو0.01% مدة 15 دقيقة، تلاها غمر الأطباق لإزالة المتبقي من الصبغة بمحلول كلور الصوديوم M1 مدة 15 دقيقة.

إنتاج إنزيمات السلولاز بالطريقة السائلة باستخدام التبن كمصدر كربوني وحيد: حُضّر وسط إنتاج إنزيمات السيلولاز المذكور ووزع على دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 50 مل لكل دورق، ثم أضيف التبن بتراكيز (1%، 3%، 5%) بحسب معاملات التصميم الإحصائي المعتمد (الجدول2). عقمت الدوارق بالأوتوكلاف على درجة حرارة 120°م لمدة 15دقيقة، ثم لقح كل دورق بـ 2 مل من معلق بوغي (10^6X1) بوغة/مل محضر من مزرعة فطر عمرها 7 أيام، وحضنت بحسب التصميم الإحصائي المعتمد.

استخلاص الإنزيم: أجريت عملية التثفيل بسرعة 8000 دورة/دقيقة مدة 15 دقيقة على درجة حرارة 4°م لفصل الكتلة الحيوية عن المستخلص الإنزيمي، ثم تلاها عملية ترشيح للسائل الحاوي على الإنزيم.

قياس الفعالية الإنزيمية باستخدام المطياف الضوئي Spectrophotometer: حضر محلول قياسي من الغلوكوز بتركيز 10مغ/مل وحضرت منه التخافيف (1:1.5، 1:2، 1:3، 1:5) باستخدام محلول موقٍ من حمض السترات pH=4.8 بتركيز M0.05 للحصول على سلسلة من المحاليل القياسية للغلوكوز.قيست الامتصاصية لكل تركيز من التراكيز السابقة على طول موجة 540 نانومتراً. ثم قيست الفعالية الإنزيمية اعتماداًعلى طريقة3، 5-Di Nitro Salicylic acid (DNS) (Ghose، 1987 ; Adney وBaker، 2008) وذلك بإضافة 1مل من محلول موقي سترات pH =4.8 بتركيز M0.05 إلى أنبوب اختبار حاوٍ على ركيزة التفاعل، وهي عبارة عن شريحة من ورق الترشيح (Whatman No.1) بأبعاد 1×6 سم، ثم أضيف 0.5 مل من الرشاحة الحاوية على الإنزيم الخام (أو من التخافيف المحضرة من الرشاحة في حال كان تركيز الغلوكوز في الرشاحة

يساوي 2 مغ/0.5 مل أو أكثر) فضلاً عن أنابيب شاهد لكل تخفيف وشاهد للرشاحة وشاهد لمحلول DNS مع الركيزة .

حضنت الأنابيب جميعها في حمام مائي بدرجة حرارة 50°م مدة 60 دقيقة، ثم أوقف التفاعل بإضافة 3 مل من محلول DNS وحضنت الأنابيب بدرجة غليان الماء مدة 5 دقائق، ترفع بعدها مباشرة لتوضع في حمام ثلجي مدة لا تقل عن 20 دقيقة حتى تبرد الأنابيب، ثم أخذ 2.5 مل ماءً مقطراً ووضعت في خلية المطياف الضوئي وأضيف إليها 200 ميكروليتر من العينة، وحركت جيداً حتى تجانس اللون وقيست الامتصاصية على طول موجة 540 نانو متراً بعد تصفير الجهاز على الشاهد الحاوي ركيزة ومحلول DNS فقط. حُدّد تركيز الغلوكوز، ومن ثمَّ الفعالية الإنزيمية عن طريق المنحنى القياسي. وعرفت وحدة الفعالية الإنزيمية بأنها كمية الإنزيم التي تنتج Mμ1 من الغلوكوز في امل من الركيزة خلال دقيقة التي يعبر عنها بـ U/ مل.

أمثلة الظروف لإنتاج إنزيمات السلولاز باستخدام التبن كركيزة: أُجريت الدراسة باستخدام تصميم التجارب المتقدم Response Surface Methology باستخدام برنامج Minitap Optimization Method لدراسة تأثير كل عامل على حدة وتأثير العوامل المتفاعلة مع بعضها بعضاً.

تصميم التجربة: دُرست الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم (درجة الحرارة، درجة الحموضة، مدة التحضين، سرعة التهوية وتركيز الركيزة). درس كل متغير عند ثلاثة مستويات (+1، 0، -1) كما يأتي:

درجة الحرارة (20، 30، 40)°م، درجة الحموضة pH= (4، 6، 8)، ومدة التحضين (3، 5، 7) أيام، وسرعة الدوران (100، 200، 300) دورة /دقيقة، وتركيز الركيزة (1%، 3%، 5%)، وتضمن التصميم 63 معاملة (الجدول 3).

عزل العزلات الفطرية وتشخيصها: عزلت 18 عزلة تابعة لجنس *Trichoderma* من مصادر مختلفة. عشر عزلات من محافظة دمشق وأربع عزلات من محافظة اللاذقية وأربع عزلات من محافظة حمص. شخصت على أساس الجنس (Bissett،1991) فقط، إذْ تميّزت العزلات بالصفات التالية: المشيجة سريعة النمو تعطي وسائد بيضاء أو خضراء أو صفراء من الحوامل البوغية. تبدو الحوامل الكونيدية تحت المجهر ذات فروع جانبية تحمل فياليدات قصيرة ذات توضع حلقي أو دواري تتوضع على قممها الأبواغ وحيدة الخلية لتظهر بشكل كتل أو عناقيد.

تصميم التجربة: استخدم التصميم الإحصائي المذكور في الفقرة (7) من مواد وطرائق البحث لأمثلة ظروف إنتاج الإنزيم والذي يتألف من 64 معاملة و5 متغيرات وتم الحصول على قيم الفعالية الإنزيمية لكل معاملة كما هو موضح في الجدول (3):

النتائج والمناقشة

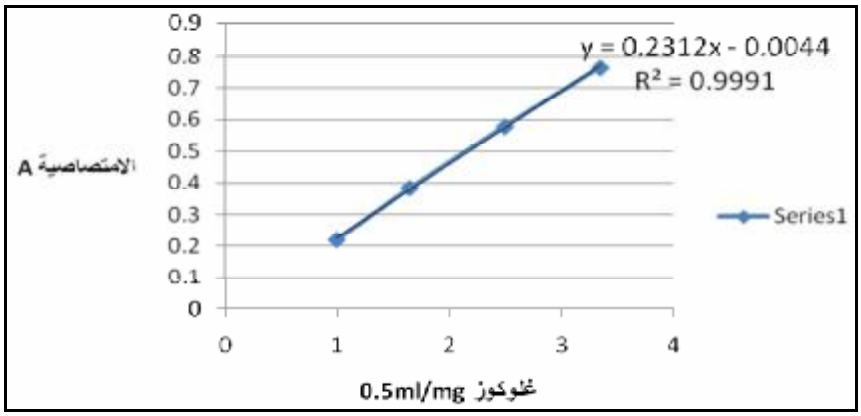
اختبار قدرة العزلات الفطرية على إنتاج إنزيم السلولاز على الأوساط الصلبة: تبيّن نتيجة فحص كفاءة إفراز إنزيم السلولاز لـ 18 عزلة من فطر *Trichoderma* بأن العزلات جميعها لها القدرة على إنتاج إنزيم السلولاز من خلال تحليل كربوكسي متيل السيللوز (1%) وتشكيل هالات شفافة متباينة في أقطارها (الجدول 2)، إذْ أعطت العزلات Ti، Tg، Tr كفاءة إفرازية جيدة وراوح متوسط قطر الهالة بالسنتيمتر 7.0، 6.1، 5.8، لكل منها على التوالي، إذْ أعطت العزلة Tj أدنى كفاءة لإنتاج الإنزيم بمتوسط قطر هالة 0.5 سم، في حين أعطت العزلة Tr أعلى كفاءة لإنتاج الإنزيم بمتوسط قطر 7سم واستخدمت لاحقاً في مرحلة الأمثلة، أمّا باقي العزلات فكانت متوسطة الكفاءة.

الجدول (2) كفاءة العزلات المنتجة لإنزيم السيلولاز اعتماداً على متوسط قطر الهالة (سم).

رمز العزلة		المتوسط± SD	مصدر العزلة
1	Ta	0.3±2.7	تربة-دمشق
2	Tb	0.3±3.3	تربة-دمشق
3	Tc	0.2±4.4	كمبوست-دمشق
4	Td	0.5±3.5	كمبوست-دمشق
5	Te	0.2 ±1.3	كمبوست-دمشق
6	Tf	0.2 ±1.8	كمبوست-دمشق
7	Tg	0.4± 6.1	كمبوست-دمشق
[2]	Th	0.3 ± 3.7	كمبوست-دمشق
9	Ti	0.2± 5.8	كمبوست-دمشق
10	Tj	0.1 ± 0.5	كمبوست-دمشق
11	Tk	0.3±3.9	تربة –اللاذقية
12	Tl	0.3±2.6	تربة –اللاذقية
13	Tm	0.4 ± 4.1	خشب متحلل–اللاذقية
14	Tn	0.9 ± 2.8	خشب متحلل–اللاذقية
15	To	0.5 ± 5.5	تربة-حمص
16	Tp	0.2±1.1	تربة-حمص
17	Tq	0.1±0.7	تربة-حمص
18	Tr	0.2 ± 7.0	تربة-حمص

قياس فعالية إنزيمات السلولاز في إنتاج الغلوكوز:

قيست الامتصاصية لعدة تراكيز من الغلوكوز (1.0، 1.65، 2.50، 3.35) مغ/0.5 مل (Adney وBaker، 2008) للحصول على المنحنى القياسي للفعالية الإنزيمية؛ وذلك لمعرفة قيم الامتصاص الضوئي للعينات على طول موجة 540 نانومتراً (الشكل 1)، وحُسبت كمية الغلوكوز المتحررة وفق المعادلة الآتية: Y=0.2312X - 0.0044 إذْ: Y تمثل الامتصاصية وX تمثل غلوكوز 0.5 **مل/مغ**.



الشكل (1) المنحنى القياسي لفعالية إنزيم السيلولاز

ومنها يمكن حساب فعالية الإنزيم باستحدام المعادلة الآتية:

FPU unite/ml =عدد ميلي غرامالت الغلوكوز المتحـــررة × 0.185 (Ghose، 1987)

FPU: Filter Paper Unit

الجدول (3) الفعالية الإنزيمية في المعاملات المدروسة

Blocks	Temperature C°	pH	Aeration speed rpm/m	Substrate concentration %	Incubation time day	Enzyme activity U/ml
1	20	4	100	1	7	0.285
1	40	4	100	1	3	0.000
1	20	8	100	1	3	0.170
1	40	8	100	1	7	0.010
1	20	4	300	1	3	0.190
1	40	4	300	1	7	0.010
1	20	8	300	1	7	0.390
1	40	8	300	1	3	0.010
1	20	4	100	5	3	0.092
1	40	4	100	5	7	0.020
1	20	8	100	5	7	0.210
1	40	8	100	5	3	0.090
1	20	4	300	5	7	0.170
1	40	4	300	5	3	0.030
1	20	8	300	5	3	0.110
1	40	8	300	5	7	0.030
1	20	6	200	3	5	0.420
1	40	6	200	3	5	0.488
1	30	4	200	3	5	0.401
1	30	8	200	3	5	0.550
1	30	6	100	3	5	0.367

1	30	6	300	3	5	0.440
1	30	6	200	1	5	0.350
1	30	6	200	5	5	0.559
1	30	6	200	3	3	0.712
1	30	6	200	3	7	0.440
1	30	6	200	3	5	0.699
1	30	6	200	3	5	0.690
1	30	6	200	3	5	0.705
1	30	6	200	3	5	0.675
1	30	6	200	3	5	0.687
1	30	6	200	3	5	0.691
2	20	4	100	1	7	0.280
2	40	4	100	1	3	0.000
2	20	8	100	1	3	0.150
2	40	8	100	1	7	0.020
2	20	4	300	1	3	0.220
2	40	4	300	1	7	0.010
2	20	8	300	1	7	0.380
2	40	8	300	1	3	0.010
2	20	4	100	5	3	0.080
2	40	4	100	5	7	0.030
2	20	8	100	5	7	0.260
2	40	8	100	5	3	0.080
2	20	4	300	5	7	0.150
2	40	4	300	5	3	0.020
2	20	8	300	5	3	0.014
2	40	8	300	5	7	0.040
2	20	6	200	3	5	0.435
2	40	6	200	3	5	0.485
2	30	4	200	3	5	0.397
2	30	8	200	3	5	0.555
2	30	6	100	3	5	0.360
2	30	6	300	3	5	0.450
2	30	6	200	1	5	0.355
2	30	6	200	5	5	0.588
2	30	6	200	3	3	0.714
2	30	6	200	3	7	0.446
2	30	6	200	3	5	0.697
2	30	6	200	3	5	0.692
2	30	6	200	3	5	0.690
2	30	6	200	3	5	0.678
2	30	6	200	3	5	0.690
2	30	6	200	3	5	0.695

إذ يوضح الجدول قيمة الفعالية الإنزيمية لكل معاملة من المعاملات المتبعة حسب التصميم الإحصائي المتبع.

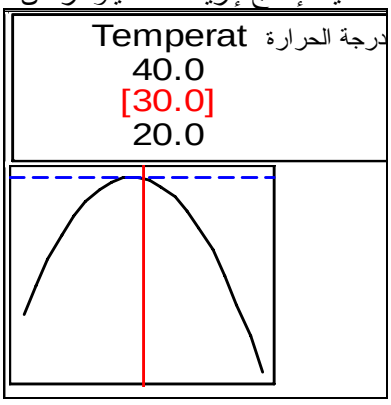
تحليل التجربة: يبيّن الجدول (4) معادلات الانحدار من الدرجة الثانية للمتغيّرات المدروسة X (درجة الحرارة، PH، ومدة التحضين، وسرعة التهوية، وتركيز الركيزة) وفعالية الإنزيم Y. إذْ يلاحظ ارتباط المتغيرات المدروسة جميعها بفاعلية الإنزيم بمعادلات انحدار من الدرجة الثانية عالية المعنوية، والعلاقة بين هذه العوامل وفعالية الإنزيم على شكل منحنى (قطع مكافئ).

الجدول (4) علاقات العوامل المدروسة في فعالية الإنزيم.

المتغير	معادلة الانحدار $Y=a+bX+cX^2$	معنوية المعادلة p	معنوية المعاملات a p	معنوية المعاملات b p	معنوية المعاملات c p	R^2	معنوية R^2 p
Temperature	$Y=0.57-0.07X-0.42X^2$	0.00	0.00	0.00	0.00	85.7%	<0.05
pH	$Y=0.57+0.02X-0.42X^2$	0.00	0.00	0.45	0.00	91.3%	<0.05
Aeration speed	$Y=0.58+0.01X-0.43X^2$	0.00	0.00	0.84	0.00	89.5%	<0.05
Substrate concentration	$Y=0.57+0.01X-0.42X^2$	0.00	0.00	0.77	0.00	92.3%	<0.05
Incubation time	$Y=0.55+0.01X-0.40X^2$	0.00	0.00	0.60	0.00	90.4%	<0.05

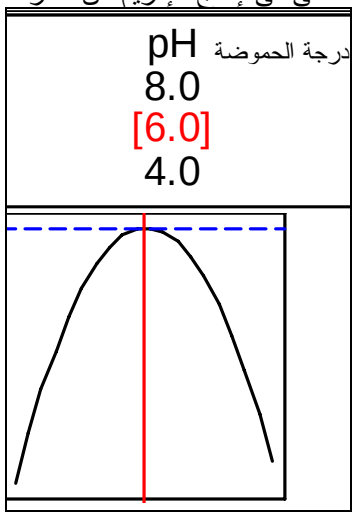
أمثلة ظروف إنتاج إنزيمات السيلولاز:

تأثير درجة الحرارة في فعالية الإنزيم: تشير النتائج المبيّنة في الشكل (2) إلى ازدياد الفعالية الإنزيمية بازدياد درجة الحرارة حتى 30°م التي مثلت درجة الحرارة المثالية لإنتاج الإنزيم، وإنّ ارتفاع درجة حرارة التحضين بعد ذلك قد رافقه انخفاض تدريجي في الفعالية الإنزيمية، وقاربت هذه النتائج ما ذكره Maurya وزملاؤه (2012)، حيث استخدم فطر *Trichoderma* ressei لإنتاج إنزيمات السلولاز، ودرس تأثير درجات حرارة مختلفة راوحت بين 25 °م و45°م في فعالية هذه الإنزيمات، ووجدوا أن درجة الحرارة المثالية لإنتاج إنزيمات السيلولاز من فطر باستخدام التبن كركيزة هي 30°م.



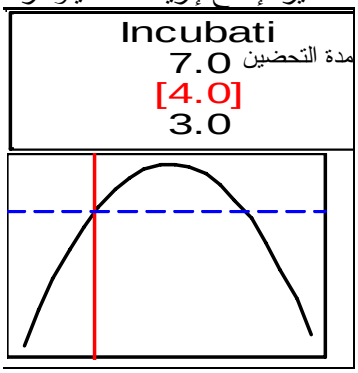
الشكل (2) درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيمات السلولاز.

تأثير درجة الحموضة في فعالية الإنزيم: بينت النتائج (الشكل 3) أن درجة الحموضة المثالية لإنتاج الإنزيم ضمن ظروف التجربة المثالية هي pH= 6، هذا يتوافق مع ما توصل إليه (Al.Taweil وزملاؤه، 2009) الذين استخدموا فطر *T.viride* لإنتاج الإنزيم ضمن مدى pH راوح بين 4 إلى 8 فكانت درجة الحموضة المثالية pH=6. قاربت هذه النتيجة أيضاً نتيجة Ahmed وآخرين (2009) إذْ إنَّ درجة الحموضة PH= 5.5 هي المثلى في إنتاج الإنزيم من فطر *T.harzianum*.



الشكل (3) درجة الـــ pH المثـالي لإنتـاج إنزيمـات السلولاز.

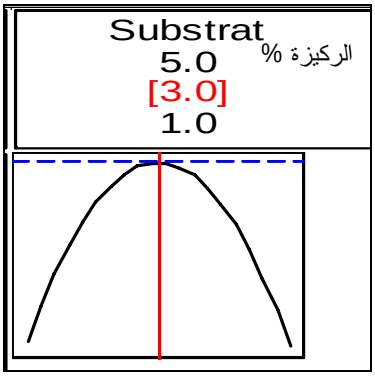
تأثير مدة الحضانة في فعالية الإنزيم: رافق تحضين الفطر المنتج للإنزيم مدة 4 أيام في هذه الدراسة الحصول على أقصى فعالية إنزيمية ضمن الظروف المثالية لإنتاج إنزيم السيلولاز، كما هو موضّح في الشكل (4)، توافقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه (Al.Taweil وزملاؤه، 2009) بأن الفعالية الإنزيمية القصوى رافقت استخدام 4 أيام من التخمير لإنتاج إنزيمات السيلولاز من فطر *T.viride*.



الشكل (4) مدة الحضانة المثلى لإنتاج إنزيمات السلولازز

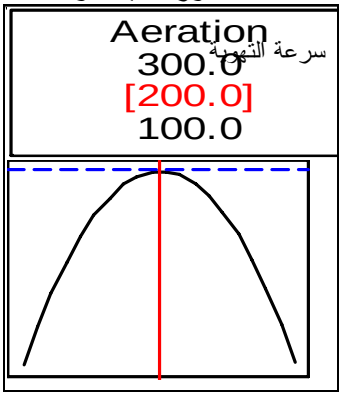
تأثير تركيز التبن كنسبة مئوية من حجم وسط التخمير في فعالية الإنزيم:

بيّنت النتائج أن نسبة التبن المثالية لإنتاج إنزيم السيلولاز بالطريقة السائلة ضمن الظروف المثالية هي 3% كما هو موضّح في الشكل (5)، وهذه النتيجة قريبة لما توصل إليه Gori و Malana (2010) عند إنتاج إنزيمات السيلولاز باستخدام 4% من التبن لإنتاج إنزيمات السيلولاز لكن من فطر *Aspergillus niger*. وقد وجد Ojumu وزملاؤه (2003) أن 3% هي النسبة المثالية لإنتاج إنزيمات السيلولاز من فطر *A.niger* باستخدام قوالح الذرة كركيزة كمصدر كربوني.



الشكل (5) تركيز التبن المثلى لإنتاج إنزيمات السلولاز

تأثير سرعة التهوية في فعالية الإنزيم: لوحظ ازدياد الفعالية الإنزيمية بزيادة سرعة التهوية حتى 200 دورة/دقيقة لتعود للتناقص مع زيادة السرعة التهوية حتى 300دورة/دقيقة كما هو موضّح في الشكل (6)، وسرعة التهوية المثالية ضمن الظروف المثالية هي 175 دورة/الدقيقة، وقد توافقت مع Al.Taweil وزملاؤه (2009) لإنتاج إنزيمات السيلولاز من فطر *T.viride* إذْ استخدموا سرعات تهوية مختلفة راوحت بين 100-250 دورة/دقيقة، وكانت سرعة التهوية المثالية 175دورة/الدقيقة.



الشكل (6) سرعة التهوية المثلى لإنتاج إنزيمات السلولاز

واستنتج أن عزلات جنس *Trichoderma* المعزولة محلياً جميعها تستطيع إنتاج إنزيمات السلولاز بدرجات متفاوتة. وتميّزت العزلة Tr عن العزلات الأخرى بفعالية إنزيمية وبينت نتائج أمثلة الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم من فطر *Trichoderma* (Tr) أن هناك تأثيراً معنوياً لكل من درجة الحرارة ودرجة الحموضة ومدة التحضين ونسبة التبن المضاف إلى وسط التخمير وسرعة التهوية.

References المراجع

غانم، ردينة. 2012، دراسة العلاقة بين إفراز إنزيمات السلولاز والقدرة الإمراضية لعزلات بكتيرية ممرضة للنبات، رسالة ماجستير، قسم وقاية النبات. كلية الزراعة، جامعة دمشق.

Adney, B. and J. Baker. 2008. Measurement of cellulase activities, Department of Energy Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, National Renewable Energy Laboratory (NREL), Colorado, 1-8.

Adsul, M. G., K. B. Bastawde, A.J.Varma and D. V. Gokhale. 2007. Strain improvement of Penicillium janthainellum NCIM 1171 for increased cellulase production. Bioresource Technology, 98, (7): 1467-1473.

Aehle, W. 2007. Enzymes in Industry, Production and Applications. The Netherlands.

Ahmed, S., A. Bashir, H.Saleem, M. Saadia and A. Jamil. 2009. Production and Purification of Cellulose Degrading Enzymes from a Filamentous Fungus T richoderma Harzianum. Pakistan Journal of Botany, 41, (3) : 1411-1419.

Ahmed, S., N. Aslam, F. Latif, M. I.Rajoka and A. Jamil. 2005. Molecular cloning of cellulose genes from Trichoderma harzianum. Bentham Science Publishers, TheNetherlands.

Al-Taweil, H. I., M. Bin Osman, A.Abdul Hamid and W. M. W. Yusoff. 2009. Optimizing of Trichoderma viride cultivation in submerged state fermentation. American Journal of Applied Sciences 6 (7) : 1284-1288.

Amouri, B. and A. Gargouri. 2006. Characterization of a novel.- glucosidase from a Stachybotrys strain. Biochemical Engineering Journal 32, 191-197.

Bguin, P. and P. J. Aubert., 1994. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiology Reviews, 13 : 25-58.

Bissett, J. 1991. A revision of the genus Trichoderma. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany, 69, (11) : 2357-2372.

Chapin, F. S., P. A. Matson and A. H. Mooney. 2002. Principles of terrestrial ecosystem ecology. Verlag New York, NY.

Chet, I. and J. Inbar. 1994. Biological control of fungal pathogens. Applied Biochemistry and Biotechnology, 48 : 37-43.

Gao, J., H. Weng, D. Zhu, M. Yuan, F. Guan and Y. Xi. 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal Aspergillus terreus M11 under solid-state cultivation of cornstover. Bioresource Technology, 99, 7623-7629.

Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. international union Pure and Applied Chemistry - Applied chemistry division - commission on biotechnology, 59 : 257-268

Gori, M. I. and A. M. Malana. 2010. Production of carboxymethyl cellulase from local Isolate of Aspergillus species. Pakistan Journal of Life and Social Sciences, 8, (1) :1-6.

Haran, S., H. Schickler and I. Chet. 1996. Molecular Mechanisms of Lytic Enzymes Involved in the Biocontrol Activity of Trichoderma harzianum. Microbiology, 142 : 2321-2331.

Harman, G. 2006. Symposium the Nature and Application of Biocontrol Microbes II: Trichoderma spp Overview of Mechanisms and Uses of Trichoderma.spp. Association for Psychological Science, 96 : 190-194.

Himmel, M. E., M. F. Ruth and Wyman., C. E. 1999. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. Current Opinion in Biotechnology 10: 358-364.

Hoking, A. and J. Pitt. 1997. Fungi and Food Spoilage. Blackie Academic Professional : 366-368.

Immanuel, G., R. Dhanusa, P .Prema and A. Palavesam. 2006. Effect of different growth parameters on endo glucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. International journal of Environmental Science and Technology, 3, (1): 25-34.

Irfan, M., M. Nadeem and Q. Syed. 2012. Influence of Nutritional Conditions for Endoglucanase Production by Trichoderma viride in SSF. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 7, (1) : 07-12.

Jamil, A., S.Naim, S. Ahmed and M.Ashraf. 2005. Production of Industrially important enzymes using molecular approaches;cellulases and xylanases. Regency publications, New Delhi.

Karmakar, M. and R. Ray. 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. Research Journal of Microbiology, 6, (1) : 41-53.

Kubicek, C., R.Mach, C.Peterbauer and M.Lorito. 2001. Trichoderma: from genes to biocontrol. Journal of Plant Pathology, 83 : 11-23.

Kucuk, C. 2000. Trichoderma harzianum ile Toprak K. kenli Bazi Bitki Patojenlerinin Kontrol. Anadolu University,

Kumar, R., S. Singh and O. V Singh. 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35 : 377-391.

Li, Y. H., M.Ding, J. Wang, G. J. Xu and A.Zhao. 2006. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose degrading bacterium, Bacillus sp. AC-1. Applied Microbiology and Biotechnology, 70: 430-436.

Lynd, L., P. Weimer, W.van Zyl and I.Pretorius. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66 : 506-577.

Martins, L. F., D. Kolling, M.Camassola, A. J.P. Dillon and P.Ramos., L. 2008. Comparison of Penicillium echinulatum and Trichoderma reesei Cellulases in Relation to Their Activity Against Various Cellulosic Substrates. bioresource Technology, 99 (5) : 1417-1424.

Maurya, D. P., D. Singh, D. Pratap and P. J. Maurya. 2012. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by Trichoderma reesei. Journal of Environmental Biology, 33 : 5-8.

Ojumu, T., B. O.Solomon, E.Betiku, SK.Layokun and B.Amigun. 2003. Cellulase production by Aspergillus flvus Linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. African Journal of Biotechnology, 2, (6): 150-151.

Schallmey, M., A. Singh and O. Wared. 2004. Developments in the use of Bacillus Species for Industrial Production. Canadian Journal of Microbiology, 50 : 1- 1.

Shahriarinour, M., M. N. Abd Wahab, A.Ariff and R. Mohamad. 2011. Screening, isolation and selection of cellulolytic fungi from oil palm empty fruit bunch fibre. Biotechnology, 10, (1) : 108-113.

Vintila, T., V. Croitoriu, M. Dragomirescu and D. Nica. 2010. The Effects of Bioprocess Parameters on Cellulase Production with Trichoderma viride CMIT35. Animal Science and Biotechnologies, 43 (1): 337-340.

Received	**2013/02/06**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2013/07/01**	**قبول البحث للنشر**