

Determining Optimum Conditions for production of xylanase From *Trichoderma harzianum* Using Response Surface Methodology

Dr. Ramez Mohammad*
Dr. Sheiam Sulaeman**
Dr. Nesrin Naksho***
Samaher sakkour****

(Received 24 / 3 / 2022. Accepted 14 / 8 /2022)

□ ABSTRACT □

The xylanase enzyme is one of the enzymes that is characterized by various industrial applications, the most important of which are biofuels, feed, food industries, and paper. In this study, the optimal conditions for the production of xylanase by (*Trichoderma harzianum*) isolated from the rhizosphere of olive plant (*Olea europaea*.L) using response surface methodology, using an agricultural weed, (*Prosopis juliflora*), A Central Composite Design was used to investigate the effects of four independent variables: temperature (°C), pH, concentration pods (w/v %), incubation time (hour), on the response factor, xylanase activity (UI/mL), The independent variables were at three levels and their actual values selected on the basis of preliminary experimental results. A second-order polynomial model was used for predicting the response.

Regression analysis showed that the variation was explained by the model. The optimal conditions for xylanase activity were found to be incubation temperature of 31.09 °C, pH=7.2, incubation time 128.4(hour), concentration pods 5.7(w/v %), Under the optimum conditions the corresponding predicted response value for xylanase activity was 228.3 UI/mL.

The good agreement between predicted and experimental values indicated suitability of the model employed and the success of response surface methodology in optimizing the xylanase activity.

Keywords: xylanase, *Trichoderma harzianum*, temperature, pH, concentration pods, incubation time.

* Professor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, SYRIA. gobranramz@gmail.com

**Assistant Professor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, SYRIA, sheiamsulaeman@hotmail.com

*** Researcher in NCBT in Damascus. nisrin.marwan1968@gmail.com

****Ph.D student, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, SYRIA. samahersakkour@outlook.sa

تحديد الشروط المثلى لإنتاج إنزيم الكزلييناز من *Trichoderma harzianum* باستخدام منهجية سطوح الاستجابة

د.رامز محمد*

د.شيم سليمان**

د.نسرین نقشو***

سماهر صقور****

(تاريخ الإيداع 2022 / 3 / 24 . قبل للنشر في 2022 / 8 / 14)

□ ملخص □

يعتبر إنزيم الكزلييناز من الإنزيمات التي تتميز بتطبيقات صناعية مختلفة وأهمها الوقود الحيوي، الأعلاف، الصناعات الغذائية، الورق، حيث تم في هذه الدراسة تحديد الشروط المثلى لإنتاج إنزيم الكزلييناز من فطر (*Trichoderma harzianum*) المعزول من المحيط الجذري لنبات الزيتون *Olea europaea* وذلك باستخدام منهجية سطوح الاستجابة، حيث استخدمت قرون نبات الغاف كركيزة لإنتاج إنزيم الكزلييناز (*Prosopis juliflora*)، حيث تم استخدام تصميم المركب المركزي للتحقق من تأثير أربعة متغيرات مستقلة هي درجة حرارة (°C)، رقم الـ pH، تركيز قرون نبات الغاف (%، زمن التحضين (ساعة)، على عامل الاستجابة المتمثل بفعالية إنزيم الكزلييناز (وحدة إنزيم/ملييلتر)، اختبرت القيم الفعلية بناءً على نتائج التجارب الأولية واختبرت المتغيرات المستقلة على ثلاث مستويات. تم توقع نتائج الاستجابة من خلال استخدام النموذج متعدد حدود من الدرجة الثانية. أظهر تحليل الانحدار أن الانحرافات فسرت من خلال النموذج، حيث أظهرت نتائج الدراسة شروط الإنتاج المثالية لإنزيم الكزلييناز، من حيث درجة الحرارة التي بلغت (31.09 درجة مئوية)، ورقم الـ pH يساوي (7.2)، وزمن التحضين الذي بلغ (128.4 ساعة)، وتركيز قرون نبات الغاف (5.7%). وقد تم إنتاج إنزيم الكزلييناز تحت الشروط المثالية المتوقعة للتحقق من صلاحية النموذج وكانت النتائج 228.3 وحدة إنزيم/ملييلتر. لقد دلت تطابق النتائج التجريبية مع القيم النظرية المتوقعة من خلال النموذج المستخدم على ملاءمة النموذج ونجاح منهجية سطوح الاستجابة في تحديد الشروط المثلى لإنتاج الإنزيم.

الكلمات المفتاحية: *Trichoderma harzianum*، إنزيم الكزلييناز، درجة الحرارة، pH، تركيز قرون نبات الغاف، مدة التخمر.

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

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

*** باحثة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق. nisrin.marwan1968@gmail.com

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

مقدمة:

أثارت الكميات الكبيرة المتشكلة من النفايات الزراعية في جميع أنحاء العالم الاهتمام، لإيجاد طريقة تمكن من الاستخدام المستمر لبقايا المحاصيل الزراعية والمنتجات الثانوية الصناعية والزراعية وتكون رخيصة الثمن كمصادر للكربون، كما هو الحال بالنسبة لنخالة القمح، قشر الرز، عرانييس الذرة وغيرها (Shah & Madamwar, 2005) ونتيجة لهذا فقد تم إجراء الكثير من الأبحاث بهدف الحد من التلوث البيئي، حيث تركزت هذه الدراسات على استخدام الكائنات الحية الدقيقة في التخمرات مثل (Solid –state fermentation)SSF وغيرها من التخمرات للحصول على مواد ذات قيمة اقتصادية مرتفعة كالإنزيمات (Zhang *et al.*, 2017)، حيث تعتبر مخلفات الزراعة من أهم المواد التي تستخدم كركيزة للعديد من التخمرات (Yadav *et al.*, 2009) على سبيل المثال تم استخدام (قشور البطيخ، نفل التفاح، قشور البندق) كمصدر للكربون، وكل من (أوراق القطن، بقايا فول الصويا) كمصدر للنتروجين بدلاً من مصادر النتروجين النقية مرتفعة الثمن (كالبيتون) لإنتاج إنزيم الكزيليناز بواسطة (*Trichoderma harzianum*) (Seyis & Aksoz, 2005).

تتكون جدران الخلايا النباتية من السيللوز (35-50%) والهيميسيللوز وبشكل أساسي الكزيلان (20-30%) واللبيغين (20-30%) (Sa-Pereira *et al.*, 2003) يعتبر الكزيلان من السكريات المتعددة الرئيسية والهيكلية التي تتواجد في النباتات، حيث تمثل حوالي 30% من الوزن الجاف لجدران الخلايا في النباتات أحادية الفلقة، إضافة إلى كونها تشكل مكون أساسي في النباتات ثنائية الفلقة (Seyis & Akzos, 2005)، ويسمى الكزيلان في القمح أرابينوكزيلان، حيث يختلف التركيب الكيميائي للكزيلان وفق المصدر النباتي، على سبيل المثال يتكون الأرابينوكزيلان في القمح من 65.8% كزيلوز (xylose)، 33.5% أرابينوز (arabinose)، 0.1% مانوز (mannose)، 0.1% غالاكتوز (galactose) 0.9% غلوكوز (glucose) (Mandal, 2015).

يقوم إنزيم الكزيليناز Xylanase بتفكيك الرابطة 4-1 β ضمن السلسلة الرئيسية للكزيلان (Silva *et al.*, 2015) حيث يعتبر إنزيم الكزيليناز هاماً في عملية التحويل الحيوي للكزيلان إلى السكريات البسيطة، ولهذا الإنزيم تطبيقات صناعية مختلفة، أهمها استخدامه في صناعة الورق والأعلاف إضافة إلى الصناعات الغذائية (Li *et al.*, 2000) تعتبر فطريات العفن في التخمرات الصناعية أكثر الأحياء الدقيقة المستخدمة، وهذا يرجع إلى كونها مرتفعة من حيث متطلباتها للأوكسجين، ومنخفضة من حيث النشاط المائي بالمقارنة مع البكتيريا، وهذه النظم الحيوية تحاكي العوائل الطبيعية التي تعزز نموها (Pirota *et al.*, 2014) إلا أنه لا بد من الإشارة إلى بعض السلبيات في إنزيم الكزيليناز المنتج من قبل فطرات العفن وأهمها بأن هذا الإنزيم متحمل لدرجات حرارة أقل من 50 م°، ورقم ال pH يتراوح 4-6 في حين العديد من التطبيقات الصناعية وخاصة صناعة الورق فهي تتطلب رقم ال pH قلوي ودرجات حرارة أعلى من 60 م° (Subramanian & Prema, 2002)، ويعتبر اختيار الكائنات الحية الدقيقة المناسبة أمراً مهماً للغاية عند إنتاج الإنزيمات الميكروبية، وكثيراً ما تستخدم الكائنات الحية الدقيقة المعزولة من التربة في إنتاج الإنزيمات المختلفة، ويعتبر الكزيلان من أهم المركبات الرئيسية للمواد العضوية الموجودة في التربة (Subramanian & Prema, 2002)، حيث يمكن الحصول على إنزيم الكزيليناز من الميكروبات المعزولة من التربة، ومن المهم تحسين البيئة الفيزيائية والكيميائية للكائن الحي الدقيق من أجل إنتاج الإنزيم على نطاق واسع، ويتوجه الاهتمام اليوم إلى استخدام الإنزيمات المنتجة خارج الخلية وهذا أفضل من حيث التكلفة المنخفضة نسبياً وإمكانية الحصول على الإنزيم بنقاوة أعلى (Mandal, 2015).

ويعتبر جنس *Trichoderma* من أهم الأجناس الفطرية التي تتميز بإنتاج مرتفع للمنتجات ذات القيمة وعلى وجه الخصوص إنزيمات الحلمهة (hydrolase enzyme) مثل إنزيم الكزيليناز (Walia et al., 2017)، وهو الإنزيم المسؤول عن تحلل الكزيلان (Zhu et al., 2015)، فهناك العديد من الدراسات التي أشارت إلى إنتاج إنزيم الكزيليناز من قبل أنواع مختلفة تابعة للجنس *Trichoderma sp.* (Juturu & Wu, 2012) حيث تجري الدراسات لتحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيم الكزيليناز وذلك بصرف النظر عن الكائن الحي الدقيق، ومن أهم هذه العوامل درجة الحرارة، pH، نسبة الرطوبة، تركيز المعلق البوغي، فترة التخمير، المكونات الغذائية لوسط التخمر (Uday et al., 2016).

تعتبر التحليلات الإحصائية من الأدوات المهمة في حل كثير من المشاكل، وبالتالي اتخاذ القرارات المناسبة والتنبؤ بأفضل الشروط. ويعتبر استخدام الإحصاء في التصاميم التجريبية في مجال التكنولوجيا الحيوية أمراً أساسياً لتحسينها (Walia et al., 2015) وعادة ما يتم معالجة عامل واحد في كل مرة لإيجاد أفضل الشروط حيث يتم تجاهل تفاعل عدة عوامل مختلفة، لذلك فإن فرصة إيجاد الظروف المثلى منخفضة حيث تفترض عدم وجود تأثير متبادل بين العوامل عند دراسة عامل واحد في كل مرة.

تنتج الاستجابة الفعلية للعملية من تأثير تفاعل عدة متغيرات، وعلى خلاف الطرق التقليدية فإن الإجراءات الإحصائية تسمح بأخذ تفاعل عدة عوامل بالحسبان وتعتبر منهجية سطوح الاستجابة من الطرق الإحصائية المهمة والتي تلاقي تطبيقاتها نجاحاً كبيراً في الهندسة الكيميائية والزراعة والطب والبيولوجيا (Montgomery, 2001).

إن منهجية سطوح الاستجابة تبحث في كيفية الوصول إلى الاستجابة المثلى للمتغير (فعالية إنزيم الكزيليناز Y) ومستويات العوامل للمتغيرات المستقلة A, B, C, D التي تحقق هذه الاستجابة (Myers and Montgomery, 2002)، وتسعى لإيجاد المفهوم الأفضل للنظام ككل.

أهمية البحث وأهدافه:

تتبع أهمية هذا البحث من كونه يسلط الضوء على قدرة فطر عفن (*Trichoderma harzianum*) في إنتاج إنزيم الكزيليناز، أما الهدف فهو تحديد الشروط المثلى من حيث: درجة الحرارة، رقم الـ pH، تركيز قرون نبات الغاف، زمن التحضين لإنتاج إنزيم الكزيليناز من قبل (*Trichoderma harzianum*) وذلك بتحديد هذه الشروط متأزرة مع بعضها البعض.

طرائق البحث ومواده:

-الحصول على العزلات الفطرية:

استخدمت عزلة فطرية محلية مختلفة وهي: (*Trichoderma harzianum*). تم الحصول عليها من المحيط الجذري لشجرة الزيتون *Olea europaea* علماً أن الأشجار من الصنف الخضير ذات عمر تقريبي ثلاثون سنة، على عمق (5-10 سم)، وهذه الأشجار مزروعة في محيط سد السادس عشر من تشرين، وذلك بالسير في الحقل قطرياً وأخذ العينات من ثلاث مواقع وذلك بكل اتجاه، حيث تم خلط العينات معاً لتمام تجانسها ثم أخذت عينة ممثلة تراوح وزنها (200-400 غ).

ثم أخذ (0.5 g) من عينة التربة و تم تجفيفها (باتباع طريقة التجفيف الطبيعي في الظل) وطحنها ثم نثرها على سطح طبق بتري بلاستيكي قطر (9 سم) يحتوي على (25 مل) من بيئة PDA (Potato –Dextrose Agar) والمضاف له مضاد حيوي أمبيسيلين وذلك لتفادي نمو البكتيريا، تم تحضين الأطباق عند درجة حرارة (25±2 م) لمدة أسبوع. ثم أخذ قرص بقطر (5 مم) من حافة مستعمرة فطر ال *Trichoderma*.

زرع القرص فوق سطح المستنبت بواقع ثلاثة مكررات لكل عذلة، وطبق واحد لكل مكرر، بحيث يكون القرص في منتصف الطبق في المكرر الثاني، وعلى جانب الطبق في المكرر الأول والثالث. حضنت الأطباق عند درجة حرارة (25±2 م).

سجلت بعض الخصائص المزرعية بعد مرور سبعة أيام من التحضين، شملت الخصائص الشكلية للمستعمرات النامية على الأطباق (لون السطحين العلوي والسفلي للمستعمرة، لون الأبواغ، إنتاج الصبغة، سرعة التبوغ، شكل التبوغ). تم تصنيف العزلة بالاعتماد على (Walter et al., 2006) وأخذت بعين الاعتبار الخصائص التالية:

- لون وشكل المستعمرات الفطرية والصبغات المنتجة من قبل المستعمرات.
- شكل وحجم وأبعاد الزوائد القارورية *phialides*.
- نظام تفرع الزوائد القارورية.
- شكل وحجم وأبعاد الأبواغ الكونيدية.
- نمط جدار الأبواغ الكونيدية.

حفظت عينة نقية من النوع المدروس ضمن أنابيب اختبار على نحو مائل في البراد عند درجة حرارة 4 م، وتم تنشيط العزلة كل أسبوعين للمحافظة على حيوية الفطريات وفعاليتها.

-تحضير المعلق البوغي:

تم تحضير المعلق البوغي من مستعمرات متبوغة على أطباق بتري، حيث غمرت المستعمرات بـ 20 مل ماء مقطر مع (0.1%) من Tween-80 وترك الطبق مغطى لمدة لا تقل عن ساعة حتى تتحرر الأبواغ ثم تم ضبط تركيز المعلق بواسطة شريحة العد (Venkatesh & Girija, 2009).

-تحضير المادة الأولية:

تم 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).

-إنتاج الإنزيم:

أضيف المعلق البوغي ذو التركيز (10⁵ 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 رقم ال pH عند 6.5 ودرجة الحرارة (30 م[°] مئوية) ثم وضع الدورق المخروطي في حاضنة هزازة بسرعة دوران (150 دورة/دقيقة) ولمدة (120 ساعة). وبعد انقضاء فترة التخمر تم قياس الأس الهيدروجيني النهائي لكل دورق، ثم أجريت عملية الترشيح لمحتوى كل دورق باستخدام أوراق ترشيع من نوع (Whatman No.1) مجففة وموزونة مسبقاً ومثبتة على قمع بوخنر Bauchner funnel، وبعد انتهاء عملية الترشيح. أخذ الراشح وتم إجراء عملية طرد مركزي بسرعة (10000 دورة/دورة) (rpm) لمدة (10 دقائق) (Jampala et al., 2017).

-قياس فعالية الإنزيم:

تمّ تحضير سلسلة معيارية من سكر الكزِيلوز، ثم تمّ قياس فعالية الإنزيم بإضافة (0.5 مل) من المستخلص الإنزيمي إلى (1 مل) من محلول السترات الموقفي (0.05 M) ثم ضبط رقم ال pH عند 4.8، وتمّ خلطها مع (0.5 مل) (1% وزن من الركيزة/حجم ماء مقطر) حيث تمّ استخدام birchwood كركيزة، ثم وضعت في حمام مائي (50 م°) لمدة (30 دقيقة)، أضيف بعدها (2 مل) من حمض ثنائي نيترو سالسيليك (DNS)(dinitrosalicylic acid) المحضر بطريقة 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 الإنزيم/Unit/ملييلتر) 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.

- تحديد الشروط الملائمة للاستخلاص :

تمّ في البداية تحديد وسط إنتاج إنزيم الكزيليناز باستخدام أربعة عوامل هي درجة الحرارة (A)، ورقم ال pH (B)، وتركيز قرون نبات الغاف (C)، وزمن التحضين (D)، وعدة مستويات لهذه العوامل حيث تمّ تحديد هذه المستويات من خلال تجارب أجريت درجة الحرارة الأفضل للاستخلاص فقد استخدمت درجات الحرارة التالية (20، 25، 30، 35، 40، 45 م°)، ولاختيار رقم ال pH الأفضل تم استخدام (5، 5.5، 6، 6.5، 7، 7.5، 8، 8.5)، ولتحديد التركيز المناسب من قرون نبات الغاف تمّ تطبيق تراكيز مختلفة منها (2، 1، 4، 5، 6، 3%)، وتمّ تحديد زمن التخمر الأفضل من بين ثمانية أزمنة مختلفة هي (24، 48، 72، 96، 120، 144، 168، 192 ساعة) (Jampala et al., 2017).

- تصميم التجربة Experimental design :

بعد إجراء التجارب الأولية استخدمت أفضل القيم الناتجة من أجل تحديد أفضل شروط الاستخلاص باستخدام التصميم المركب المركزي Central Composite Design الذي يتضمن إجراء 30 تجربة تتوزع فيها العوامل بشكل عشوائي بمعدل ثلاثة مكررات للنقاط التجريبية. إنّ المتغيرات الأربعة المدروسة هي: العامل الأول درجة الحرارة (A) (درجة مئوية)، العامل الثاني رقم ال pH (B)، العامل الثالث تركيز قرون نبات الغاف (C) (% نسبة مئوية)، العامل الرابع زمن التخمر (D) (دقيقة)، بينما عامل الاستجابة هو فعالية إنزيم الكزيليناز حيث تمّ التعبير عن القيم بوحدة الإنزيم (UI/mL) (Kanaga et al., 2016).

- تحليل البيانات Data analysis :

تم استخدام تحليل الانحدار لسطوح الاستجابة برمجيات (Stat Ease, USA) design expert ver. 9. بيانات التجربة حيث وافقت بيانات التجربة نموذج متعدد حدود من الدرجة الثانية و المعادلة العامة هي كالتالي:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j=1}^3 \beta_{ij} X_i X_j,$$

حيث أن Y هي متحول التابع الاستجابة بينما β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} عبارة عن ثوابت يراد تقديرها (معامل الانحدار)، $X_i X_j$ هي متحولات مستقلة (درجة الحرارة، رقم ال pH، تركيز قرون نبات الغاف، زمن التخمر). إنّ مدى ملائمة معادلة النموذج من الدرجة الثانية تظهر من خلال تحديد معامل التحديد R^2 واختبار نقص المطابقة من خلال الفحص باختبار F. 8-1 معامل التحديد (R^2): وهو يمثل مربع معامل الارتباط ويشير إلى مدى التطابق بين النتائج الفعلية والقيم المحسوبة من خلال النموذج.

8-2- اختبار نقص المطابقة (F)Lack of fit: ويتمّ حسابه على الشكل التالي:

1- مجموع مربعات أخطاء النموذج $SS(p.e)$

2- مجموع مربعات نقص المطابقة $SS(L.O.F)=SSe-SS(p.e)$ حيث أن SSe مجموع المربعات (sum of squares)

أما احتساب اختبار نقص المطابقة (F) يكون وفق الصيغة التالية:

$F= MS(L.O.F)/MS(p.e)$ حيث أن MS تباين المعالجات على تباين الخطأ

-اختبار موثوقية النموذج:

تعتمد الظروف المثالية لإنتاج إنزيم الكزيليناز على درجة الحرارة، رقم ال pH، تركيز قرون نبات الغاف، زمن التحضين المستحصل عليها باستخدام معادلات التنبؤ من منهجية سطوح الاستجابة. تمّ تحديد فعالية إنزيم الكزيليناز تحت الشروط المثلى للإنتاج ثم مقارنة القيم الفعلية والنظرية لتحديد صلاحية النموذج.

النتائج والمناقشة:

عزل النوع الفطري من المحيط الجذري لنبات الزيتون: (*Trichoderma harzianum*) وتمّ تحديد هويته اعتماداً على المراجع التصنيفية (Walter et al.,2006)، حيث تمت دراسة الخصائص المزرعية والمجهريّة للمستعمرات المدروسة: لون السطح العلوي والسفلي للمستعمرة، شكل التبوغ، لون الأبواغ، سرعة التبوغ، إنتاج الصبغة في الوسط، أما مجهرياً فقد أخذ بعين الاعتبار شكل الأبواغ الكونيدية، نظام تجمع الفاليدات، لون الأبواغ وشكلها وحجمها وطبيعة جدرانها. وأهم الصفات المزرعية والمجهريّة للنوع المدروس تمثلت بما يلي: الحوامل الكونيدية طويلة ونحيفة، الزوائد متطاولة وغير متراكمة، المستعمرات ذات لون أخضر، الحوامل الكونيدية ذات تفرع غصني، الأبواغ كروية قصيرة ناعمة ملساء، لون السطح السفلي للمستعمرة أبيض مخضر أما السطح العلوي ذي لون أخضر، شكل التبوغ حلقة كثيفة حول القرص ثم منتشر، لون الأبواغ أخضر، وبدأ التبوغ في اليوم السادس من التحضين، لم يتم إنتاج أي صبغة من قبل فطر العفن الشكل(1).

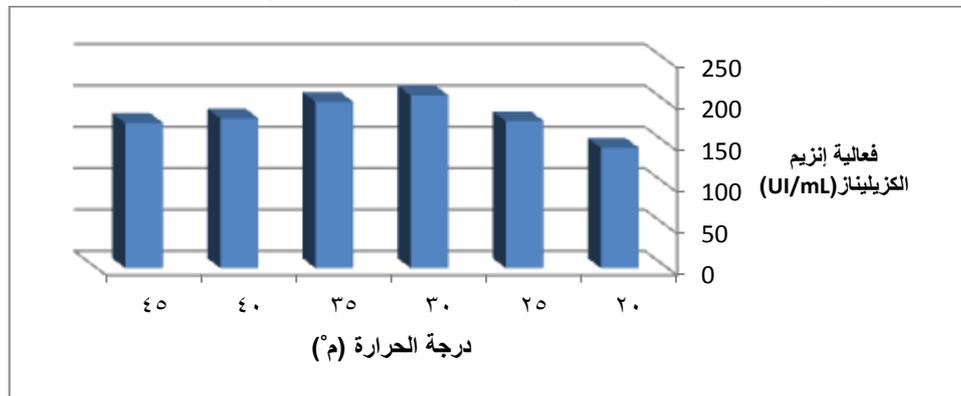


الشكل(1) فطر عفن *Trichoderma harzianum*

تأثير درجة الحرارة على إنتاج إنزيم الكزيليناز:

تعتبر درجة الحرارة من أهم العوامل التي تؤثر على إنتاج الإنزيمات فهي تؤثر على نمو فطريات العفن (Azzouz et al.,2020)، وقد تمت دراسة تأثير درجة الحرارة على إنتاج إنزيم الكزيليناز ضمن مجال

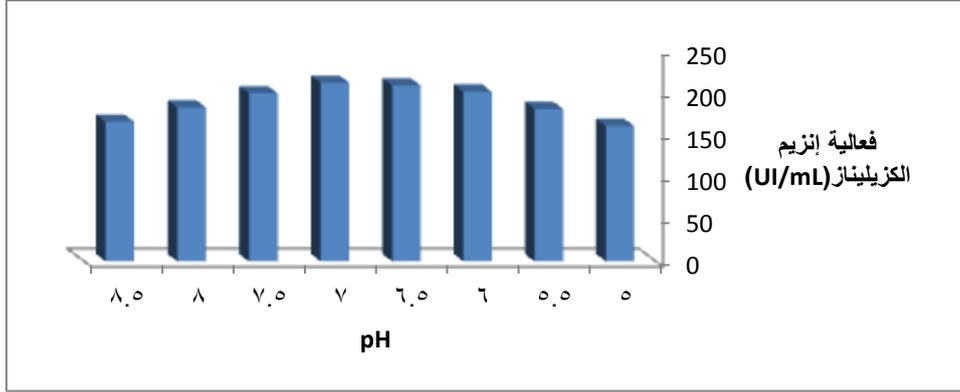
حراري (20, 25, 30, 35, 40, 45 م) حيث نلاحظ من الشكل (2) تباين في إنتاج إنزيم الكزلييناز من قبل العزلة المدروسة باختلاف درجة الحرارة أثناء التحضين. فقد أظهرت الدراسة بأن درجة الحرارة 30 م هي المثلى بالنسبة للنوع *Trichoderma harzianum* حيث بلغت الفعالية الإنزيمية 0.081 ± 208.4 وحدة إنزيمية/مل، وهذا يتفق مع (Seyis&Aksoz,2005) حيث كان الوسط المستخدم محضر دون الاعتماد على مصدر طبيعي للكزليان مكون من (الببتون، اليوريا، فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين، كلوريد الكالسيوم، توين 80، كبريتات الأمونيوم، كبريتات المغنيزيوم، birchwood كمصدر للكربون)، (Gomes-Garcia et al.,2018) حيث استخدمت الذرة كركيزة لإنتاج الكزلييناز باستخدام *Trichoderma harzianum* (Rezende et al.,2002) حيث استخدم تفل قصب السكر كركيزة في عملية إنتاج الكزلييناز، إلا أنه يختلف مع (Pathak et al.,2014) حيث كانت درجة الحرارة الموافقة لأعلى فعالية إنزيمية 55-60 م وهذا عائد إلى اختلاف خصائص وصفات السلالات ضمن النوع الواحد، ونلاحظ أنه مع ارتفاع درجة الحرارة ينخفض إنتاج إنزيم الكزلييناز حيث أن ارتفاع درجة الحرارة يحد من اصطناع البروتينات الضرورية لنمو فطريات العفن ولإتمام العمليات الاستقلابية المختلفة (Azzouz et al.,2020)



الشكل (2) تأثير درجة الحرارة على إنتاج إنزيم الكزلييناز

تأثير درجة ال pH:

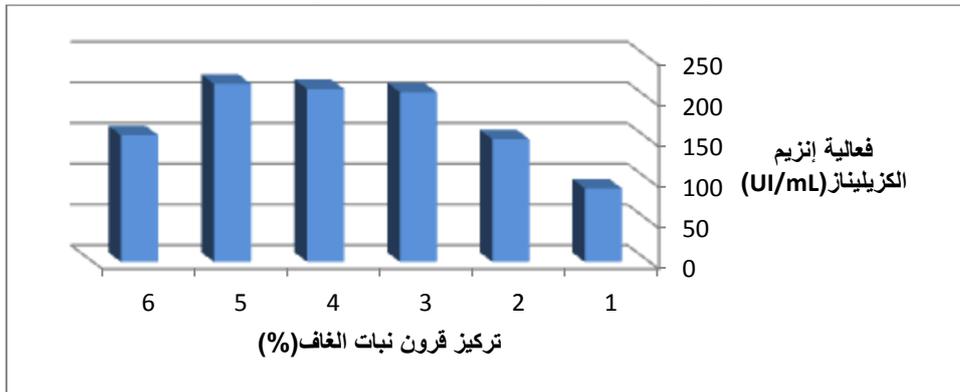
يعتبر رقم ال pH من أهم العوامل التي تؤثر في نظام التخمر، حيث يلعب دوراً رئيسياً في إحداث تغيرات مورفولوجية في فطريات العفن وكذلك في إفراز الإنزيمات إضافة إلى استقرار وثبات هذه المنتجات في الوسط (Gupta et al.,2003)، حيث يظهر الشكل (3) بأن ال pH المثالي لإنتاج الكزلييناز من قبل كل من *Trichoderma harzianum* هو (7) بفعالية إنزيمية قدرها (0.081 ± 211.6) وهذا يتوافق مع (CheoL et al.,2003). وهذا يختلف مع كل من (Rahnama et al.,2013)(Seyis&Aksoz,2005) الذي حدد رقم ال pH المثالي هو (5)، حيث أشارت العديد من الدراسات إلى انخفاض إنتاج إنزيم الكزلييناز في الأوساط القلوية (Ninawe et al.,2008)



الشكل (3) تأثير رقم ال pH على إنتاج إنزيم الكزيليناز

تأثير تركيز قرون نبات الغاف على إنتاج إنزيم الكزيليناز:

إن تركيز قرون نبات الغاف كان له تأثير على الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكزيليناز المنتج من قبل النوع الفطري المدروس، فقد حقق التركيز 5% أعلى فعالية إنزيمية قدرها 0.04 ± 218.4 وحدة إنزيمية/مل بالنسبة لـ *Trichoderma harzianum*، ويعود تأثير تركيز قرون الغاف على الفعالية الإنزيمية إلى تأثير نسبة الليغوسيللوز الموجودة في الركيزة في تحفيز الميكروبات على إنتاج إنزيم الكزيليناز (Hoda et al., 2012)، كما أن ارتفاع تركيز قرون نبات الغاف في الوسط يسبب انخفاض الرطوبة بشكل نسبي، حيث أن ارتفاع نسبة الرطوبة يؤثر على انتقال الأوكسجين وكذلك على مسامية الوسط ويؤثر على بنية جزيئات الركيزة، وهذا بدوره يؤثر على التهوية ونمو فطريات العفن (Azzouz et al., 2020)، حيث أظهرت هذه الدراسة إمكانية استخدام المواد الأولية السيللوزية والمخلفات الزراعية كركائز في عمليات التخمر للحصول على الأنزيمات، حيث تبين بأن قرون الغاف وسط جيد لنمو واستقلاب الأنواع الفطرية المدروسة، فإن احتواء قرون نبات الغاف على كل من الهيميسيللوز والكزيلان يحفز فطريات العفن على إفراز وإنتاج إنزيم الكزيليناز (Ramasamy et al., 2014)، وهنا لا بد من الإشارة إلى أن احتواء قرون نبات الغاف على الكزيلان يساعد على تحفيز إنتاج إنزيم الكزيليناز (Taibi et al., 2012).

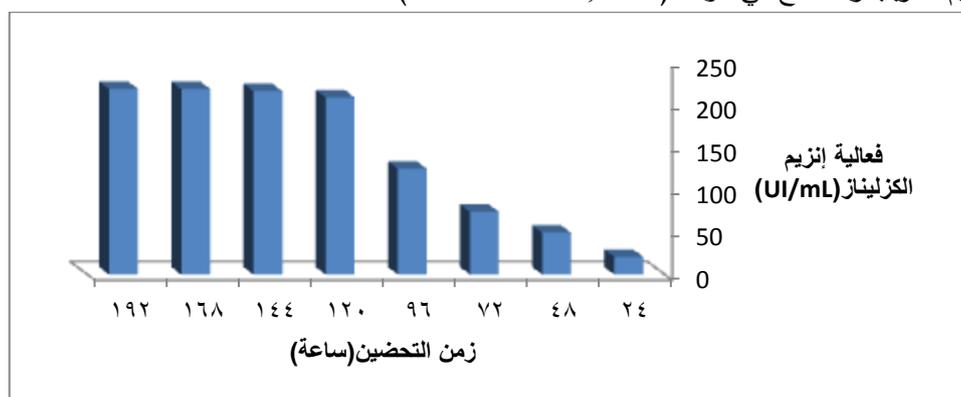


الشكل (4) تأثير تركيز قرون نبات الغاف على إنتاج إنزيم الكزيليناز

تأثير زمن التخمر:

يلاحظ أن إنتاج الإنزيم قد بدأ بالنسبة للنوع الفطري المدروس (*Trichoderma harzianum*) بعد مرور 24 ساعة على التحضين، وقد ازداد النشاط الإنزيمي بزيادة مدة التخمر حيث بلغ حده الأقصى بعد مرور 168 ساعة بفعالية قدرها 0.081 ± 218.3 (وحدة إنزيمية/مل) وهذا يتقاطع مع ما توصل إليه (Gomes-Garcia et al., 2018)

(Azzouz *et al.*,2020)، حيث يلاحظ بشكل عام ازدياد النشاط الإنزيمي بزيادة فتر التخمر إلى أن تبلغ الفعالية الإنزيمية حدها الأقصى بعدها تثبت عند هذه القيمة أو تنخفض وهذا يعود إلى حدوث تعطيل في أنظمة إفراز الإنزيم في الفطريات المجهدة من حيث التمثيل الغذائي وذلك بسبب نفاذ العناصر الغذائية في وسط التخمر (Goncalves *et al.*,2015)، وفي كثير من الأحيان يتم إفراز إنزيم البروتياز في وسط التخمر مما يسبب تعطيل وتدهور إنزيم الكزيليناز المنتج في الوسط (Yasinok *et al.*,2010).



الشكل (5) تأثير زمن التخمر على إنتاج إنزيم الكزيليناز

تصميم النموذج:

بعد إجراء التجارب المختلفة كما هو موضح في الجدول (1) والحصول على البيانات التجريبية تم معالجة البيانات بواسطة برنامج Design Expert ver. 11. (Stat Ease, USA) والحصول على القيم المتوقعة وفق النموذج حيث ظهرت النتائج كما يلي:

الجدول (1) : تصميم التجربة ونتائج البيانات التجريبية والقيم المتوقعة لفعالية إنزيم الكزيليناز تحت ظروف إنتاج مختلفة

Run	Factor 1 A: temperature C°	Factor 2 B: pH	Factor 3 C: time h	Factor 4 D:substrate %	Response Xylanase enzyme	
					actual	predicte
1	25	7.5	120	6	209.3	202.02
2	32.5	6.5	160	4.5	218.8	215.92
3	40	7.5	200	3	182.4	180.79
4	40	7.5	120	6	205.6	194.98
5	25	7.5	120	3	194.1	178.99
6	25	5.5	120	3	172.5	166.55
7	32.5	6.5	160	4.5	218.8	215.92
8	32.5	6.5	160	1.5	195.7	223.15
9	25	7.5	200	3	191.2	180.64
10	40	5.5	120	3	190.9	173.91
11	40	7.5	120	3	205.6	194.98
12	32.5	6.5	160	7.5	210.6	215.96
13	32.5	6.5	160	4.5	218.8	215.92
14	25	5.5	200	6	172.3	166.16
15	32.5	6.5	160	4.5	201.5	215.92
16	25	5.5	200	3	194.1	178.99
17	32.5	6.5	160	4.5	218.8	215.92
18	40	5.5	200	6	172.6	166.16
19	40	5.5	120	6	169.3	158.89
20	32.5	6.5	80	4.5	150.4	183.55
21	32.5	6.5	240	4.5	183.1	192.47
22	32.5	6.5	160	4.5	218.8	215.92
23	32.5	4.5	160	4.5	140.4	160.54
24	25	5.5	120	6	182.6	162.66
25	17.5	6.5	160	4.5	116.4	131.52

26	40	5.5	200	3	200.3	186.60
27	40	7.5	200	6	202.3	187.27
28	32.5	8.5	160	4.5	171.7	194.09
29	25	7.5	200	6	202.8	198.24
30	47.5	6.5	160	4.5	100.5	127.09

أظهر تحليل التباين (ANOVA) أن النموذج المختار من الدرجة الثانية يمثل البيانات التي تم الحصول عليها بشكل كاف، يظهر في الجدول (3) نتائج تحليل التباين ANOVA لفعالية إنزيم الكزيليناز نلاحظ أن قيمة $p < 0.0001$ تشير إلى اختلاف الاستجابة المتوقعة عند اختلاف شروط الإنتاج، كما يظهر عدم معنوية اختبار نقص المطابقة مما يؤكد على أن النموذج المستخدم ملائم.

تم تحديد أهمية كل معامل من خلال قيمة F في الجدول (2)، نلاحظ أن رقم ال pH كان له الأثر الأكبر في إنتاج إنزيم الكزيليناز. وقد أظهر تحليل التباين ANOVA لثوابت انحدار سطوح الاستجابة المتوقعة في نموذج كثير حدود من الدرجة الثانية للمركبات الفينولية لنبات الآس أن كلا من المؤشرات الخطية و التربيعية كانت معنوية بشكل عالي. كما أن التأثير المشترك لتلك العوامل كان له تأثير معنوي أيضاً. لقد تم تقييم كفاءة النموذج بواسطة معامل تحديد R^2 كما يظهر في الجدول (3) حيث يلاحظ أن قيم R^2 مرتفعة مما يشير إلى وجود ارتباط قوي. ويشير معامل الاختلاف (CV) إلى مقدار تشتت البيانات. وقد ظهر بأن معامل الاختلاف CV للفعالية الإنزيمية كان ضمن الحد المقبول.

جدول (2) تحليل التباين ANOVA للنموذج المستخدم

p-value	F-value	متوسط مجموع مربعات (Mean Square)	درجات الحرية (df)	مجموع المربعات (Sum of Squares)	مصدر التباين (Source)	
0.0242	2.91	1310.76	14	18350.66	النموذج Model	
		449.75	15	6746.32	البواقي Residual	
0.0055	13.02	649.69	10	6496.91	نقص المطابقة Lack of Fit	
		49.88	5	249.41	خطأ النموذج Pure Error	
			29	25096.98	الخطأ الكلي Cor Total	
0.8374	0.0436	19.62	1	19.62	درجة الحرارة A	الخطي
0.0717	3.75	1688.40	1	1688.40	رقم ال pH B	
0.6141	0.2652	119.26	1	119.26	زمن التحضين C	
0.8834	0.0223	10.01	1	10.01	تركيز قرون نبات الغاف D	
0.8793	0.0238	10.73	1	10.73	درجة الحرارة، رقم ال pH AB	المشترك التفاعلي
0.8556	0.0343	15.41	1	15.41	درجة الحرارة وزمن التحضين AC	
0.6075	0.2752	123.77	1	123.77	درجة الحرارة وتركيز قرون نبات الغاف AD	
0.4909	0.4986	224.25	1	224.25	رقم ال pH وزمن التحضين BC	

0.2236	1.61	724.96	1	724.96	رقم ال pH وتركيز قرون نبات الغاف BD	التربيعي
0.8016	0.0654	29.43	1	29.43	زمن التحضين وتركيز قرون نبات الغاف CD	
< 0.0001	28.32	12739.13	1	12739.13	درجة الحرارة A ²	
0.0308	5.68	2554.77	1	2554.77	رقم ال pH B ²	
0.1055	2.97	1334.82	1	1334.82	زمن التخمير C ²	
0.6076	0.2751	123.74	1	123.74	تركيز قرون نبات الغاف D ²	

وهنا لا بد من الإشارة إلى أن قيمة F التي تساوي 2.91 تشير إلى معنوية النموذج المستخدم، وهناك احتمال قدره 2.42% فقط لحدوث خطأ.

جدول (3) تحليل التباين ANOVA لثوابت انحدار سطوح الاستجابة في نموذج كثير حدود من الدرجة الثانية

فعالية إنزيم الكزيليناز	ثوابت معاملات الانحدار
21.21±187.07	المتوسط ± الانحراف المعياري
0.7312	معامل التحديد R ²
0.4803	معامل التحديد المعدل Adjusted R ²
0.5054	معامل التحديد المتوقع Predicted R ²
11.34	التباين % C.V.
6.5218	التذبذب Adeq precision

وبناء على الجدول السابق يمكن تحديد المعادلة التي تعطي فعالية إنزيم الكزيليناز من قبل البرنامج الإحصائي :

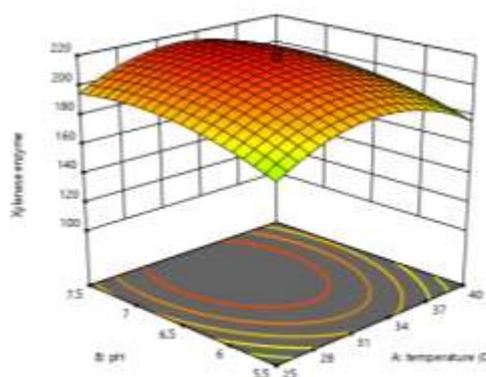
$$\text{Xylanase activity} = -809.05558 + 27.12829 \text{ temperature} + 132.18021 \text{ pH} + 2.26732 \text{ time} - 25.58264 \text{ substrate} - 0.109167 \text{ temperature} * \text{pH} - 0.003271 \text{ temperature} * \text{time} - 0.247222 \text{ temperature} * \text{substrate} - 0.093594 \text{ pH} * \text{time} + 4.48750 \text{ pH} * \text{substrate} - 0.022604 \text{ time} * \text{substrate} - 0.383130 \text{ temperature}^2 - 9.65104 \text{ pH}^2 - 0.004360 \text{ time}^2 + 0.943981 \text{ substrate}^2$$

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Xylanase enzyme
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
100.5 218.8

X1 = A: temperature
X2 = B: pH

Actual Factors
C: time = 180
D: substrate = 4.5



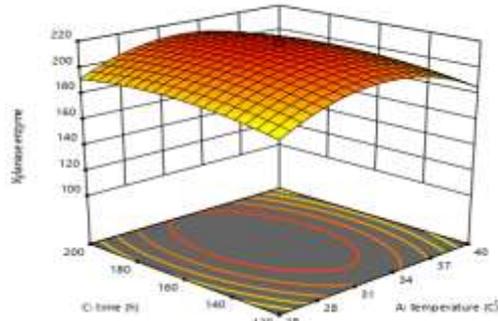
الشكل (6) تأثير درجة الحرارة ورقم ال pH على فعالية إنزيم الكزيليناز

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Xylanase enzyme
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
100.5 218.8

X1 = A: temperature
X2 = C: time

Actual Factors
B: pH = 6.5
D: substrate = 4.5



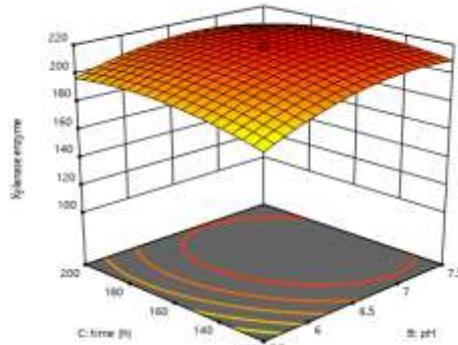
الشكل (7) تأثير درجة الحرارة وزمن التحضين على فعالية إنزيم الكزيليناز

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Xylanase enzyme
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
100.5 218.8

X1 = B: pH
X2 = C: time

Actual Factors
A: temperature = 32.5
D: substrate = 4.5



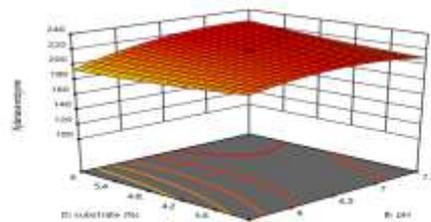
الشكل (8) تأثير رقم ال pH وزمن التحضين على فعالية إنزيم الكزيليناز

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

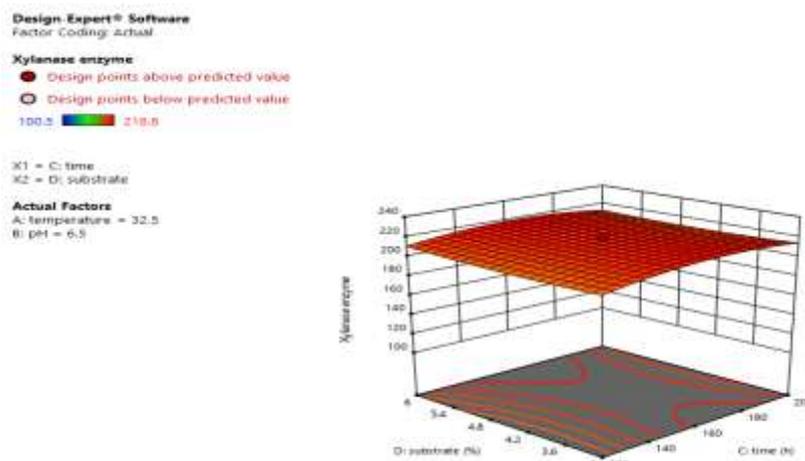
Xylanase enzyme
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
100.5 218.8

X1 = B: pH
X2 = D: substrate

Actual Factors
A: temperature = 32.5
C: time = 180



الشكل (9) تأثير رقم ال pH وتركيز قرون نبات الغاف على فعالية إنزيم الكزيليناز



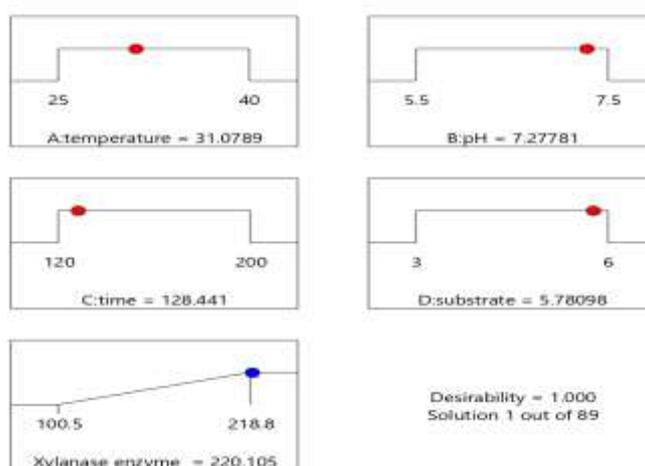
الشكل (10) تأثير زمن التحضين وتركيز قرون نبات الغاف على فعالية إنزيم الكزيليناز

تحليل سطوح الاستجابة : Analysis of response surface

إن العلاقة بين المتغيرات المستقلة و المرتبطة موضحة في تمثيل ثلاثي الأبعاد لسطوح الاستجابة في الأشكال (6)، (7)، (8)، (9)، (10) حيث يتبين بأن تأثير جميع العوامل المدروسة (درجة الحرارة، رقم ال pH ، تركيز قرون نبات الغاف، زمن التحضين) على إنتاج الكزيليناز من الدرجة الثانية.

تجارب الموثوقية:

يؤدي إثبات التجارب إلى تتبؤ الشروط المستنتجة من تحليل قمم لل RSM يظهر أن القيم التجريبية كانت إلى حد مقبول قريبة من القيم المتوقعة مما يعزز صلاحية وكفاية النموذج وهذا موضح في الجدول (1). أظهرت نتائج الدراسة شروط الإنتاج المثالية لإنزيم الكزيليناز، كما هي موضحة في الشكل (10)، من حيث درجة الحرارة التي بلغت 31.09 درجة مئوية، ورقم ال pH يساوي 7.2، وزمن التحضين الذي بلغ 128.4 ساعة، وتركيز قرون نبات الغاف 5.7%، حيث تم تحديد هذه القيم من قبل البرنامج.



الشكل (11) الشروط المثلى المحددة لإنتاج إنزيم الكزيليناز

الاستنتاجات والتوصيات:

- 1- تمّ عزل وتحديد هوية النوع الفطري وتعريفه وهو: (*Trichoderma harzianum*).
 - 2- تمّ الكشف عن قابلية هذه النوع لإنتاج إنزيم الكزيليناز.
 - 3- تمّ تطبيق مجال حراري (20، 25، 30، 35، 40، 45 م) على *Trichoderma harzianum* ، وسجلت درجة الحرارة المثلى 30 م° بالنسبة لهذا النوع.
 - 4- تمّ تحديد رقم ال pH الأمثل لإنتاج الكزيليناز وهو (7).
 - 5- تمت دراسة تأثير تركيز قرون نبات الغاف على الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكزيليناز، وسجل التركيز 5% أعلى فعالية إنزيمية.
 - 6- لوحظ ازداد النشاط الإنزيمي بزيادة مدة التخمير حيث بلغ حده الأقصى بعد مرور 192 ساعة.
 - 7- يظهر الارتباط المرتفع للنموذج (response surface methodology (RSM)) أن نموذج كثير الحدود من الدرجة الثانية قد نجح في تحديد أفضل شروط لإنتاج إنزيم الكزيليناز من قبل (*Trichoderma harzianum*)، لناحية العوامل (درجة الحرارة، رقم ال pH، زمن التحضين، تركيز قرون نبات الغاف)، حيث يمكن استخدام سطوح الاستجابة في العديد من التطبيقات الكيميائية و بفعالية كبيرة.
 - 8- سجلت شروط إنتاج مثالية لإنزيم الكزيليناز، لناحية درجة الحرارة التي بلغت 31.09 درجة مئوية، ورقم ال pH يساوي 7.2، وزمن التحضين الذي بلغ 128.4 ساعة.
- وأخيراً واعتماداً على نتائج البحث يوصى أن تكون الدراسات المقبلة متممة له، ومتعلقة بدراسة الشروط المثلى لإنتاج إنزيم الكزيليناز من قبل فطريات العفن وعلى وجه الخصوص الأنواع التابعة لجنس *Trichoderma spp.* على سبيل المثال تركيز المعلق البوغي، نوع الركيزة، المصدر الكربوني الأمثل وتركيزه، المصدر النتروجيني الأمثل وتركيزه، إضافة إلى دراسة قدرة الأنواع المدروسة على إنتاج إنزيمات أخرى كالسيلولاز والأميلاز.

References:

1. AZZOUZ,Z.;BETTACHE,A.;BOUCHERBA,N.;AMGHAR,Z.;BENALLAOU,S.*Optimization of xylanase production by newly isolated strain Trichoderma afroharzianum isolate AZ 12 in solid state fermentation using response surface methodology.* Cellulose Chemistry and Technology.54(5)(2020) 451-462.
2. CHEOL,K.K.;YOO,S.S.;OH,Y.A.;KIM,S.J.*Isolation and Characteristics of Trichoderma harzianum FJ1 Producing Cellulases and Xylanase.* J. Microbiol Biotechnol.13(1)(2003)1-8.
3. GOMES-GARCIA,M.R.;MIGUEL,A.;MEDINA,M.;RODRIGUEZ,R.;FARRUGGIA,B.;PICO,G.;AGUILAR,C.*Production of a xylanase by Trichoderma harzianum(Hypocrea Lixii) in solid-state fermentation and its recovery by an aqueous two-phase system.* Canadian journal of Biotechnology.2(2)(2018)108-115.
4. GONCLAVES,G.A.;TAKASUGI,Y.;JIA,L.;MORI,Y.;NODA,S.;TANAKA,T.;ICHINOSE,H.;KAMIYA,N.*Synergistic effect and application of xylanases as accessory enzymes to enhance the hydrolysis of pretreated bagasse.* Enzyme Microb Technol.72(2015)16-24.

5. GUPTA ,R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI ,V.K.; CHAUHAN, B. *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective.* Process.Biochem .38(11)(2003)1599–1616.
6. HODA,M.S.;ABDEL-DAYEM,A.S.;ARAFATBEL,T.*Production of xylanase by Aspergillus niger and Trichoderma viride using some agriculture residues.* International journal of Agriculture Research.7(2012) 46-57.
7. 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.
8. JUTURU,V&WU,J.C.*Microbial xylanases:Engineering ,production and industrial applications.*Biotechnol Adv.30(2012)1219-1227.
9. KANAGA, K.; PANDEY ,A.; KUMAR, S.*Multi-objective optimization of media nutrients for enhanced production of algae biomass and fatty acid biosynthesis from Chlorella pyrenoidosa NCIM 2738.*Bioresour Technol .200(2016):940–950.
10. LI, P.K.; AZADIC, R.; COLLINS, J.; TOLAN, J.S.; KIM, K.E.; ERIKSSO.N,*Relationships between activities of xylanase and xylan structures.* Enzyme Microb. Technol.27(2000)89–94.
11. MANDAL,A.(2015).*Review on microbial xylanases and their applications.* international journal of life science.4(3)(2015)178-187.
12. MILLAR,G.L. *Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar.* Analytical chemistry.31(1959)426-428.
13. MONTGOMERY, D. C.2001. *Design and analysis of experiments* .5th. ed. Wiley. New York.
- 14.MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. 2002 *Response surface methodology : Process and product optimization using designed experiments.* 2nd. ed. Wiley. New York, 2100.
15. NINAWA ,S.; KAPOOR ,M.; KUHAD,R.C.*Purification and characterization of extracellular xylanase from Streptomyces cyaneus SN32.* Bioresour Technol.99(2008)1252–1258.
16. PATHAK,P.;BHARDWAJ,N.K.;SINGH,A.K.*Production of crude cellulase and xylanase from Trichoderma harzianum PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling.* Appl Biochem Biotechnol.172(8)(2014)3776-3797.
17. PIROTA,R.D.P.B.;DELABONA,P.S.;FARINAS,C.S.*Simplification of the biomass to ethanol conversation process by using the whole medium of filamentous fungi cultivated under solid-state fermentation.*Bioenergy Res.7(2014)744-752.
18. RAHNAMA,N.;MAMAT,S.;MDSHAH,U.;LING,F.H.;ABDULRAHMAN,N.;ARIFF, A.B. *Effect of alkali pretreatment of Rice straw on cellulose and xylanase production by local Trichoderma harzianum SNRS3 under solid state fermentation.*BioResources.8(2)(2013)2881-2896.
19. 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.* Bio Resources.9(4)(2014)7209-7221.
20. 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.
21. SA-PEREIRA,P.;PAVEIA,H.;COSTA-FERREIRA,M.;AIRES-BARROS, M.R.*A new look at xylanases: an overview of purification strategies.*Mol Biotechnol 24(3)(2003)257–281.

22. SEYIS,I&AKZOS,N. *Xylanase production from Trichoderma harzianum 1073 D3 with alternative carbon and nitrogen sources.* Food Technol Biotechnol.43(1)(2005)37-40.
23. SHAH,A.R&MADAMWAR.D.*Xylanase production by a newly isolated Aspergillus foetidus strain and its characterization.* Process Biochemistry.40(5)(2005)1763-1771.
24. SILVA,L.A.O.;TERRASAN,C.R.F.;CARMONA,E.C.*Purification and characterization of xylanases from Trichoderma inhamatum.* Electron J Biotechnol.18(2015)307-313.
25. SUBRAMANIYAN,S&PREMA,P.*Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application.* Critical Reviews Biotechnol. 22(1)(2002)33–64.
26. TAIBI,Z.;SAOUDI,B.;BOUDELAA,M.;TRIGUI,H.;BELGHITH,H.;GARGOURI,A.;LADJAMA,A.*Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from Actinomadura sp. Strain Cpt20 isolated from poultry compost.* Appl Biochem Biotechnol.166(3)(2012)663–679.
27. UDAY,U.S.P.;CHOUDHURY,P.;BANDYOPADHYAY,T.K.;BHUNIA,B.*Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth.* International journal of biological macromolecules.82(2016)1041-1054.
28. VENKATESH,M & GIRIJA,D.*Micrbial pectinase from tropical fruit Wastes.* Journul of Tropical Agriculture. 47(1)(2009)67-69.
29. WALIA,A.;GULERIA,S.;MEHTA,P.;CHAUHAN,A.;PRAKASH,J. *Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching:a review.*Biotech.7(11)(2017)1-12.
30. WALIA,A.;MEHTA,P.;GULERIA,S.;CHAUHAN,A.;SHIRKOT,C.K. *Molecular cloning and sequencing of alkalophilic Cellulosimi-crobium cellulans CKMX1 xylanase gene and characterization of gene product.* Braz Arch Biol Technol .58(6)(2015)913–922.
31. WALTER,M.;JAKLITSC,G.J.;SARAH,L.M.;BING,S.L. *Hypocrearufa/ Trichoderma viride: a reassessment and description of five closely related specieswith and without warted conidia.* Stud Mycol USA .56(1)(2006)135-177.
32. YADAV,S.,YADAV,P.K.,YADAV,D.,YADAV,K.D. (2009) *Purification and characterization of pectin lyase produced by Aspergillus terricola and its application in retting of natural fibers.* Appl Biochem Biotechnol. 159(2009)(1)270–283.
33. YASINOK,A.E.,BIRAN,S.,KOCABAS,A.;BAKIR,U.*Xylanase from a soil isolate, Bacillus pumilus: Gene isolation, enzyme production, purification, characterization and one-step separation by aqueous-two-phase system.* World J Microbiol Biotechnol.26(2010)1641–1652. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0340-8>
34. ZHANG,Y.;WANG,L.;CHEN,H.*Correlations of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation.*Chem Eng Sci.165(2017)65-73.
35. ZHU,Z.Y.;ZHAO,L.;GE,X.R.;TANG,Y.L.;CHEN,L.J.;PANG,W.;ZHANG,Y.*Preprati on characterization and bioactivity of xylobiose and xylotriose from corncob xylan by xylanase.*Eur food Res Technol.241(2015)27-35.