مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (2) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (2) 2015

قدرة بعض العزلات الفطرية المحلية على إنتاج أنزيم السيللولاز ودراسة الفعالية الأنزيمية

الدكتورة نـــوال علـــي*
الدكتورة ســـناء ســـارة**

(تاريخ الإيداع 19 / 11 / 2014. قبل للنشر في 20 / 4 / 2015)

□ ملخّص □

عزل من المحيط الجذري لنبات القمح .*Triticumaestivum*L الأنواع الفطرية الآتية:
Aspergillusniger,Fusariumsolani, harzianumTrichoderma, T.viride, *T.longibrachiatum* *Rhizoctoniasolani, F.oxysporum* و*Alternaria alternate*. تبيان جميع العزلات المدروسة قابلية لإنتاج أنزيم السيللولاز Cellulase في الوسط الصلب(CMC-Agar) ، إذ أعطى الفطر *T. viride* أعلى قابلية للإنتاج بمعدل 5.16، بينما أعطى الفطر *Rhizoctoniasolani* أقل إنتاجية للأنزيم بمعدل2.61. وأظهرت الدراسة الكمية باستخدام وسط مندل السائل أنّ أعلى إنتاجية للسيللولاز أعطاها الفطر *T.viride* ، إذ بلغت الفعالية الأنزيميةU/mL 4.39، كما أعطى أكبر كتلة حيوية وقيمتها g/L8.96، بينما أعطى الفطر *Rhizoctoniasolani* أقل إنتاجية أنزيمية،إذ بلغت الفعالية الأنزيميةU/mL 2.04، وبلغت الكتلة الحيوية g/L 4.65. وتبين من دراسة تأثير مصادر كربونية مختلفة على الفطر*T.harzianum* أنّ الســـكروز كان الأفضل في إنتاجية الســيللولاز، إذ بلغت الفعالية الأنزيميةU/mL3.87، وبلغت الكتلة الحيوية g/L 2.83.

الكلمات المفتاحية: أنزيم السيللولاز ،فعالية السيللولاز، *Trichodermaviride*

*أستاذ – قسم علم النبات – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية.
**مدّرس – قسم علم الحياة الحيوانية– جامعة تشرين – اللاذقية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (2) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (2) 2015

The ability of some local fungal isolates to produce Cellulase and the study of the enzymatic activity

Dr. Nawal Ali*
Dr. Sanaa Saraa**

(Received 19 / 11 / 2014. Accepted 20 / 4 /2015)

□ ABSTRACT □

The following Fungal species were isolated from therhizosphere of wheat plant (*Triticumaestivum*L.): *Trichodermaharzianum, T. viride, T. longibrachiatum, Rhizoctoniasolani, Alternariaalternata, Fusariumsolani, Fusariumoxysporum and Aspergillusniger.* It was shown that all isolated fungi had the capacity to produce cellulase in solid medium (CMC- Agar), while the fungus *T.viride* gave the highest capability for the production of this enzyme(5.16). The fungus *Rhizoctoniasolani* gave less productive ratio (2.61). Quantitative test using Mandelium liquid medium showed that the fungus *T.viride* had the highest productivity of Cellulase(4.39 U/mL), and this fungus had greater biomass (8.96 g/L). The fungus *Rhizoctoniasolani* gave lower enzyme productivity(2.04 U/mL) and its biomass reached(4.65 g/L). The study of different carbon sources for the fungus *T.harzianum* showed that Sucrose was the best media in Cellulase productivity. It reached (3.87U/mL), and the biomass was (2.83 g/L).

Key Words: Sellulase, Activity Sellulase**,** *Trichodermaviride***.**

* **Professor, Department of Botany, Faculty of Science Tishreen University, Lattakia, Syria.**
** **Assistant Professor, Department of Zoology, Faculty of Science Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

يتكوّن السيللوز Cellulose من عدة آلاف من جزيئات السكر البسيط D – غلوكوبيرانوز، المرتبطة بروابط غليكوزيدية من نموذج (4 ⟵ 1)β، ويعدالسيللوز مقاوماً نسبياً للتحلل المائي وأغلب المحلات العضوية، وهذا يدل على صعوبة الحصول على سكر الغلوكوز من السيللوز إلا بوجود الأنزيم القادر على تحلله[1]، فالإنسان ومعظم الثدييات لا تستطيع هضم السيللوز نظراً لغياب الأنزيم القادر على تحلله، بينما المجترات تستطيع ذلك بوساطة الأحياء الدقيقة الموجودة في الكرش والأمعاء. والسيللوز أحد المركبات العضوية الأكثر وفرة في الطبيعة، ويكوّن حوالي (15-60)% من مكونات الجدار الخلوي للنباتات فيكسبها الشكل والقساوة [2]، وتنتج النباتات سنوياً بعملية التركيب الضوئي حوالي 10^{10} طن من السيللوز[3]، يتراكم بعضها دون استخدام ، مسبباً مشاكل بيئية كثيرة [4]. وهنا برز الدور المهم للكائنات الدقيقة كالفطريات والبكتيريا التي درست من قبل العديد من الباحثين [5]، كأحد الحلول لتفكيك السيللوز وتحويله إلى سكريات بسيطة يسهل استخدامها في العديد من التخمرات الصناعية لإنتاج مواد ذات قيمة اقتصادية عالية [6]، وتعود قدرة الكائنات الدقيقة على تحليل مادة السيللوز بسبب إنتاجها لأنزيم السيللولاز Cellulase الذي يفكك الروابط الغليكوزيدية بين جزيئات الغلوكوز ويحوله إلى سكر غليكوز بسيط، الذي يعد عنصر طاقة مهماً للخلايا ومصدراً أساسياً للأكسدة، و هو سهل التمثيل من قبل مختلف الكائنات الدقيقة المستخدمة في الصناعات الكيميائية والطبية والغذائية كإنتاج الكحول والحموض العضوية والمضادات الحيوية وإنتاج الأغذية الحيوانية [7]. يضاف أنزيم السيللولاز إلى عليقة الماشية كمادة مساعدة على الهضم، كما يستخدم في الصناعات النسيجية والورقية والهندسة الوراثية[8].

يعد أنزيم السيللولاز معقداً أنزيمياً متكاملاً ، مكوّناً من ثلاث أنزيمات تسهم مجتمعة في حلمهة السيللوز على نحوٍ كامل عن طريق تحطيم الروابط الغليكوزيدية(4 ⟵ 1)β والأنزيمات هي:

1. Endo- 1,4- β-D- glucanase (Mcase, EC.3.2.1.4).
2. Exo – 1,4- β-D glucanase (Cellobiohydrolase, EC.3.2.1.91).
3. β-Glcosidase (Cellobiase, EC.3.2.1.21). [9]

يعد نمو الفطور والبكتيريا المنتجة لأنزيم السيللولاز على المخلفات الصناعية والزراعية وتحويلها إلى مواد ذات فائدة حيوية من أهم الحلول للتخلص من التلوّث البيئي السيللوزي[10]. إضافةً إلى ذلك فإنّ تحويل السيللوز إلى سكريات بسيطة بطريقة الحلمهة الأنزيمية باستخدام أنزيمات السيللولاز المنتجة من الأحياء الدقيقة من المقترحات المهمة لإنتاج الوقود البديل (الايتانول)[11]،ونظراً للأهمية الاقتصادية لأنزيم السيللولاز التي تنتجه الكائنات الدقيقة مثل الفطريات التابعة للأجناس[12] *Trichoderma,Aspergillus , Cladosporium*،توجهت الأنظار لتنميتها واستخدامها في مجالات عدة.

أهمية البحث وأهدافه:

تنبع أهمية البحث من أنه يسلط الضوء على دور بعض الفطور في إنتاج أنزيم السيللولاز، أما الهدف فهو الحصول على عزلات محلية من فطور تملك قابلية عالية لإنتاج أنزيم السيللولاز، فضلاً عن دراسة تأثير بعض المصادر الكربونية في إنتاج أنزيم السيللولازمن الفطر *T.harzianum*.

طرائق البحث ومواده:

1) الحصول على العزلات الفطرية:

استخدمت ثماني عزلات محلية مختلفة وهي:*TrichodermaharzianumT.viride,T.longibrachiatum* *Alternaria alternate, Fusariumsolani, Aspergillusniger ,Rhizoctoniasolani,* و*Fusariumoxysporum*. عزلت جميع العينات من المحيط الجذري لنبات القمح .*Triticumaestivum*L على عمق cm (10- 5) باستخدام أطباق الآغار على مستنبت)PDA Potato-Dextrose Agar(بأخذ 0.5g من عينة التربة، إذ تجفف وتطحن ثم تنثر فوق طبق بتري يحتوي على مستنبت PDA والحاوي على الصاد الحيوي أمبيسيلين لتفادي نمو البكتيريا. حضنت الأطباق عند درجة حرارة 25±2°C لمدة أسبوع ومع الفحص يومياً بدءاً من اليوم الثالث. تمّ تحديد الأنواع لكل من العزلات المدروسة بفحص المستعمرات النامية بوساطة المجهر الضوئي، بالاعتماد على شكل المستعمرة ولونها والفحص المجهري لتفرعات المشيجة- الحوامل الكونيدية وشكل الأبواغ، وتمّت مقارنة هذه الصفات مع المراجع التصنيفية [15,14,13]. حفظت عينة نقية من الأنواع المدروسة ضمن أنابيب اختبار على نحوٍ مائل في البراد عند درجة حرارة 4°C، وتمّ تجديد العينات كل أسبوعين للمحافظة على حيوية الفطور وفعاليتها.

2) أوساط الاستنبات:

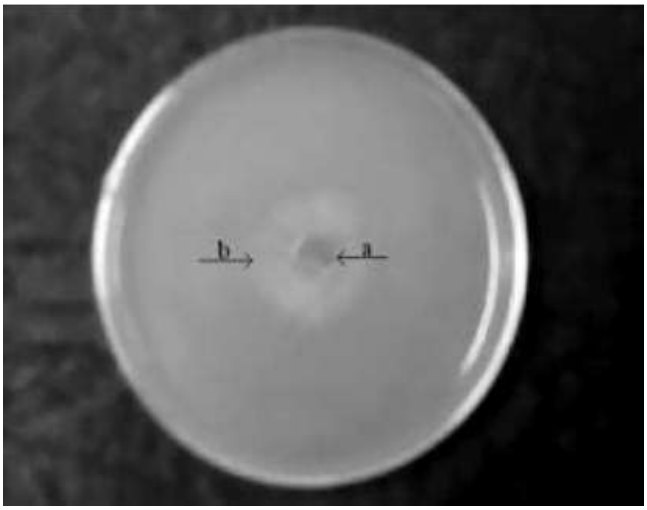
الوسط الصلب:

أجري اختبار نوعي باستخدام الوسط الصلب الخاص بالكشف عن قابلية الفطور التي تمّ الحصول عليها لإنتاج أنزيم السيللولاز، إذ استخدم وسط الكاربوكسيمتيل سيللوز آغار Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC-Agar)، الذي يتكون من المواد الآتية (غ/ لترمن الماء المقطر) [16]:

10.0 CMC – Na Salt	20.0 Agar	2.0 $NaNO_3$	0.5 KCl
0.5 $MgSO_4.7H_2O$	1.0 K_2HPO_4	0.01 $FeSO_4$	

حضرّ الوسط بإذابة جميع المواد في الماء المقطر باستثناءCMC-Na Salt(أضيف تدريجياً باستخدام خلاط مغناطيسي مع التسخين حتى يتجانس الوسط)،وضبط الأس الهيدروجيني عند الدرجة 6.0 باستخدام حمض كلور الماء وماءات الصوديوم، وعقم الوسط بجهاز الأوتوكلاف Autoclave عند الدرجة121°C لمدة15 دقيقة. وزع الوسط في أطباق بتري معقمة، وتركت حتى يتصلب الوسط فيها،ثم أضيف لكل طبق قرص من المستعمرة الفطرية المدروسة بقطر 5mm وبعمر أسبوع، وحضنت الأطباق عند الدرجة 28±2°C وتم مراقبتها يومياً حتى اليوم الخامس.

تم الاستدلال على إنتاج الأنزيم بملاحظة ظهور هالة فاتحة اللون حول المستعمرة الفطرية النامية في وسط الكشف عن أنزيم السيللولاز(شكل 1)، التي أمكن ملاحظتها بعد فترات مختلفة من الحضن، والتي ازداد قطرها باستمرار فترة الحضن دلالة على زيادة قدرة الفطر على إنتاج أنزيم السيللولاز باستمرار النمو.



شكل : (1)**الكشف عن انتاج أنزيم السيللولاز بواسطة عزلة فطرية في الوسط الصلب**
a- قطر مستعمرة الفطر. b- قطر هالة التحلل.

يدل ظهور الهالة على تحلل الـCMCبوساطة إنزيم السيللولاز المفرز إلى الوسط الصلب. سحبت الأطباق من الحاضنة بعد خمسة أيام من الحضن وقيس قطر المستعمرة الفطرية النامية وقطر الهالة المتكوّنة لكل منها. وتمّ حساب قابلية العزلات الفطرية على إنتاج أنزيم السيللولاز باستخدام المعادلة الآتية[16]:

قابلية الفطر على إنتاج أنزيم السيللولاز = قطر هالة التحلل/ قطر المستعمرة الفطرية

الوسط السائل:

استخدم وسط مندل الزرعي الخاص بالإنتاج والذي يتكون من المواد الآتية(غ/لتر من الماء المقطر)[17]:

0.3 $MgSO_4 .7 H_2O$	10.0 Cellulose	2.0 KH_2PO_4	0.3 Urea
0.005 $FeSO_4 .7 H_2O$	1.0 Pepton	0.002 $CoCl_2$	
0.0014 $ZnSO_4 . H_2O$	1.4 $(NH_4)_2 SO_4$	0.3 $CaCl_2$	

تم إذابة جميع مكونات الوسط في الماء المقطر المعقم باستثناء اليورياUrea، وضبط الأس الهيدروجيني عند الدرجة 6.0، وزع الوسط المحضّر في دوارق مخروطية حجم 250 mLبواقع 50 mL في كل دورق، سدت الدوارق بإحكام بسدادات قطنية ثم غلفت بأوراق الألمنيوم وعقمت تحت نفس الظروف السابقة الذكر. وبعد إتمام عملية التعقيم أضيف Urea المعقم بالبسترة إلى الدوارق تحت ظروف معقمة. لقحت الدوارق بقرص من مستعمرة الفطر بقطر5mm وبعمر أسبوع[18]. حضنت الدوارق بعد التلقيح في الحاضنة الهزازة عند الدرجة 28±2°C بمعدل 150 دورة / دقيقة، ثم سحبت الدوارق من الحاضنة بعد 7 أيام من الحضن وقيس الأس الهيدروجيني النهائي لكل دورق، ثم أجريت عملية الترشيح لمحتوى كل دورق من الوسط الغذائي باستخدام أوراق ترشيح من نوع (Whatman No. 1) مجففة وموزونة مسبقاً ومثبتة على قمع بوخنرBauchnerFunelمجهز بمفرغ هوائي كهربائي، وبعد انتهاء عملية الترشيح جففت أوراق الترشيح الحاملة للكتلة الحيوية في فرن كهربائي عند الدرجة 70°Cلمدة 24 ساعة، ومن ثمّ تمّ قياس الكتلة الحيوية بحساب فارق الوزنين باستخدام ميزان حساس. ترك الراشح جانياً لقياس الفعالية الأنزيمية للفطر، وفي حال عدم

استخدامه مباشرةً، أضيف للراشح بنزوات الصوديوم (1 g/L)لإيقاف نمو الفطور، ثم حفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 4°C لحين الاستخدام [19].

قيست فعالية السيللولاز اعتماداً على قياس أحد نواتج التفاعل وهو سكر الغلوكوز D – glucose المتحرر من ورقة الترشيح حسب طريقة [17]Filter Paper Assay. تمّ قياس فعالية هذا الأنزيم بأخذ 0.5 mL من الرشاحة في أنبوب اختيار حجم 18mL وأضيف إليها 1 mL من المحلول المنظم Na– Citrate Buffer ذي الأس الهيدروجيني 4.8 وغمر بالمزيج أشرطة ورق ترشيح (Whatman No. 1)قياس1x6 cmووزن50 mg. حضنت الأنابيب لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة 50 C°، بعدها أضيف لكل أنبوب اختيار 3mLمن كاشف DinitroSalicylicacid (DNSA) المحضر بطريقة [20]Miller. وضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة 5 دقائق لإيقاف التفاعل، ومن ثمّ بردت إلى درجة حرارة المختبر. بعدها تمّ قياس كمية الغلوكوز المتحرر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer من نوع)(1700–UVعند طول موجة550 nm. حضّر الشاهد Blank مع التجربة بدون ورقة ترشيح وذلك للمقارنة.

استخدم المنحني القياسي للغلوكوز النقي (المحضّر بنفس الطريقة السابقة الذكر). ولرسم المنحني القياسي للغلوكوز تمّ تحضير محلول سكري بالتراكيز الآتية: mg/L 0.01,0.02,0.03,0.04,0.05.أخذ 1mLمن كل تركيز وأضيف إليه 3 mL من كاشف DNSA بعد ذلك سخنت المحاليل لدرجة الغليان لمدة 10 دقائق، ثم بردت إلى درجة حرارة المختبر وسجلت الامتصاصية لكل تركيز على انفراد عند طول الموجة 550 nm . تمّ تحديد فعالية أنزيم السليولاز بالوحدة الأنزيمية Unit ويرمز لها بالحرف U،وهي كمية الأنزيم التي تحرر 1 ميكرومول من سكر الغلوكوز البسيط خلال دقيقة واحد وتحت ظروف طريقة العمل.

نفذ البحث في مخابر كلية العلوم ومعهد البيئة / جامعة تشرين، في الفترة الواقعة بين 2014/1/15 و2014/7/15.

النتائج والمناقشة:

عزل من المحيط الجذري لنبات القمح الفطور الآتية: *TrichodermaharzianumT.viride, Alternaria alternate,Fusariumsolani Aspergillusniger, Rhizoctoniasolani, T.longibrachiatum* و*Fusariumoxysporum*. وتمّ تعريفها اعتماداً على المراجع التصنيفية [15,14,13]. **استخدمت طريقة الأوساط الصلبة لتحديد قدرة الفطور المدروسة في إنتاج أنزيم السيللولاز**، إذ استخدم الوسط الزرعي الصلب الحاوي على الكربوكسيميتيل سيللوز (CMC–Agar)، ويعد ظهور هالة فاتحة اللون حول المستعمرة الفطرية دليلاً على تحلل هذه المادة بوساطة أنزيم السيللولاز المنتج من قبل هذه الفطور وذلك نتيجة حلمهة السيللوز إلى سكريات بسيطة. أما قابلية العزلات الفطرية على إنتاج أنزيم السيللولاز فقد تمّ حسابها من العلاقة (قابلية الفطر على إنتاج أنزيم السيللولاز = قطر هالة التحلل/ قطر المستعمرة الفطرية).

أظهرت النتائج أنّ جميع الفطور أعطت نتائج إيجابية،لكنها متفاوتة بقدرتها على إنتاج أنزيم السيللولاز (جدول 1). وقد أعطى فطر*T.viride* أعلى كفاءة في تحطيم مادة الكاربوكسيمتيل سيللوز، إذ لوحظ ظهور هالة التحلل حول المستعمرة الفطرية بدءاً من اليوم الثاني من الحضن و استمر ازدياد قطر الهالة باستمرار فترة الحضن

حتى اليوم الخامس حيث بلغ قطرها6.2 cm.تبين هذه النتيجة أنّ *T.viride* يملك قابلية عالية لإنتاج أنزيم السيللولاز التي بلغت قيمتها5.16،و أظهرت بقية الفطريات قدرات متفاوتة بين الجيدة والمتوسطة والضعيفة إذ أعطى كل

جدول (1): قدرة الفطور المختلفة على انتاج أنزيم السيللولاز باستخدام الوسط الصلب(CMC- Agar)

نوع الفطر	بدء ظهور هالة التحلل	قطر المستعمرة الفطرية بعد خمس أيام/cm/	قطر هالة التحلل بعد خمسة أيام/cm/	قابلية الفطر على إنتاج أنزيم السيللولاز
T.viride	اليوم الثاني	1.2	6.2	5.16
F.solani	اليوم الثاني	1.5	6.0	4.00
A.niger	اليوم الثاني	1.2	4.6	3. 83
T. harzianum	اليوم الثالث	1.3	4.4	3.38
T. longibrachiatum	اليوم الثالث	1.4	4.5	3.24
Alt.alternata	اليوم الثالث	1.1	3.5	3.18
F. oxysporum	اليوم الثاني	2.2	5.6	2.76
R.solani	اليوم الثالث	2.1	5.5	2.61

من الفطرين *F.solani* و*A.niger* قابلية جيدة لإنتاج الأنزيم التي بلغت 4.00و3.83على التوالي. بينما أعطت الفطور *T.T. harzianum,Alt. alternate, longibrachiatum* كفاءة متوسطة في إنتاج الأنزيم و بلغت قيمتها 3.24 ,3.18, 3.38 على التوالي. أما الفطرين *R.solani , F.oxysporum* فقد كانت قابلية كل منهما على إنتاج الأنزيم ضعيفة ، وبلغت قيمتها 2.76 و 2.61 على التوالي.

نستنتج مما سبق أنه يوجد تناسب طردي بين قطر هالة التحلل وكفاءة الفطور في إنتاج الأنزيم، وكلما ازدادت قدرة الفطر على إنتاج الأنزيم ازداد قطر هالة التحلل، باستثناء كل من الفطرين*R.solani , F.oxysporum.*

لقد استخدمت طريقة الأوساط الصلبة في إنتاج الأنزيمات المحللة (ألفا- بيتا أميلاز، سيللولاز، بكتنازوالليباز) من قبل البكتيريا والفطور والخمائر لتحليل مخلفات المصانع من قشر ولب البرتقال من قبل [21]. إنّ النتائج التي تمّ الحصول عليها مطابقة لما توّصل إليه [22] عندما عزل 61 نوعاً من الفطور من مناطق جذرية لعدد من النباتات، إذ تبين أنّ الفطور المعزولة من مصادر مختلفة تنتج أنزيم السيللولاز بكميات مختلفة. كما كانت مطابق لما ذكره [23]، الذي أشار إلى أنّ فطر*T. reesei* من أفضل الفطور المنتجة لأنزيم السيللولاز عند استخدام طريقة الأوساط الصلبة. كما أكد [24] أنّ الفطور التابعة لجنس *Trichoderma* هي منأكثر الفطور إنتاجاً لأنزيم السيللولاز.

أظهرت نتائج دراسة الفعالية الأنزيمية للأنواع الفطرية المختلفة باستخدام الوسط السائل وجود تباين في قدرة هذه الفطور على إنتاج أنزيم السيللولاز(جدول 2).إذ أعطى الفطر*T. viride* أعلى فعالية لأنزيم السيللولاز بعد مرور 7 أيام من الحضن التي بلغت4.39 U/mL،وهذا يدل على أنّ هذا الفطر هو الأعلى إنتاجية للسيللولاز.

جدول(2): قدرة العزلات الفطرية على انتاج أنزيم السيللولاز باستخدام وسط مندلالسائل

العزلة الفطرية	الكتلة الحيوية (g/L)	فعالية أنزيم السيللولاز (U/mL)	الأس الهيدروجيني النهائي
T.viride	8.96(0.090)	(0,061) 4.39	(0.020) 5.73
Fusariumsolani	(0,001) 8.16	(0.004) 3.94	(0.014) 6.28
Aspergillusniger	(0.032) 6.98	(0.008) 3.52	(0.050) 6.24
T. harzianum	(0.021) 5.72	(0.014) 3.17	(0.011) 5.27
T. longibrachiatum	(0.002)7.39	(0.001) 3.72	(0.004) 5.40
Alternariaalternata	(0.056) 6.23	(0.005) 3.14	(0.019) 5.56
F. oxysporum	(0.003) 4.92	(0.011) 2.58	(0.100) 4.90
Rhizoctoniasolani	(0.016) 4.65	(0.007) 2.04	(0.080) 5.13

كل قيمة هي معدل لثلاث مكررات. أما الأرقام بين قوسين فتمثل الانحراف المعياري (S.D)

بينما أعطى كل من:*A.alternata وF.solaniT.lonqibrachiatnm,A.niger,T.harzianum,* فعالية أنزيمية جيدة بلغت قيمها على التوالي (3.94, 3.72 , 3.52 , 3.17 , 3.14) U/mL، أما كل من الفطرين. *oxysporumF* و*R.solani* فكانا الأقل إنتاجية لأنزيم السيللولاز وبلغت الفعالية الأنزيمية لكل منهما(2.04,2.58) U/mL على التوالي.وقد تطابقت النتائج التي تمّ الحصول عليها في الوسط السائل مع نتائج الوسط الصلب، باستثناء فطر*T.lonqibrachiatum* إذ تفوق على كل من *A.niger* و*T. harzianum*في إنتاج الأنزيم على خلاف الوسط الصلب وربما يعود السبب لملائمة الوسط السائل لهذا الأنزيم أكثر من الوسط الصلب. فقد جاءت النتائج مطابقة لما توصّل إليه [25]الذي أكّد أنّ جنس *Trichoderma* يعدّ قياسياً لإنتاج السيللولاز، إذ أعطت عزلة فطر *T.viride* أعلى فعالية لأنزيم السيللولاز التي بلغت 4.67 U/mL. يمكن تفسير ضعف قدرة بعض العزلات على إفراز أنزيم السيللولاز لعدة أسباب: إما أن تكون فترة الحضن غير كافية لتحفيز الفطور على إنتاج الأنزيم، أو بسبب الاختلاف في قدرة الفطور على استغلال وسط الاستنبات، أو عدم ملاءمة pH الوسط لهذه الفطور وهذا ما أكده [27,26]،إضافةً إلى أنً فعالية أنزيم السيللولاز المنتج من قبل الفطور تتباين باختلاف السلالات المختلفة [29,28].

أما بالنسبة لإنتاج الكتلة الحيوية فيلاحظ من الجدول(2)أنّ أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية قد بلغت 8.96 g/L لفطر *viride T.* وهي العزلة التي أعطت أعلى فعالية لأنزيم السيللولاز. أما أقل إنتاجية للكتلة الحيوية فبلغت 4.65 g/L لفطر*R.solani* الذي أعطى أقل فعالية لإنتاج أنزيم السيللولاز، وهذا يتطابق مع ما توصّل إليه[25] إذ إنّ أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية حصل عليها كانت لفطر *T.viride*وبلغت 9.24 g/L.

أما بالنسبة للأس الهيدروجيني النهائي فقد انخفض عند معظم الفطور عن الأس الهيدروجيني الأولي(6.0) باستثناء *A.niger* و*F.solani* التي ارتفع عندهما الأس الهيدروجيني النهائي عن الأولي قليلاً ووصل إلى (6.24 , 6.28) على التوالي وهذا يتوافق مع ما توصّل إليه [25]. إنّ سبب انخفاض الأس الهيدروجيني النهائي يعود إلى طرح بعض الحموض العضوية في وسط النمو، نتيجة نمو الفطور ونشاطها في إنتاج أنزيم السيللولاز. بينما ارتفاع الأس الهيدروجيني يعود إلى تحرير شوارد الهيدروكسيلOH نتيجة العمليات الاستقلابية.

تأثير مصادر كربونية مختلفة على إنتاج السيللولاز بوساطة *T.harzianum* بعد7 أيام من الحضن:

اختيرت سبعة أنواع مختلفة من السكريات كمصادر كربونية، أضيفت إلى الوسط الغذائي بنسبة 10 g/L لتنمية فطر*T.harzianum* (تمّ اختيار هذا الفطر لكونه أحد أنواع*Trichoderma*، التي تعد من أكثر الفطور إنتاجاً للسيللولاز). **يلاحظ من نتائج الجدول(3) تبايناً واضحاً في إنتاج أنزيم السيللولاز باختلاف المصدر الكربوني المضاف إلى الوسط الغذائي.**إذ أعطى المصدر الكربوني سكروز أعلى فعالية أنزيمية بلغت3.87 U/mL،يليه

جدول (3): **تأثير مصادر كربونية مختلفة على إنتاج أنزيم السيللولاز لفطر *T.harzianum*بعد سبعة أيام من الحضن**

المصدر الكربوني	الكتلة الحيوية(g/L)	فعالية أنزيم السلليولاز (U/mL)	الأس الهيدروجيني النهائي
سكروز	2.83 (0.097)	3.87 (0.044)	5.4 (0.002)
CMC	1.64 (0.045)	3.28 (0.012)	5.7 (0.012)
سليوبايوز	2.36 (0.008)	3.01 (0.011)	5.2 (0.004)
فركتوز	2.67 (0.012)	2.98 (0.002)	4.9 (0.011)
لاكتوز	1.20 (0.021)	2.46 (0.007)	5.3 (0.002)
نشاء	3.00 (0.009)	2.39 (0.016)	4.8 (0.005)
غلوكوز	2.29 (0.018)	1.92 (0.001)	4.5 (0.016)

كل قيمة هي معدل لثلاث مكررات. أما الأرقام بين قوسين فتمثل الانحراف المعياري (S.D)

المصدر الكربوني CMCالذي أعطى فعالية أنزيمية بلغت 3.28U/ml ومن ثمّ السليوبايوز الذي أعطى فعالية3.01U/mL. بينما أعطت المصادر الكربونية فركتوز، لاكتوز، نشاء وغلوكوز فعالية أنزيمية أقل بلغت (1.92, 2.39, 2.46, 2.98) U/mLعلى التوالي.وهذا يتوافق مع ما توصل إليه [30] إذ أعطى المصدر الكربوني سكروز أعلى إنتاجية من أنزيم البيتا – كلوكوسايديس بوساطة الفطر *T. harzianum*،وتقارب ما حصل عليه [19] عندما استخدم السليوبايوز كمصدر كربوني إذ بلغت فعالية السيللولاز عنده 2.48 U/mL.بينما اختلفت عن النتائج التي توصّل إليها [31] عند دراسة تأثير عدة مصادر كربونية على إنتاج أنزيم السيللولاز باستخدام عزلة الفطر *A.niger*إذ أعطى المصدر الكربوني كاربوكسيمتيل سيللوز أعلى فعالية لإنتاج السيللولاز.

نلاحظ من خلال النتائج على الرغم من أنّ CMC من السكريات المتعددة المحفزة لإنتاج أنزيم السيللولاز إلا أنّه لم يكن المصدر الكربوني الأمثل لإنتاج الأنزيم، ويعود ذلك إلى أنّ ذوبان هذا السكر في الوسط الغذائي يؤدي إلى زيادة لزوجته التي تؤثر سلباً على تهوية الوسط الغذائي وبالتالي صعوبة استغلال مغذيات الوسط من قبل الفطر.

أما لتأثير المصادر الكربونية على إنتاج الكتلة الحيوية للفطر فقد أوضحت نتائج الجدول(3)أنّ إنتاجية الكتلة الحيوية للمصدر الكربوني النشاء كانت الأعلى إذ بلغت 3g/L يليه السكروز بإنتاجية بلغت 2.83 g/L، ثم سكر الفركتوز، السليوبايوز، الغلوكوز وCMCالتي أعطت كتلة حيوية بلغت 1,64, 2.29, 2.36, (2.67) g/Lعلى التوالي، وأقل كتلة حيوية كانت لسكر اللاكتوزو قيمتها1.20g/L.وهذا يتعارض مع ما توصّل إليه[30] عندما أضاف النشاء كمصدر كربوني إلى الوسط الزرعي لفطر *T.harzianum* حيث أعطى كتلة حيوية

بلغت 1.940 g/L .نلاحظ من خلال نتائج الكتلة الحيوية أنه لا يوجد علاقة بين الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية عند إضافة مصادر كربونية مختلفة إلى الوسط الزرعي لفطر *T. harzianum* .

أما بالنسبة للأس الهيدروجيني النهائي فيوضّح الجدول (3) انخفاضاً له عن الأس الهيدروجيني الأولي (6.0) في جميع المصادر الكربونية المدروسة،ويعود السبب لأنّ هذه المصادر تعمل على تحفيز الفطر لإنتاج حموض عضوية في أثناء عملياته الاستقلابية التي تؤدي إلى رفع حموضة الوسط الغذائي.

الاستنتاجات والتوصيات:

a. **عزل ثمانية أنواع فطرية وتعريفها وهي:** *TrichodermaharzianumT.viride, T.longibrachiatum Alternaria alternate, Fusariumsolani Aspergillusniger, Rhizoctoniasolani,* و *Fusariumoxysporum*.

b. كشف قابلية هذه الأنواع لإنتاج أنزيم السيللولاز وتبين أنّ فطر *T. viride* أعطى أعلى إنتاجية على الوسط الصلبCMC– Agar بلغت قيمتها5.16.

c. حددت الفعالية الأنزيمية للأنواع الفطرية وتبين أنّ فطر *T. viride* أعطى أعلى فعالية أنزيمية على وسط مندل الزرعي بلغت 4.39 U/mL.

d. استخدمت مصادر كربونية مختلفة وطبقت على عزلة واحدة تعود إلى النوع *T. harzianum*وأعطى المصدر الكربوني سكروز أعلى فعالية لأنزيم السيللولاز وبلغت 3.87 U/mL.

اعتماداً على نتائج البحث نوصي أن تكون الدراسات القادمة مكملة له وتتعلق بدراسة الشروط المثلى لعمل أنزيم السيللولاز المنتج من قبل الفطور، ودراسة الإنتاج الحيوي للسيللولاز من خلال تنمية الفطور على المخلفات الصناعية السيللوزية. إضافةً إلى دراسة قدرة الفطور على إنتاج أنزيمات أخرى كالأميلاز، الكاتيناز والليباز..... .

المراجع:

1.Eveleigh, D.E.1987,*Cellulase: aperspective*. Philosophicl Transanctions of the Royal Society of London, Seris B-Biological Sciences.321:435-447.

2. Mahmood, k., Wei-jun, Y.;Nazir, K.; Iqbal,R.Z. and Arijo,A. G.2006,*Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium*. J. Zhejiang Univ Science B, 7 (6),459-466.

3. Chlesinger, S.1991, (*Biogeo chemistry: an analysis of globalchange*). Academic,San Diego,p.443.

4. Omojasola, P. F.; jilani, O.P. and Ibiyemi, S.A., 2008,*Cellulase production by some fungi cultured on pineapple wastes*. Nature and Science. 6(2).Issn: 64-78.

5. Wen, Z.; Liao,W. and Chen, S.2005,*Production of Cellulase/ β- glugosidase by the mixed culture Trichodermareesei and Aspergillusphoenicis on daiary manure process Biochemistry* .40:3087-3094.

6. Ariffin, H.; Abdullah,N.;Umikalsom,M.S.;Shirai, Y. and Hassan,M.A.2006,*Production and characterization of cellulose byBacillus pumilus* EB3. Engineering & Technology.3 (1): 47-53

7.دلالي، باسل كامل.1990 ، *موضوعات مختارة في التكنولوجيا الحيوية*. دار الكتب للطباعة والنشر. مطبعة جامعة الموصل.العراق.

8. Beguin,P. and Aubert,J.P.1994,*The biological degradation of cellulose FEMS Microbiol*. Rev.13:25-58.

9. Bhat. m. k.2000,*Cellulose and related enzymes in biotechnology*. Biotech. Adv. 18: 355-383.

10.Tzanov, T.; Andreaus, J.; Guebitz, G. and Paulo, A.2003,*Electronic J. Biotech*. 6,3

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

12. Vllena,G. K. and Gutierrez – Correa, M.2006,*production of cellulose by Aspergillusnigerbofilmsdevelopd on polyester cloth. Letters in Applied Miceobiol*. 43. Issue, 3:262-268.

13. Gonsalves, K. A. and Ferreira, A.S.1993,*Fusariumoxysporum*. Crop Knowledge master, University of Hawii,1-3.

14. Walter, M.; Jaklitsc, G. J.; Sarah, L.; Bing, S. L.2006,*Hypocrearufa / Trichodermaviride: a ressessment, and description of five closely related species with and without warted conidia*. Stud Mycol USA, 56,1: 135-177.

15. Ellis, M.B.1971,*Dematianceoushypomycetes. Common wealth mycological Institute*. kew, surrey, England. 608 pp.

16.Hankin, L.and Anagnostakis,S.L.1977, *Solid media containing carboxy methyl cellulose to detect Cx – cellulose activity of micro – organisms*. J. Gen Microbiol. 98: 109 – 115.

17.Mandels, M. and Strenbery, D.1976,*Recent advances in cellulose technology*. J. Ferment. Technol.54: 267 – 286.

18.Zaldivar, M.; Velasqez, J,C.Contreras, I. and Perez, L. M.2001,*TrichodermaaureovindeT- 121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: Its potential use in waste cellulose degradation and/ or Biocontrol*. Electron. J. Biotechnol,3: 160 – 168.

19. Okagbue, R. N.; Mwenje, T.; Kudange, T.; Siwela, M. and Sibanda,T. 2001,*Isolation of Aureobasidiumpullulans from Zimbabwean sources and glucosidase activities of selected isolates*. South African. J. Botany.67: 157 – 160.

20. Miller. G. L. 1959, Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry.31: 426-428.

21.Shahera,H.A. and Sanna.M.A. 2002. *Biodegradation of agro-industrial orange waste under solid.*

22. Bokhary, H. A. and Parrz, S.1994,*Extracellulae cellulose enzyme production by soil mycoflora in Saudi Arabia*. King saud Univ. vol. 6, Science. 2: 137 -148.

23. Deshpande, S. K.; Bhotmange, M. G.; Chakrabarti,T. and Shastri, P. N.2008,*Production of cellulose and xylanase byTrichodermareesei* (QM 9414) *mutant, Aspergillusnigerand mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (Eichhorniacrassipes)*. Chen, Technol. 15: 449 – 456.

24. Mekala, N. K. and Singhania, R. R.2008,*Cellulase production under solid state fermentation by Trichodermareesei Rut C30: statistical optimization of process parameters*. Appl. Biochem. Biotechnol. 151: 122 – 131.

25. عبد الهادي، شمال يونس. 2011 .*تحديد كفاءة بعض العزلات الفطرية المحلية في إنتاجأنزيم السليوليز*. مجلة تكريت للعلوم الصرفة. مجلد 16. العدد 2 ،167-174.

26. Mangat, M. K. and Mandahr C. L.1998,*Effect of cultural conditions on the production of cellulases by Helminthosporiumteres*. Res. Bull. Punjab University Sci. 46 (1-4): 139 – 145.

27. Ikram- Ul- H.; Muhammad, M. J.;Tehamina, S. K. ;and Zafar, S.2005,*Cotton saccharifying activity of cellulose production by co- culture of Aspergillusniger and Trichodermaviride*. Agriculture waster. 11: 105-113.

28. Khan, M. M. H.;Ali, S.;Razi, A. F. and Alzam,M. Z.2007, *Use of fungi for the bioconversion of rice straw into celulase enzyme*. Environmental Science and Health part b.42:381-386.

29. El- Refai, A.M.H.; Atalla, M. M. and El-Safty,H.A.1984, *Microbial hormation of cellulases and proteins from cellulasic residues.* Agriculture wastes, ,11: 105-113.

30.الصميدعي، طه عبد الوهاب.2008، *تأثير فترات مختلفة من التحضين ومصادر كربونية مختلفة في انتاج أنزيم بيتا–كلوكوسايديس بوساطة عزلة محلية للفطر Trichodermaharzianum* . مجلة تكريت للعلوم الصرفة. مجلد 13. العدد 33, 2– 37.

31.Narasimha,G.; Sridevi, A.; Buddolla, V.;Subhosh, C.M. and Rajasekhar, R.B. 2006. *Nutrient effects on production of cellulytic enzymes by Aspergillusniger*.Biotechnol. 5(5): 472-476.