The ability of some local fungal isolates to produce xylanase and studying of the enzymatic activity

Dr. Ramez mohammad[*]
Dr. Sheiam sulaeman[**]
Dr. Nesrin naksho[***]
Samaher sakkour[****]

(Received 19 / 9 / 2021. Accepted 30 / 11 /2021)

□ ABSTRACT □

The following fungal species were isolated from therhizosphere of olive plant (*Olea europaea*.L): *Trichoderma harzianum*, *T.viride*, *T.longibrachiatum* and *T.asperellum*. It was shown that all isolated fungi had capacity to produce xylanase using an agricultural weed, *Prosopis juliflora* pods were powdered in the grinder and sieved. The particles with size of 0.425 mm pods were used in the study. *Trichoderma* spp (10^5 spores/mL) was included into 250 mL erlenmeyer flask containing 100 mL sterilized medium (30 g/L pretreated pods and 4 g/L calcium carbonate) at PH 6.5 and incubated at 30 ˚C for 120 h in a shaker at 150 rpm, while the fungus *Trichoderma harzianum* gave the highest capacity for the production of this enzyme (208.4 U/mL). the fungus *T.longibrachiatum* gave less productive ratio (20.6 U/mL).the study of different carbon sources for the fungus *Trichoderma harzianum*, *T.viride*, *T.longibrachiatum* and *T.asperellum* showed that sucrose was the best media in xylanase productivity. Also The study of different nitrogen sources for the fungus *Trichoderma harzianum*, *T.viride*, *T.longibrachiatum* and *T.asperellum* showed that yeast extract was the best media in xylanase productivity for *Trichoderma harzianum*, *T.viride*, *T.longibrachiatum* but casein was the best media in xylanase productivity for *T.asperellum*.

Keywords: xylanase, *Trichoderma* spp, nitrogen sources, carbon sources, *Prosopis juliflora,* fungal species.

[*]**Professor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria. Email:gobranramz@gmail.com**
[**] **Professor Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria. sheiamsulaeman@hotmail.com**
[***]**Professor in NCBT in Damascus. nisrinnakshoo@yahoo.com**
[****] **(ph.D.) student, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria. samahersakkour@outlook.sa**

قدرة بعض العزلات الفطرية المحلية على إنتاج إنزيم الكزيليناز ودراسة فعاليته الإنزيمية

د. رامز محمد*

د. شيم سليمان**

د. نسرين نقشو***

سماهر صقور****

(تاريخ الإيداع 19 / 9 / 2021. قبل للنشر في 30 / 11 / 2021)

ملخّص

عزلت الأنواع الفطرية التالية من المحيط الجذري لنبات الزيتون *Olea europaea*: (*Trichoderma harzianum*, *T.viride*, *T.longibrachiatum*, *T.asperellum*)، حيث أظهرت جميع العزلات المدروسة قابلية لإنتاج إنزيم الكزيليناز وذلك عند تنميتها في وسط مكون من قرون نبات الغاف (*Prosopis juliflora*) المطحونة والمغربلة ذات قطر 425 ميكرون(30 غ/ل) والمضاف إليها 4 غ من كربونات الكالسيوم، وتمّ ضبط رقم ال pH على 6.5 ودرجة الحرارة 30° مئوية، ثم تمّ تلقيح الوسط بمعلق بوغي ذي تركيز (10^5 بوغ/مل)، ثم تمّ تحضين الدورق المخروطي في حاضنة هزازة بسرعة دوران 150 دورة/دقيقة ولمدة 120 ساعة. أظهرت نتائج دراسة الفعالية الإنزيمية للأنواع الفطرية المختلفة وجود تباين في قدرة هذه الفطريات على إنتاج إنزيم الكزيليناز، حيث أعطى النوع الفطري *Trichoderma harzianum* أعلى فعالية لإنزيم الكزيليناز بعد مرور سبعة أيام من التحضين والتي بلغت 208.4 وحدة إنزيم/ميليليتر، في حين أعطت الأنواع الفطرية الباقية إنزيمات كزيليناز بفعالية إنزيمية أقل (118.09وحدة إنزيم/ميليليتر للنوع *T.viride* ، و 70.23 وحدة إنزيم/ميليليتر للنوع *T.asperellum* ، وفي المرتبة الأخيرة النوع *T.longibrachiatum* بفعالية 20.6 وحدة إنزيم/ميليليتر،. وتبين من دراسة تأثير مصادر كربونية مختلفة على الفعالية الإنزيمية للأنواع الفطرية السابقة الذكر، أنّ السكروز كمصدر كربوني أعطى القيمة الأعلى للفعالية الإنزيمية مع مختلف أنواع الفطريات المدروسة، وكذلك أظهرت دراسة تأثير مصادر مختلفة للنتروجين على الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكزيليناز المنتج من قبل الأنواع الفطرية سابقة الذكر، أن الكازئين هو الأفضل من حيث تأثيره في الفعالية الإنزيمية لكل من أنواع فطر *Trichoderma harzianum* و *T.asperellum* و *T.longibrachiatum* ، أما بالنسبة للنوع الفطري *T.viride* فقد كان مستخلص الخميرة هو أفضل مصدر للنتروجين.

الكلمات المفتاحية : إنزيم الكزيليناز، فعالية الكزيليناز، *Trichoderma.spp*، نبات الغاف، الأنواع الفطرية.

* أستاذ ، قسم علوم الأغذية ، كلية الزراعة ، جامعة تشرين، اللاذقية. dr.gobranramz@gmail.com

** مدرس، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية.sheiamsulaeman@hotmail.com

*** باحثة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق.nisrinnakshoo@yahoo.com

**** طالبة دكتوراه، قسم علوم الأغذية ، كلية الزراعة ، جامعة تشرين ، اللاذقية.samahersakkour@outlook.sa

مقدمة

تعتبر إنزيمات الكزيلينياز Xylanases (endoxylanases, EC 3.2.1.8) من الإنزيمات المحللة للأرابينوكزيلان، ويقوم إنزيم الكزيلينياز Xylanase بتفكيك الرابطة 4−1 β ضمن السلسلة الرئيسية للكزيلان ويتحرر بفعل هذا الإنزيم سكريات مركبة ذات بلمرة عالية ومنخفضة، حيث يحلل إنزيم الكزيلينياز المكونات عديمة الذوبان في جدران الخلايا مثل مركبات البنتوزان arabinoxylan ويحولها إلى مركبات ذوابة(Silva *et al*.,2015)، وقد وجد لهذا الإنزيم العديد من التطبيقات الصناعية مثل عصائر الفاكهة، وفي إنتاج الإيتانول والورق والبيرة (Wong *et al*., 2000)، كما يستخدم أيضاً من أجل تحسين الخصائص الفيزيائية والحسية والريولوجية للعجين حيث يساعد في زيادة حجم الرغيف، (Dhiman *et al*., 2008).

تتألف جدران الخلايا النباتية بشكل عام من السيليلوز Cellulose والهيميسيليلوز Hemicellulose (الكزيلان بشكل أساسي) والليجنين المرتبطة مع بعضها البعض، فالليجنين يرتبط مع الكزيلان بروابط استيرية 4-O-methyl-D-glucuronic acid ، ويعتبر الهيميسيللوز (الكزيلان) ثاني أكبر سكر عديد polysaccharide ويشكل الجزء الأكبر من السكريات العديدة polysaccharides غير النشوية، وتختلف بنيته تبعاً لنوع النبات، لكنها دائماً تحتوي على روابط (1-4)β D− كزايلوبيرانوز، وبما أن معظم الكزيلان ذو بنية متشعبة فإن اختلاف البنية المرتبطة بالكزيلان ستنتج تنوعاً كبيراً (Beg *et al*. , 2001). أما فيما يتعلق بالكزيلان المتواجد في الحبوب، فهو يحتوي كمية مرتفعة من L−أرابينوز L-arabinose على ذرتي الكربون الثانية و الثالثة ولذلك يطلق عليه أرابينوكزيلان . arabinoxylane فالأرابينوز يرتبط مع الخطوط الأساسية للكزيلان بروابط 1,2- α أو1,3- α إما بشكل مفرد أو بسلاسل قصيرة، كما يرتبط الأرابينوز بدوره مع حمض جلوكورونيك glucuronic acid وحمض الفيروليك ferulic acid ، ويمثل الأرابينواكزيلان 25% و70% من بوليميرات جدران الخلايا النباتية الأندوسبرم وطبقة الأليرون بالترتيب (Juturu *et al*., 2011).

ويتم إفراز إنزيم الكزيلينياز خارج الخلية من قبل البكتيريا وفطريات العفن وبعض الخمائر، وتعتبر الفطريات الخيطية هي الأفضل من حيث استخدامها في مجال إنتاج إنزيم الكزيلينياز. حيث بيّنت الدراسات أن هذه الفطريات قادرة على إنتاج وإفراز خلوي لهذا الإنزيم بمعدلات مرتفعة(Silva *et al*.,2015)، إضافة إلى سهولة عزل وزراعة فطريات العفن، كما أن هذا الإنزيم يتواجد لدى الحشرات والحلزون والأعشاب البحرية وبذور النباتات في مرحلة الاستنبات في التربة (Abdel-Star, 2001).

أهمية البحث وأهدافه

تنبع أهمية هذا البحث من أنه يسلط الضوء على دور بعض الفطريات في إنتاج إنزيم الكزيلينياز، أما الهدف فهو الحصول على عزلات محلية من فطريات تمتلك مقدرة عالية لإنتاج إنزيم الكزيلينياز، فضلاً عن دراسة تأثير بعض المصادر الكربونية و النتروجينية في إنتاج إنزيم الكزيلينياز من الفطريات المدروسة.

طرائق البحث ومواده

1-الحصول على العزلات الفطرية:

استخدمت أربع عزلات فطرية محلية مختلفة وهي: (*Trichoderma harzianum, T.viride, T.longibrachiatum, T.asperellum*). تمّ الحصول على جميع العزلات من المحيط الجذري لشجرة الزيتون *Olea europaea* علماً أن الأشجار من الصنف الخضيري ذات عمر تقريبي ثلاثون سنة، على عمق (5-10 سم)، علماً أن الأشجار مزروعة في محيط سد السادس عشر من تشرين (اللاذقية، ناحية البهلولية، قرية القرامة)، باستخدام أطباق آغار تحوي مستنبت PDA (Potato –Dextrose Agar) وذلك بأخذ (0.5 g) من عينة التربة و تجفيفها (باتباع طريقة التجفيف الطبيعي في الظل) وطحنها ثم نثرها على سطح طبق بتري يحتوي على بيئة PDA والمضاف له مضاد حيوي أمبيسيلين وذلك لتفادي نمو البكتيريا، تمّ تحضين الأطباق عند درجة حرارة 25±2°م لمدة أسبوع مع مراعاة إجراء الفحص بشكل يومي ابتداء من اليوم الثالث. تم تحديد الأنواع لكل من العزلات المدروسة من خلال فحص المستعمرات النامية بالمجهر الضوئي وذلك بالاعتماد على شكل المستعمرة ولونها والفحص المجهري لتفرعات المشيجة والحوامل الكونيدية وشكل الأبواغ ولونها، وتمت مقارنة الصفات مع المراجع التصنيفية (Walter *et al*,2006)، حفظت عينة نقية من الأنواع المدروسة ضمن أنابيب اختبار على نحو مائل في البراد عند درجة حرارة 4°م، وتمَ تنشيط العزلات كل أسبوعين للمحافظة على حيوية الفطريات وفعاليتها.

2-تحضير المعلق البوغي:

تم تحضير المعلق البوغي من مستعمرات متبوغة على أطباق بتري، حيث غمرت المستعمرات ب20 مل ماء مقطر مع (0.1%) من Tween-80 وترك الطبق مغطى لمدة لا تقل عن ساعة حتى تتحرر الأبواغ ثم تمّ ضبط تركيز المعلق بواسطة شريحة العد (Venkatesh& Girija, 2009).

3-تحضير المادة الأولية:

تمّ جمع قرون نبات الغاف(*Prosopis juliflora*) المزروع في حديقة كلية الزراعة-جامعة تشرين، غسلت هذه القرون تحت ماء الصنبور الجاري بغية التخلص من الأوساخ والشوائب العالقة ثم جففت بشكل طبيعي في الظل، وطحنت هذه القرون بواسطة مطحنة مخبرية بحيث يصبح قطرها 425 ميكرون(Ramasamy *et al* ,2014).

4-إنتاج الإنزيم:

تمت إضافة المعلق البوغي ذي التركيز(10^5 بوغ/مل) في دورق مخروطي 250 مل الذي يحوي على 100 مل من وسط معقم(30 غ/ل من قرون نبات الغاف و 4 غ من كربونات الكالسيوم وضبط pH =6.5 ودرجة الحرارة 30° مئوية) ثم يوضع الدورق المخروطي في حاضنة هزازة بسرعة دوران 150 دورة/دقيقة ولمدة 120 ساعة. وبعد انقضاء فترة التخمر تمّ قياس الأس الهيدروجيني النهائي لكل دورق، ثم أجريت عملية الترشيح لمحتوى كل دورق باستخدام أوراق ترشيح من نوع(Whatman No.1) مجففة وموزونة مسبقاً ومثبتة على قمع بوخنر Bauchner funnel، وبعد انتهاء عملية الترشيح جففت أوراق الترشيح الحاملة للكتلة الحيوية في فرن تجفيف كهربائي عند درجة حرارة 70 م° لمدة 24 ساعة، ومن ثم تم قياس الكتلة الحيوية بفارق الوزنين باستخدام ميزان حساس. ثم أخذ الراشح ويتم إجراء عملية طرد مركزي بسرعة 10000دروة(rpm) لمدة 10 دقائق(Jampala *et al*,2017).

5-تقدير البروتين:

قدر البروتين وفق طريقة لوري (Lowry's method) (Lowry *et al*,1951) التي تعتمد في تقدير كمية البروتين على تفاعل كاشف فولين سيوكالتوFolin-ciocalteu (الذي يتكون من مزيج حمض فوسفو تنغستنيك (phosphotungstic acid $H_3PW_{12}O_{40}$) وحمض فوسفو موليبدينيك (phosphomolybdi acid $H_3PMo_{12}O_{40}$) وهو محلول شديد الاصفرار)المحتوي على شوارد النحاس مع البروتين معطياً اللون الأزرق.

حيث تم اتباع الخطوات التالية:

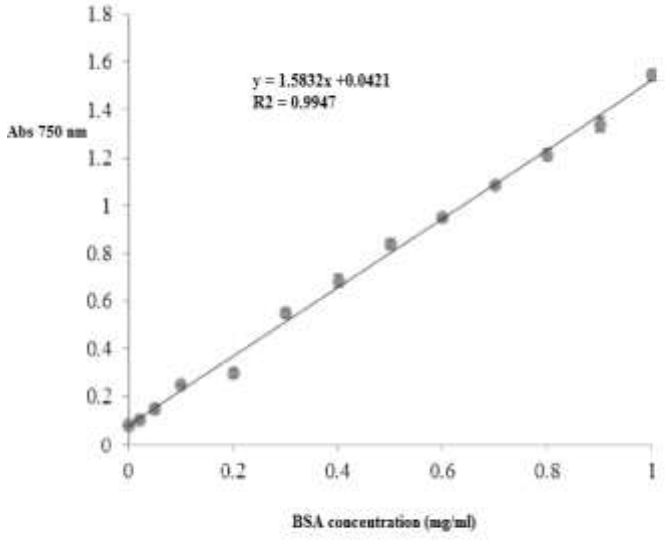
- تمّ تحضير سلسلة عيارية من محلول ألبيومين سيروم البقر(Bovine Serum Albumin) (BSA) بتراكيز0-1مغ/مل.
- تمّ تحضير كاشف كبريتات النحاس القاعدي والذي يتألف من:

المحلول الأول: 50 مل من محلول كربونات الصوديوم(2%) ممزوجة مع 50 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (N 0.1).

المحلول الثاني: 10 مل من محلول كبريتات النحاس(1.5 %) ممزوجة مع 10 مل من محلول طرطرات الصوديوم والبوتاسيوم(2.73%) وحضر الكاشف بمزج 2 مل من المحلول الثاني مع 100 مل من المحلول الأول.

محلول كاشف فولين:حضر بمزج 1 مل من كاشف فولين مع 1 مل من الماء المقطر.

- نقل 0.2 مل من كل تركيز من محلول(BSA) إلى أنبوبة الاختبار ومن ثم تمت إضافة 2 مل من كاشف كبريتات النحاس القاعدي.
- حضنت جميع الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق.
- تمت إضافة 0.2 مل من كاشف فولين إلى أنابيب الاختبار مع التحريك ليتجانس الخليط ويظهر اللون الأزرق ومن ثم تمّ تحضين الأنابيب لمدة نصف ساعة.
- تمّ قياس الامتصاص الضوئي باستخدام جهاز السبيكتروفوتوميتر عند طول موجة(750 نانومتر).
- تمّ رسم منحنى قياسي يربط بين التراكيز المختلفة لمحلول ألبيومين سيروم البقر(Bovine Serum Albumin) (BSA) والامتصاص الضوئي.
- تمّ تقدير البروتين في الرشاحة الإنزيمية بأخذ 0.2مل من هذه الرشاحة بدلاً من محلول(BSA) وفق المعادلة التالية:
- $Y=1.5832\ X+0.0421$ حيث كانت $R^2=0.9947$
- إجراء الخطوات سابقة الذكر وقياس الامتصاص الضوئي للعينة والتعويض في المنحنى القياسي للبروتين للحصول على تركيز البروتين(مغ/مل) (الشكل1).



شكل(1) المنحني القياسي للبروتين (BSA) باستخدام ألبومين المصل البقري

6-قياس فعالية الإنزيم:

تمّ تحضير سلسلة معيارية من سكر الكزيلوز، ثم تمّ قياس فعالية الإنزيم بإضافة 0.5 مل من المستخلص الإنزيمي إلى 1 مل من محلول السترات الموقي (M 0.05) ضبط pH =4.8، وتمّ خلطها مع 0.5 مل (1% وزن من الركيزة/حجم ماء مقطر) حيث تمّ استخدام brichwood كركيزة، ثم وضعت في حمام مائي 50 م° لمدة 30 دقيقة، أضيف بعدها 2 مل من حمض ثنائي نترو سالسيليك (dinitrosalicylic acid)(DNS) المحضر بطريقة Miller (Miller,1959) ثم وضع المزيج في حمام مائي 90 م° لمدة 10 دقائق، ثم تمّ قياس الامتصاص الضوئي عند طول موجي 540 نانومتر. وبذلك نحصل على فعالية الإنزيم مقدرة(وحدة الإنزيمUnit/ ميلليتر) ويرمز لها بالحرف U، وهي كمية الإنزيم التي تتوسط تحويل مول واحد من مادة التفاعل إلى المنتجات النهائية خلال دقيقة واحدة تحت ظروف طريقة العمل.

7-تأثير مصادر الكربون:

تم استخدام مصادر كربون إضافية وهي: الغلوكوز والفركتوز والسكروز والمالتوز واللاكتوز وكربوكسي ميتيل السيللوز CMC، حيث تمت إضافتها إلى وسط التخمر بنسبة(0.4 % v/w) (Jampala *et al*,2017).

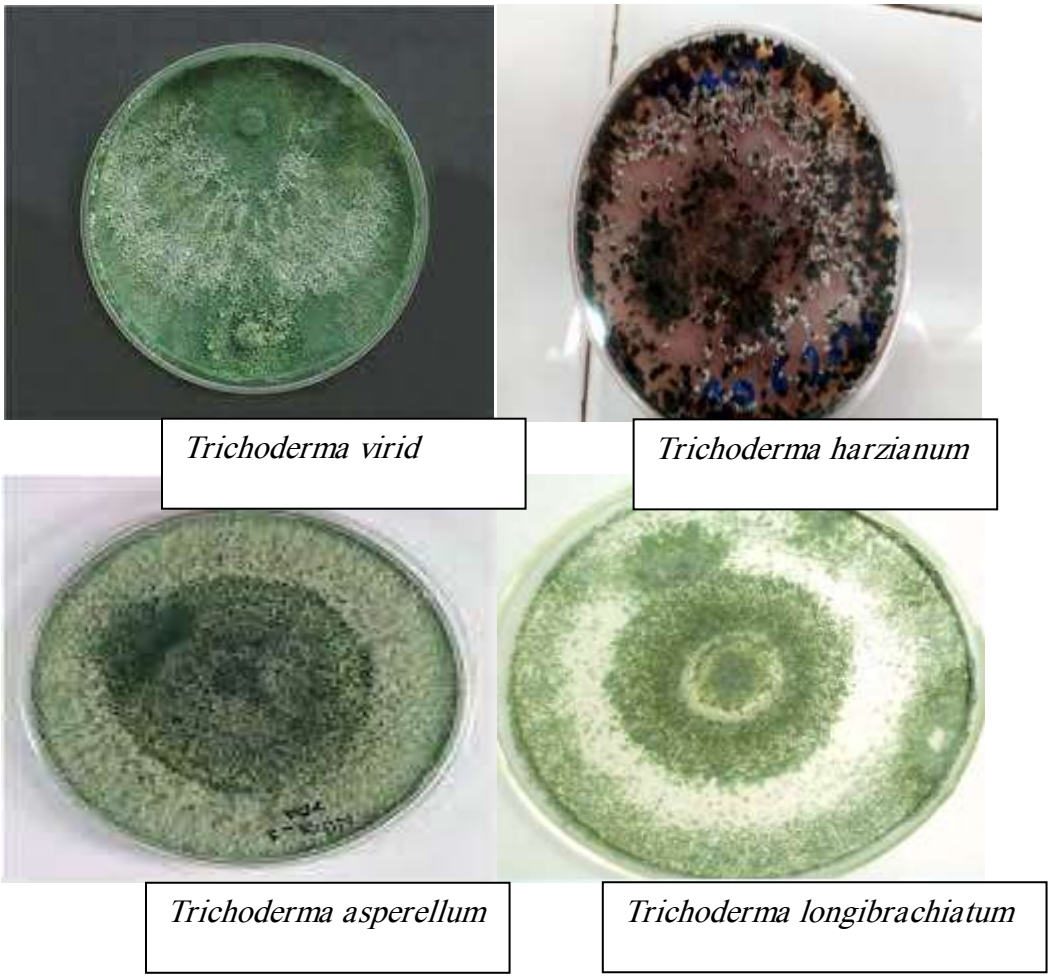
8-تأثير مصادر النتروجين:

تم استخدام مصادر للنتروجين إضافية: ببتون ومستخلص الخميرة وكبريتات الأمونيوم ونترات البوتاسيوم والكازئين وكلوريد الأمونيوم، حيث تمت إضافتها إلى وسط التخمر بنسبة(0.4 % v/w) (Jampala *et al*,2017).

النتائج والمناقشة

عزلت الأنواع الفطرية التالية من المحيط الجذري لنبات الزيتون: (*Trichoderma harzianum, T.viride, T.longibrachiatum*, *T.asperellum*) وتم تحديد هويتها اعتماداً على المراجع التصنيفية (Walter *et al*,2006). حيث تبدو المستعمرة الفطرية بعد تنميتها على بيئة غذائية داخل أطباق بتري حيث ذات مظهر سبخي

بصورة خفيفة أو مندمجة، تعطي الأبواغ الكونيدية ميسليوم أبيض كذلك تظهر المستعمرة في الأيام الأولى شفافة وفي اليوم الرابع من نموها يظهر اللون الأخضر على الأجزاء الهوائية للميسليوم، يتوافق هذا مع تشكل خطوط دائرية أخرى منتظمة مركزية، يظهر الميسليوم تحت المجهر الضوئي مركباً من هيفات صفراء، مقسمة متفرعة ذات جدران ملساء، الحوامل الكونيدية مخروطية أوهرمية الشكل كثيرة التفرعات، تحمل الفياليدات على هيئة فلاسكات والتي تحمل بدورها الأبواغ الكونيدية (شكل2،3) وهذا يتوافق مع المرجع (Samson et al.,2000).



شكل(2) أشكال مستعمرات الأنواع الفطرية التي تم عزلها

شكل (3) فطر عفن من جنس *Trichoderma* تحت المجهر الضوئي

أظهرت نتائج دراسة الفعالية الإنزيمية لإنزيمات الكزيلينياز المنتجة من الأنواع الفطرية المختلفة وجود تباين في قدرة هذه الفطريات على إنتاج إنزيم الكزيلينياز(جدول1)، حيث أعطى نوع فطر *Trichoderma harzianum* أعلى فعالية لإنزيم الكزيلينياز بعد مرور سبعة أيام من التحضين، حيث بلغت الفعالية الإنزيمية 208.4 وحدة إنزيم/ميلليتر، وهذا يدل على أن هذا النوع الفطري هو الأعلى إنتاجية للكزيلينياز، يليه النوع *T.viride* بفعالية قدرها 118.09 وحدة إنزيم/ميلليتر، في حين أعطى النوع *T.asperellum* فعالية إنزيمية 70.23 وحدة إنزيم/ميلليتر، وأخيراً جاء النوع الفطري *T.longibrachiatum* بفعالية قدرها 20.6 وحدة إنزيم/ميلليتر، وهنا لا بد من الإشارة إلى تأثير احتواء قرون الغاف على الهيميسيللوز في تحفيز إنتاج إنزيم الكزيلينياز (Zhang *et al*,2014).

أما بالنسبة لإنتاج الكتلة الحيوية حيث نلاحظ من الجدول رقم (1) أن أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية قد بلغت 7.67 غ/ل لنوع فطر *Trichoderma harzianum* وهي العزلة التي أعطت إنزيم بأعلى فعالية وكذلك أعلى تركيز للبروتين أيضاً 0.9 ملغ/مل، في حين أن أقل إنتاجية للكتلة الحيوية سجلت من قبل النوع الفطري *T.longibrachiatum*. وهنا لا بدّ من الإشارة إلى أن إنتاج الكتلة الحيوية لا يتناسب طرداً مع الفعالية الإنزيمية وهذا يمكن تفسيره من خلال الفعالية النوعية للإنزيم (specific activity).

أما بالنسبة للأس الهيروجيني النهائي فقد انخفض في جميع العزلات ولكن بنسب متفاوتة، ويعود انخفاض الأس الهيدروجيني النهائي إلى طرح بعض الأحماض العضوية في وسط النمو نتيجة نمو الفطريات ونشاطها في إنتاج إنزيم الكزيلينياز (Silva *et al*.,2015).

جدول(1) قدرة العزلات الفطرية على إنتاج إنزيم الكزيلينياز

العزلة الفطرية	الكتلة الحيوية(g/ L)	تركيز البروتين (mg/ ml)	فعالية إنزيم الكزيلينياز (UI/ mL)	الأس الهيدروجيني النهائي
Trichoderma harzianum	(0.029)7.68	(0.008)0.91	(0.081)208.4	(0.047)5.93
T.viride	(0.024)6.87	(0.012)0.86	(0.024)118.06	(0.008)5.11
T.longibrachiatum	(0.029)3.42	(0.004)0.20	(0.081)20.6	(0.008)4.75
T.asperellum	(0.012)5.70	(0.009)0.65	(0.028)70.26	(0.030)6.47

كل قيمة تمثل متوسط لثلاثة مكررات. أما الأرقام بين قوسين فتمثل الانحراف المعياري(S.D)

1-تأثير مصادر كربونية مختلفة على إنتاج الكزيلينياز بوساطة أنواع تابعة لجنس *Trichoderma* بعد مرور سبعة أيام من التحضين:

اختيرت سبعة أنواع مختلفة من السكريات كمصادر كربونية، أضيفت إلى الوسط الغذائي بنسبة (0.4%) لتنمية الأنواع السابقة، حيث نلاحظ من الجدول(2) تبايناً واضحاً في إنتاج إنزيم الكزيلينياز باختلاف المصدر الكربوني المضاف إلى الوسط الغذائي، إن المصدر الكربوني السكروز أعطى أعلى فعالية إنزيمية مع مختلف أنواع الفطريات المدروسة، حيث بلغت 250.01 وحدة إنزيم/ميلليتر بالنسبة للنوع الفطري *Trichoderma harzianum*، في حين جاء بالمرتبة الثانية النوع *T.viride* حيث بلغت الفعالية الإنزيمية 134.8 وحدة إنزيم/ميلليتر، يليها النوع *T.asperellum* بفعالية بلغت 75.03 وحدة إنزيم/ميلليتر، وأخيراً النوع *T.longibrachiatum* بفعالية 22.34 وحدة إنزيم/ميلليتر وهذا يتوافق مع

ما توصل إليه (Jampala *et al*,2017) حيث أعطى السكروز أعلى فعالية لإنزيم الكزيلييناز المنتج من قبل *Trichoderma reesei NCIM 1186* ، وقد أفادت الدراسات المرجعية بأن السكروز يعتبر كأفضل مصدر كربوني تكميلي للعديد من الأحياء الدقيقة(Gautam *et al*,2011). ولكن هنا لا بد من الإشارة إلى أن استخدام مصادر الكربون النقية يعتبر أمر مكلف في عمليات التخمير الصناعية(Jun *et al*,2011)، لذلك تتم إضافتها بنسب منخفضة، في حين أنّ المصدر الكربوني كربوكسي ميتيل السيللوز أعطى أقل فعالية إنزيمية مع كل من الأنواع الفطرية (*T.longibrachiatum*، *T.asperellum*، *Trichoderma harzianum*) حيث أن إضافة هذا المصدر الكربوني إلى الوسط الغذائي يسبب ازدياد اللزوجة مما ينعكس سلباً على تهوية الوسط، وبالتالي صعوبة في استهلاك المغذيات المتاحة في الوسط الغائي من قبل فطر العفن(Zhang *et al*,2014).

جدول(2) تأثير مصادر كربونية مختلفة على إنتاج إنزيم الكزيلييناز

المصدر الكربوني	فعالية إنزيم الكزيلييناز (UI/ mL)			
	Trichoderma harzianum	*T.viride*	*T.longibrachiatum*	*T.asperellum*
الشاهد	(0.081)208.4	(0.024)118.06	(0.081)20.6	(0.028)70.26
الغلوكوز	(0.008)180.03	(0.081)103.5	(0.040)17.9	(0.040)67.9
الفركتوز	(0.081)176.2	(0.081)97.6	(0.062)16.45	(0.020)61.08
السكروز	(0.008)250.02	(0.081)134.8	(0.044)22.34	(0.016)75.03
المالتوز	(0.081)200.8	(0.041)66.04	(0.081)12.3	(0.081)57.03
اللاكتوز	(0.081)185.4	(0.062)56.65	(0.057)11.34	(0.081)69.6
كربوكسي ميتيل السيللوز	(0.077)104.22	(0.081)67.2	(0.075)2.98	(0.062)33.45
الكزيلوز	(0.081)201.8	(0.026)61.04	(0.040)11.3	(0.030)55.03

كل قيمة تمثل متوسط لثلاثة مكررات. أما الأرقام بين قوسين فتمثل الانحراف المعياري(S.D)

إن المصدر الكربوني السكروز أعطى أعلى فعالية إنزيمية لإنزيم الكزيلييناز المنتج من مختلف أنواع الفطريات المدروسة، حيث بلغت 250.01 وحدة إنزيم/ميليليتر بالنسبة للنوع الفطري *Trichoderma harzianum*، في حين جاء بالمرتبة الثانية النوع *T.viride* حيث بلغت الفعالية الإنزيمية 134.8 وحدة إنزيم/ميليليتر، يليها النوع *T.asperellum* بفعالية بلغت 75.03 وحدة إنزيم/ميليليتر، وأخيراً النوع *T.longibrachiatum* بفعالية 22.34 وحدة إنزيم/ميليليتر وهذا يتوافق مع ما توصل إليه (Jampala *et al*,2017) حيث أعطى السكروز أعلى فعالية لإنزيم الكزيلييناز المنتج من قبل *Trichoderma reesei NCIM 1186* ، وقد أفادت الدراسات المرجعية بأن السكروز يعتبر كأفضل مصدر كربوني تكميلي للعديد من الأحياء الدقيقة(Gautam *et al*,2011). ولكن هنا لا بد من الإشارة إلى أن استخدام مصادر الكربون النقية يعتبر أمر مكلف في عمليات التخمير الصناعية(Jun et al,2011)، لذلك تتم إضافتها بنسب منخفضة.

2-تأثير مصادر نتروجينية مختلفة على إنتاج الكزيليناز بوساطة أنواع تابعة لجنس *Trichoderma* بعد مرور سبعة أيام من التحضين:

اختيرت ستة أنواع مختلفة من المصادر النتروجينية، وأضيفت إلى الوسط الغذائي بنسبة (0.4%) لتنمية الأنواع السابقة، حيث يلاحظ من الجدول(2) تبايناً واضحاً في إنتاج إنزيم الكزيليناز باختلاف المصدر النتروجيني المضاف إلى الوسط الغذائي.

جدول(3) تأثير مصادر النتروجين المختلفة على إنتاج إنزيم الكزيليناز

المصدر النتروجيني	فعالية إنزيم الكزيليناز (UI/ mL)			
	Trichoderma harzianum	*T.viride*	*T.longibrachiatum*	*T.asperellum*
الشاهد	(0.081)208.4	(0.024)118.06	(0.081)20.6	(0.028)70.26
ببتون	(0.024)150.45	(0.008)80.04	(0.016)13.04	(0.224)50.41
مستخلص الخميرة	(0.084)215.51	(0.081)122.2	(0.081)25.3	(0.040)73.34
كبريتات الأمونيوم	(0.054)104.65	(0.020)60.97	(0.081)11.4	(0.024)37.88
نترات البوتاسيوم	(0.040)155.85	(0.054)84.52	(0.081)15.5	(0.024)53.04
الكازئين	(0.064)211.43	(0.024)120.05	(0.040)22.45	(0.020)73.48
كلوريد الأمونيوم	(0.064)110.5	(0.029)65.66	(0.032)13.47	(0.020)39.04

كل قيمة تمثل متوسط لثلاثة مكررات. أما الأرقام بين قوسين فتمثل الانحراف المعياري(S.D)

إن مستخلص الخمير كمصدر للنتروجين هو الأفضل من حيث تأثيره في الفعالية الإنزيمية للإنزيم المنتج لكل من الأنواع الفطرية *Trichoderma harzianum* و *T.asperellum* و *T.longibrachiatum* ، أما بالنسبة للنوع الفطري *T.viride* فقد كان الكازئين هو أفضل مصدر للنتروجين. وعموماً يعتبر النتروجين من أهم العناصر الغذائية التي تؤثر في عملية إنتاج الإنزيمات من قبل الفطريات الخيطية (Sun *et al*,2004)، كما أن تأثير مصدر النتروجين لا يعتمد فقط على فيزيولوجيا الفطريات وإنما يتعلق أيضاً بالوسط المستخدم في الزرع (Kachlishvili *et al*,2006)، وعموماً فإن إضافة مصادر نتروجينية عضوية إلى وسط التخمر المحتوي على الهيميسيللوز يحفز إنتاج الإنزيمات الخلوية من قبل الفطريات (Kapich *et al*,2004).

الاستنتاجات والتوصيات

1- تمّ عزل وتحديد هوية أربعة أنواع من الفطريات وتعريفها وهي: (*Trichoderma harzianum, T.viride, T.longibrachiatum, T.asperellum*).

2- تمّ الكشف عن قابلية هذه الأنواع لإنتاج إنزيم الكزيليناز.

3- حددت الفعالية الإنزيمية للأنواع الفطرية حيث أعطى فطر *Trichoderma harzianum* أعلى فعالية لإنزيم الكزيليناز الناتج منه، بعد مرور سبعة أيام من التحضين والتي بلغت 208.4 وحدة إنزيم/ميليليتر.

4- من المصادر الكربونية الأخرى المستخدمة أعطى المصدر الكربوني السكروز أعلى فعالية لإنزيم الكزيليناز.

5- إنتاج إنزيم الكزيليناز باستخدام قرون نبات الغاف كركيزة لإنتاج إنزيم الكزيليناز.

وأخيراً واعتماداً على نتائج البحث يوصى باستخدام قرون نبات الغاف كركيزة لإنتاج إنزيم الكزيلييناز، وبخاصة أن هذه القرون غير مستساغة وغير قابلة للهضم وبالتالي فهي غير مناسبة لتغذية الحيوانات، علاوة عن التخلص من مشاكل التلوث البيئي المرتبطة بالطرق التقليدية، كما يوصى أن تكون الدراسات المقبلة متممة لهذا البحث، ومتعلقة بدراسة الشروط المثلى لعمل إنزيم الكزيلييناز المنتج من قبل فطريات العفن، وكذلك دراسة العوامل الأخرى التي تؤثر على الفعالية الإنزيمية كدرجة الحرارة، ومدة فترة التخمر، إضافة إلى دراسة قدرة الأنواع المدروسة على إنتاج إنزيمات أخرى كالسيللولاز والأميلاز.

Reference

1. ABDEL-STAR, M. A. & El-SAID, A. H. M. *Xylan-decomposing fungi and xylanolytic activity in agricultural and industrial wastes*. Inter. Biodeter. Biod. 47(2001)15-21.
2. BEG,Q.K.;KAPOOR.M.;MAHAJAN,L.;Hoondal,G.S. *Microbial xylanase and their industrial applications*. Microbiol Biotechnol.56(2001)326-338.
3. DHIMAN,S.S.;SHARMA,J.;BATTAN,B. *Industrial applications and future prospects of microbial xylanases.*BioResources. 3(4)(2008)1377-1402.
4. JAMPALA,P.;MURUGAN,P.;RAMANUJAM,S.;UPPULURI,K.B.Inves-tigation on the effect of carbon and nitrogen source for the production of cellulosome by Trichoderma reesei NCIM 1186 using saturated placket burman desing.Biotechnol Res.12(2015)1577-1586.
5. JAMPALA,P.;TADIKAMALLA,S.;PREETHI,M.;RAMANUJAM,S.;UPPULURI,K. B.*Concurrent production of cellulose and exylanase from Trichoderma reesei NCIM 1186:enhancement of production by desirability-based multi-objective method*.Biotech.7(2017)1-14.
6. JUN,H.;KIESELBACH,T.;JONSSON,L.J. *Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of Trichoderma reesei grown on unconventional carbon source*. Microbial cell factor.10(1)(2011)1-11.
7. JUTURU,V&WU,J.C. *Microbial Xylanases Engineering ,Production and industrial applications*. Biotechnology Advances.1(2011)1-9.
8. KACHLISHVILI,E.;PENNINCKX,M.J.;TSIKLAURI,N.;ELISASHVILI,V. *Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white rot basidiomycetes under solid state cultivation*.World J microbiol biotechnol. 22(4)(2006)391-397.
9. KAPICH,A.PRIOR,B.;BOTHA,A.;GALKIN,S.;LUNDELL,T.;HATAKKA,A.*Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of Phanerochaete chrysosporium ME-446*. Enzyme microb technol.34(2)(2004)187-195.
10. LOWRY, O.H.;ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J biolchem.193(1951)265-275.
11. MILLAR,G.L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry.31(1959):426-428.
12. RAMASAMY.S.;BALAKRISHNA.H.S.;SELVARAJ.U.;UPPULURI.K.B. *Production and statistical optimization of oxytetracycline from Streptomyces rimosus NCIM 2213 using a new cellulosic substrate Prosopis juliflora*. Bioresources.9(4)(2014)7209-7221.

13. REZENDE.M.I.;BARBOSA.A.M.;VASCONCELOS.A.F.D.;ENDO.A.S. *Xylanase production by Trichoderma harzianum RIFAI by solid state fermentation on sugarcane bagasse*. Brazilian journal of microbiology.33(2002)67-72.

14. SAMSON,R.E.;HOEKSTRA.J.;FRISVAD.F.;FIILTENGBORG. Introdaction to food airborne fungi(5th ed).Bearn Netherlands centraaebureauvoors chimmel cultures.2000.

15. SILVA,L.A.O.;TERRASANMC.R.F.;CARMONA,E.C. Purification and characterization of xylanases from Trichoderma inhamatum. Electronic journal of biotechnology.18(2015):307-313.

16. SILVA,L.A.O; CESAR,R.F.T; ELEONORA,C.C. *Purification and characterization of Xylanase from Trichoderma inhamatum*. Electronic Journal of Biotechnology.18(2015)307-313.

17. SUN.X.;ZHANG.R.;ZHANG.Y. *Production of lignocellulolytic enzyme by Trametes gallica and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels*. J.Basic Microbiol . 44(3)(2004)220-231.

18. VENKATESH.M&GIRIJA.D.*Micrbial pectinase from tropical fruit Wastes*. Journul of Tropical Agriculture. 47(1)(2009)67-69.

19. WALTER,M.;JAKLITSC,G.J.;SARAH,L.;BING,S.L. *Hypocrearufa/Trichoderma viride: a reassessment and description of five closely related species with and without warted conidia*. Stud Mycol USA.56(1)(2006):135-177.

20. WALTER,M.;JAKLITSC,G.J.;SARAH,L.M.;Bing,S.L.2006.*Hypocrearuf a/ Trichoderma viride: a reassessment and description of five closely related specieswith and without warted condidia*. Stud Mycol USA .56(1)(2006)135-177.

21. WONG,K.K.Y.; JAMES,C.S.;CAMPION,S.H. *Xylanase pre and post treatments of bleached pupls decrease absorption coefficient* .J.Pulp Pap. Sci. 26(2000)377-383.

22. ZHANG,L.;WANG,X.;RUAN,Z.;LIU,Y.;NIU,X.;YUE,Z.;LI,Z.;LIAO,W.; LIU,Y. Fungal cellulase/xylanase production and corresponding hydrolysis using pretreated corn stover as substrates. Appl Biochem Biotechnol .172(2)(2014):1045–1054.