مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (4) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (4) 2015

مقارنة بين الظروف المثلى لإنتاج أنزيم السيلّولاز من العزلتين الفطريتين المحليتين *T.harzianum* و*A. alternate*

الدكتورة سـناء سـارة*

(تاريخ الإيداع 17 / 5 / 2015. قبل للنشر في 9 / 8 / 2015)

□ ملخّص □

تمّ الكشف عن قابلية العزلتين الفطريتين المحليتين *Trichoderma harzianum* و *Alternaria alternate*، المعزولتين من المحيط الجذري لنبات القمح *Triticum aestivum L.*، لإنتاج أنزيم السيلّولاز في الأوساط الصلبة CMC-Agar. فلوحظ أنّ للفطرين قابلية لإنتاج الأنزيم، وتفوق الفطر *T.harzianum* في إنتاجه للسيلّولاز على الفطر *A.alternate*. ثمّ أجريّ اختبار كمي باستخدام وسط مندل السائل لتحديد الظروف المثلى من (فترة حضن، درجة حرارة وpH) لأفضل إنتاج للسيلّولاز من الفطرين. فكانت أفضل ظروف لإنتاجه من الفطر *T.harzianum* هي 7 أيام حضن (3.97 U/mL) ، درجة حرارة 26°C (4.07 U/mL) و pH=5.5 (4.19U/mL)، بينما أفضل ظروف لإنتاج السيلّولاز من الفطر *A.alternate* هي 8 أيام حضن(3.29U/mL)، درجة حرارة 28°C (3.15 U/mL) و pH=5.0 (3.86 U/mL). وتبين من المقارنة بين متوسطات الفعالية الأنزيمية لكلا الفطرين تفوّق الفطر *T.harzianum* بإنتاجه للسيلّولاز على الفطر *A.alternate* ، كما وتبين أنّ تأثير زمن الحضن على إنتاج السيلّولاز من الفطر *T.harzianum* أكبر من تأثيره على إنتاجه من الفطر *A.alternate*، في حين تأثير كل من درجة الحرارة ودرجة pH على إنتاج السيلّولاز من الفطر *T.harzianum* أقل من تأثيرهما على إنتاجه من الفطر *A.alternate*.

الكلمات المفتاحية: *Alternaria alternate ,Trichoderma harzianum , Cellulase*

*مدرسة - قسم علم الحياة الحيوانية - كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية- سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (4) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (4) 2015

A comparison of the optimal conditions for the cellulase production by local fungal isolates T.harzianum and A.alternate

Dr. Sanaa Sara*

(Received 17 / 5 / 2015. Accepted 9 / 8 /2015)

□ ABSTRACT □

It was detected for the ability of a local fungus *T.harzianum* and *A.alternate* which was isolated from the rhizosphere of Wheat plant *Triticum aestivum L.* to produce the enzyme complex cellulase in solid medium (CMC-Agar). So it has been showed that *T.harzianum* and *A.alternate* have an ability to produce this enzyme, While the *T.harzianum* have higher production of cellulase than *A.alternate*. Then conducted a quantitative test using Mandelium liquid medium is used to determine the optimal conditions (incubation time, temperature, PH) for the best cellulase production of the two fungus studied. It was, the best conditions for its production, from *T.harzianum* is 7 days inchubation (3.97 U/mL), temperature 26°C (4.07 U/mL) and pH=5.5 (4.19U/mL). While the best conditions for its production from *A.alternate* is 8 days inchubation (3.29U/mL), temperature 28°C (3.15 U/mL) and pH=5.0 (3.86 U/mL). The comparison between the enzymatic activity average for both fungus، was showed superiority *T.harzianum* by production cellulase than fungus *A.alternate*. And discern that the effect of the incubation time on cellulase production from fungus *T.harzianum* more than its effect on cellulase production from fungus *A.alternate*. While effect of pH and temperature on cellulase production from fungus *T.harzianum* less than their effect on cellulase production from fungus *A.alternate*.

key words: *Alternaria alternate* ,*Trichoderma harzianum* , Cellulase

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

مقدمة:

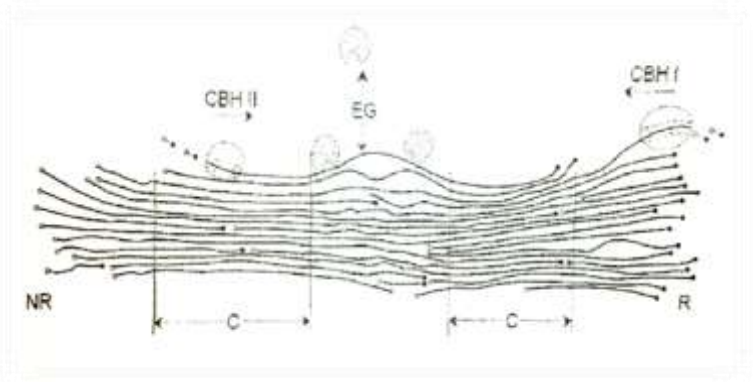
السيللوز Cellulose أحد المركبات العضوية الأكثر وفرة في الطبيعة، ويكوّن حوالي(15–60) % من مكونات الجدار الخلوي للنباتات فيكسبها الشكل والقساوة [1]، وتُنتج النباتات سنوياً بعملية التركيب الضوئي حوالي 10^{10} طن من السيللوز تتراكم بعضها دون استخدام مسبباً مشاكل بيئية كثيرة [2]. يتكون السيللوز من عدة آلاف من جزيئات السكر البسيط D – غلوكوبيرانوز، المرتبطة بروابط غليكوزيدية من نمط (4 1) β، ويعد السيللوز مقاوماً نسبياً للتحلل المائي وأغلب المحلات العضوية، وهذا يدل على صعوبة الحصول على سكر الغلوكوز منه إلا بوجود الأنزيم Enzyme القادر على تحليله[3]. وهنا برز الدور الهام للكائنات الدقيقة كالفطور والبكتيريا الغنية بأنزيمات متنوعة، كأحد الحلول لتفكيك السيللوز وتحويله إلى سكاريدات Saccharides بسيطة يسهل استخدامها في العديد من التخمرات الصناعية لإنتاج مواد ذات قيمة اقتصادية عالية [4]. وتعود قدرة الكائنات الدقيقة على تحليل مادة السيللوز إلى إنتاج أنزيم السيلّولاز Cellulase الذي يفكك الروابط الغليكوزيدية للسيللوز محرراً غليكوز بسيط، الذي يعد عنصر هام للخلايا ومصدر أساسي للطاقة، وسهل التمثيل من قبل مختلف الكائنات الدقيقة المستخدمة في الصناعات الكيميائية والطبية والغذائية كإنتاج الكحول والحموض العضوية والمضادات الحيوية وإنتاج الأغذية الحيوانية [5]. ويعد أنزيم السيلّولاز معقد أنزيمي متكامل مكوّن من ثلاث أنزيمات تساهم مجتمعة على حلمهة السيللوز عن طريق تحطيم الروابط الغليكوزيدية (4 1) β وهي:

1 إندوغلوكاناز Endo glucanase .

2 إكزوغلوكاناز Exo glucanase ، الذي يتضمّن: سيلوبيوهيدرولاز Cellobiohydrolase وغلوكوز غلوكونوهيدرولاز glucose gluconohydrolase.

3 غلوكوزيداز Glucosidase [6].

لقد فسّرت العديد من النظريات آلية التحلل السيللوزي من خلال العمل التعاوني والتعاقبي للأنزيمات الثلاث، السابقة الذكر، لإكمال تحليل السيللوز إلى سكاريدات بسيطة. حيث أكّدت آخر النظريات [5] على أنّ أنزيم endo–gluccanase يقوم بفك الروابط الداخلية للسيللوز محولاً البوليمر إلى سلاسل تتضمن نوعين من النهايات، منها المختزلة ومنها غير المختزلة. بينما تعمل أنزيمات exo–glucanase على المناطق البلورية للسيللوز وعلى نهايات السلاسل محررة سكاريدات ثنائية، حيث يحرر أنزيم Cellobiohydrolase السيلوبيوز Cellobiose من النهايات المختزلة، بينما gluconohydrolase glucose يحرر السيلوبيوز من النهايات غير المختزلة كما هو موضّح في الشكل (1). وأخيراً يحفّز أنزيم Glucosidase – β تحول السيلوبيوز إلى غلوكوز.



الشكل (1): سلاسل السيللوز وآلية تأثير Exo – glucanase عليها. حيث يشير الحرف:
C – إلى المناطق البلورية للسيللوز. R – إلى النهايات المختزلة. NR– إلى النهايات غير المختزلة.

تنتج العديد من الجراثيم Bacteria مثل *Bacillus* و *Streptomyces* أنزيم السيلّولاز [4]، ولكن تعّد الفطور الكائنات المجهرية الدقيقة الرئيسة المنتجة لأنزيم السيلّولاز وخاصةً جنس *Trichoderma* [7]، ولقد درس إنتاجه من هذا الجنس بشكل موسع نظراً إلى أنّ السيلّولاز المنتج بوساطة هذا الفطر ذو فعالية عالية تفوق فعالية السيلّولاز المنتج من مصادر جرثومية بنحو مئة ضعف [8]. وهناك العديد من الدراسات حول إنتاج السيلّولاز من الفطور باستخدام أنواع مختلفة من المخلفات النباتية والصناعية مثل قشور الرز، دقيق فول الصويا، تفل التفاح، بقايا الخشب ... وغيرها من المخلفات الصناعية الرخيصة الثمن والتي تسهم في خفض تكاليف إنتاج هذا الأنزيم [9]. ويعد نمو الفطور والجراثيم المنتجة لأنزيم السيلّولاز على المخلفات الصناعية والزراعية وتحويلها إلى مواد ذات فائدة حيوية من أهم الحلول للتخلص من التلوّث البيئي السيللوزي، بالإضافة إلى ذلك فإنّ تحويل السيللوز إلى سكاريدات بسيطة بطريقة التخمر باستخدام أنزيمات السيلّولاز المُنتجة من الأحياء الدقيقة من المقترحات المهمة لإنتاج الوقود البديل (الايتانول)[10]. ونظراً للأهمية الاقتصادية للسيلّولاز التي تنتجه الكائنات الدقيقة مثل الفطور التابعة للأجناس *Trichoderma, Aspergillus , Cladosporium* [11]، لذا توجهت الأنظار لتنميتها واستخدامها في مجالات عدة.

أهمية البحث وأهدافه:

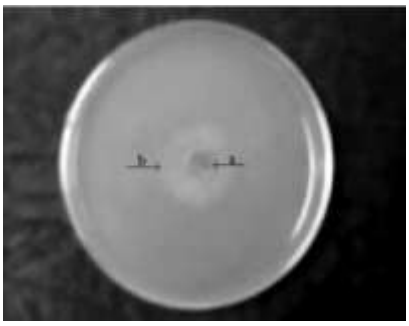
تنبع أهمية البحث في أنه يسلط الضوء على دور الفطور في إنتاج أنزيم السيلّولاز، أما الهدف فهو تحديد كفاءة أنزيم السيلّولاز المنتج من الفطرين المحليين *T.harzianum* و *A. Alternate* المعزولين من المحيط الجذري لنبات القمح *Triticum aestivum L.* وتحديد الظروف المثلى من (فترة الحضن، درجة الحرارة ودرجة الحموضة) لأفضل إنتاجية لـلسيلّولاز من النوعين الفطريين المدروسين، ودراسة تأثيرها على فعالية السيّلولاز المنتج من النوعين *T.harzianum* و *A.alternate*.

طرائق البحث ومواده:

1) الحصول على العزلات الفطرية: تمّ الحصول على العزلتين الفطريتين *T.harzianum* و *A.alternate* من مخبر البحث العلمي في كلية العلوم – قسم النبات/جامعة تشرين. عزلت العينات الفطرية من المحيط الجذري

لنبات القمح *Triticum aestivum L.* على عمق 5- 10 cm. حفظت عينة نقية لكل منهما ضمن أنبوب اختبار بشكل مائل في البراد عند درجة حرارة 4°C، وتمّ تجديد العينات كل أسبوعين للمحافظة على حيوية الفطور وفعاليتها.

2) تحضير وسط الاستنبات الخاص بالكشف عن النشاط الأنزيمي للسيلّولاز: أجري اختبار نوعي باستخدام الوسط الصلب الخاص بالكشف عن قابلية الفطور لإنتاج أنزيم السيلّولاز، حيث استخدم وسط آغار كاربوكسي متيل سيللوز Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC-Agar)، والذي يتكون من المواد الآتية (غ/ لتر من الماء المقطر) [12]: 10.0 CMC – Na Salt ,0.5 $MgSO_4$.$7H_2O$, 20.0 Agar , 1.0 K_2HPO_4 , , 2.0 $NaNO_3$ 0.01 $FeSO_4$, 0.5 KCl . حضرّ الوسط بإذابة جميع المواد في الماء المقطر باستثناء CMC-Na Salt (أضيف تدريجياً مع المزج والتسخين حتى تجانس الوسط)، وضبط pH الوسط عند الدرجة 6.0، وجرى التعقيم بجهاز Autoclave عند الدرجة 121°C لمدة 15 دقيقة، ثم برّد إلى الدرجة 45°C ووزع في أطباق بتري معقمة، وتركت الأطباق حتى التصلب، وذلك بواقع ثلاث مكررات لكل عينة. ثم أضيف لكل طبق قرص من المستعمرة الفطرية المدروسة بقطر 5mm وبعمر أسبوع، وحضنت الأطباق عند الدرجة 28±1°C وتم مراقبتها يومياً حتى اليوم الخامس، بعدها سحبت الأطباق من الحاضنة. وللاستدلال على إنتاج أنزيم السيلّولاز أضيف إلى الأطباق محلول يود- حمض كلور الماء HCl – Iodine solution، المحضر بمزج 100 ml من HCl (0.1 N) و 500 ml من اليود 1% ويود البوتاسيوم 2%، وتركت مدة 10 دقائق [13] ثمّ سكب عنها المحلول. وتمّ الكشف عن قابلية الفطر لإنتاج أنزيم السيلّولاز بدلالة قطر الهالة المتكونة حول المستعمرة الفطرية النامية (الشكل 2)، الأمر الذي يشير إلى تحلل الـ CMC-Agar بوساطة إنزيم السيلّولاز المفرز إلى الوسط الصلب. قيس قطر الهالة المتكوّنة حول المستعمرة الفطرية لكل منها.



شكل (2): الكشف عن انتاج أنزيم السيلّولاز بوساطة عزلة فطرية في الوسط الصلب
a - قطر مستعمرة الفطر. b- قطر هالة التحلل.

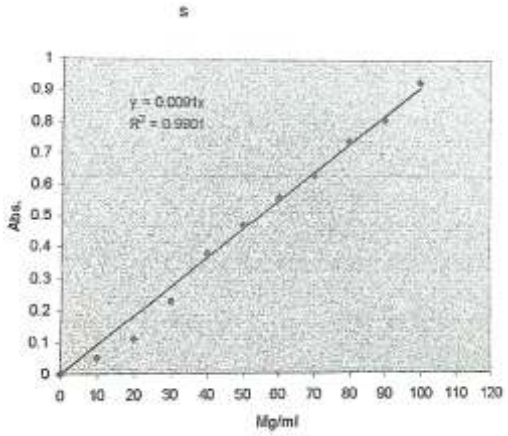
3) تحضير وسط الاستنبات الخاص بالإنتاج: يتكون الوسط من المواد الآتية (غ/لتر من الماء المقطر) [14]: 10.0 Cellulose , 2.0 $KH2PO_4$, 1.4 $(NH_4)_2SO_4$, 0.3 $MgSO_4$.$7H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$,0.005 $CaCl_2$, 0.3 $CoCl_2$, 0.002 $ZnSO_4.H_2O$, 0.0014 Pepton , 1.0 Urea , 0.3 . تم إذابة جميع مكونات الوسط في الماء المقطر المعقم باستثناء اليوريا Urea، وضبط pH الوسط عند الدرجة 6.0 أو بحسب القيم المدروسة (من 4.0 – 7.0 بفارق نصف درجة)، وزع الوسط المحضّر في أرلينات حجم 250 mL بواقع 50 mL في كل أرلينة، سدت الأرلينات بإحكام بسدادات قطنية ثم غلفت بأوراق الألمنيوم وعقمت تحت نفس الظروف السابقة الذكر. وبعد إتمام عملية التعقيم أضيف اليوريا المعقم بالبسترة إلى الأرلينات تحت ظروف معقمة. لقحت

محتويات كل أرلينة بقرص من مستعمرة الفطر بقطر 5mm وبعمر أسبوع [15]. حضنت الدوارق بعد التلقيح في الحاضنة الهزازة عند الدرجة 28±1°C بمعدل 150 هزّة/دقيقة، ثم سحبت الأرلينات من الحاضنة بحسب فترات الحضن (من اليوم الثالث وحتى اليوم الثاني عشر) وقيست درجة pH النهائيّ لكل أرلينة، ثمّ فصلت الكتلة الحيوية عن المستخلص الأنزيمي بترشيح محتوى كل أرلينة من الوسط الغذائي باستخدام أوراق ترشيح من نوع Whatman No. (1) مجففة وموزونة مسبقاً ومثبتة على قمع بوخنر Bauchner Funel مجهز بمفرغ هوائي كهربائي، وبعد انتهاء عملية الترشيح جففت أوراق الترشيح الحاملة للكتلة الحيوية في فرن كهربائي عند الدرجة 70°C لمدة 24 ساعة، ومن ثمّ قيست الكتلة الحيوية بحساب فارق الوزنين باستخدام ميزان حساس. ترك الراشح المحتوي على الأنزيم جانباً لقياس الفعالية الأنزيمية للفطر، وفي حال عدم استخدامه مباشرةً، أضيف للراشح بنزوات الصوديوم (1g/L) لإيقاف نمو الفطور، وحفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 4°C لحين الاستخدام [16].

4) قياس الفعالية الأنزيمية باستخدام المطياف الضوئي Spectrophotometer: قيست فعالية السيلّولاز اعتماداً على قياس أحد نواتج التفاعل وهو الغلوكوز D – glucose المتحرر من ورقة الترشيح حسب طريقة Filter Paper Assay [14]. تمّ قياس فعالية هذا الأنزيم بأخذ 0.5 mL من الرشاحة في أنبوب اختبار وأضيف إليها 1 mL من المحلول المنظم Na – Citrate Buffer (0.05 N) و pH = 4.8، وغمر بالمزيج أشرطة من ورق الترشيح (Whatman No. 1) قياس 1x6 cm ووزن 50 mg، بشكل يؤدي إلى غمر الورقة في المحلول. حضنت الأنابيب في حمام مائي عند درجة حرارة 50°C ولمدة ساعة واحدة ، بعدها أضيف لكل أنبوب اختبار 3mL من كاشف Dinitro Salicylic acid (DNSA) المحضر بطريقة Miller [17]، ثم وضعت في حمام مائي بدرجة الغليان مدة 5 دقائق لإيقاف التفاعل، ومن ثمّ برّدت في حمام ثلجي إلى درجة حرارة المختبر. أخيراً قيست كمية الغلوكوز المتحرر باستخدام جهاز المطياف الضوئي من نوع (UV–1700)، وحضّر الشاهد Blank مع التجربة بنفس التراكيب ولكن بدون ورقة الترشيح (مادة التفاعل) وذلك للمقارنة. وتمّ القياس بوضع 2.5mL ماء مقطر في خلية المطياف الضوئي وأضيف إليها 200 µL من العينة المراد قياس امتصاصها، ومزجت جيداً حتى تجانس اللون وقيست الامتصاصية على طول الموجة 550 nm بعد ضبط صفر الجهاز على الشاهد. حدد تركيز الغلوكوز المتحرر ومن ثمّ الفعالية الأنزيمية عن طريق المنحني القياسي للغلوكوز النقي glucose standard curve (المحضّر بنفس الطريقة السابقة الذكر). ولرسم المنحني القياسي للغلوكوز حضّر (100 mg/100 mL) من محلول الغلوكوز النقي، وحضرت منه التراكيز الآتية: (10,20,30,40,50,60,70,80,90,100) µg/mL بطريقة التخفيف باستخدام الماء المقطر. أخذ 1mL من كل تركيز في أنبوب اختبار وأضيف إليه 3 mL من كاشف DNSA ومددت بالماء المقطر، ومن ثمّ سخنت لدرجة الغليان لمدة 10 دقائق، ثم بردت إلى درجة حرارة المختبر وسجلت الامتصاصية لكل تركيز على انفراد عند طول الموجة 550 nm ورسم المنحني القياسي لتراكيز الغلوكوز (الشكل 3). تمّ حساب تركيز الغلوكوز مقدراً بالملي غرام من العلاقة:

$$C_E = (\text{امتصاصية المحلول المراد فحصه}/\text{امتصاصية الشاهد}) \times (\text{تركيز الشاهد}/\text{الحجم الفعلي المستخدم من العينة}) \times 100$$

وتمّ تحديد فعالية أنزيم السيلّولاز بالواحدة الأنزيمية Unit التي يرمز لها بالحرف U، وهي كمية الأنزيم التي تحرر 1 ميكرومول من سكر الغلوكوز البسيط خلال دقيقة واحد وتحت ظروف طريقة العمل.



الشكل (3): المنحني القياسي للغلوكوز

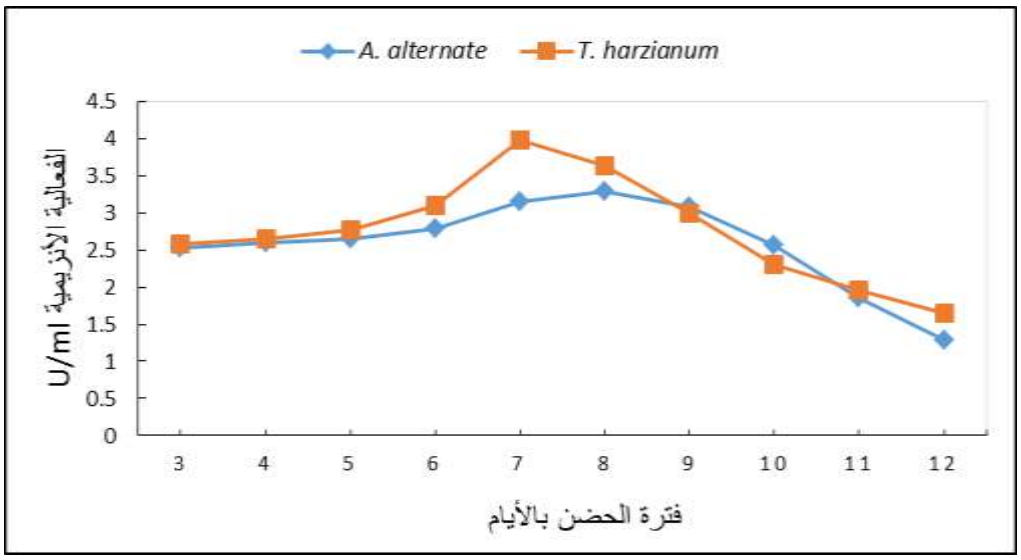
تمّ استخدام البرنامج الاحصائي *spss* (الحزم الإحصائية للعلوم الاجتماعية) من أجل التحليل وإجراء الاختبارات الضرورية، حيث تم إجراء تحليل التباين الأحادي One way anova للمقارنة بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية ودرجة حموضة الوسط pH النهائية. وتمّ إجراء اختبار ستودنت t.test للمقارنة بين متوسطات الفعالية الأنزيمية للنوعين الفطريين المدروسين، أما لدراسة الارتباط بين الفعالية الأنزيمية للفطرين المدروسين و كل من عامل الزمن، درجة الحرارة ودرجة pH فقد استخدمنا طريقة المربعات الصغرى لاستنتاج المعادلة التي تربط بين الفعالية الأنزيمية والعوامل المذكورة.

نفذ البحث في مخابر كلية العلوم ومعهد البيئة / جامعة تشرين، في الفترة الواقعة بين 2014/4/15 و2014/10/15.

النتائج والمناقشة:

استخدمت طريقة الأوساط الصلبة لتحديد كفاءة الفطرين *T.harzianum* و *A.alternate* في إنتاج أنزيم السيلّولاز، حيث استخدم الوسط الزرعي المحتوي على آغار كربوكسي ميتيل سيللوز (CMC–Agar). فتبين بأنّ كل من الفطرين المدروسين قد أعطيا نتائج إيجابية لإنتاج السيلّولاز، بدلالة ظهور هالة حول المستعمرة الفطرية لكل منهما (استناداً إلى الشكل 2) بدءاً من اليوم الثاني من الحضن دليلاً على حلمهة مادة كاربوكسي متيل سيللوز وتحويلها إلى سكاريدات بسيطة بوساطة أنزيم السيلّولاز المنتج من الفطرين، واستمرّ ازدياد قطر هالة التحلل باستمرار فترة الحضن حتى اليوم الخامس، حيث بلغ قطر الهالة حول المستعمرة الفطرية لـ *T.harzianum* (4.4 cm)، بينما بلغت حول المستعمرة الفطرية *A.alternate* (3.5 cm). ونلاحظ من خلال النتائج تفوّق الفطر *T. harzianum* في إنتاج هـ للسيلّولاز على الفطر *A.alternate*. إنّ نتائجنا تتطابق مع [18] بأنّ الفطور التابعة لجنس *Trichoderma* هي من أكثر الفطور إنتاجاً لأنزيم السيلّولاز . أما التباين في قدرة النوعين الفطريين على إنتاج أنزيم السيلّولاز يعود لعدة أسباب هي: إما أن تكون فترة الحضن غير كافية لتحفيز الفطر على إنتاج الأنزيم، أو لعدم قدرته على استغلال وسط الاستنبات، أو لعدم ملائمة pH الوسط الزرعي [19]. بالإضافة إلى أنّ فعالية إنتاج أنزيم السيلّولاز من قبل الفطور تتباين باختلاف السلالات المختلفة [20].

تأثير فترة الحضن على مستوى إنتاج أنزيم السيلّولاز: استخدمنا الوسط الزرعي الخاص بالإنتاج لتنمية الفطور، ودرسنا تأثير فترات مختلفة من الحضن، تراوحت من (3 – 12) يوم بدرجة حرارة 28±1°C و pH=6.0، على مستوى إنتاج أنزيم السيلّولاز من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternate*، وحددت فعالية أنزيم السيلّولاز المنتج، التي تدّل على مستوى إنتاج الأنزيم، من كلا النوعين الفطريين المدروسين. فأظهرت نتائج دراسة الفعالية الأنزيمية بأنّ لكل فطر فترة حضانة مثالية لإنتاج أنزيم السيلّولاز تختلف عن الآخر (المخطط 1)، إذ لوحظ من الجدول(1) زيادة في فعالية أنزيم السيلّولاز المنتج من الفطر *T.harzianum* بدءاً من اليوم الثالث للحضن لتصل أقصاها في اليوم السابع منه بفعالية أنزيمية بلغت (3.97 U/mL)، والتي تعكس أفضل إنتاجية لإنزيم السيلّولاز من الفطر *T.harzianum* . بعدها انخفضت فعالية الأنزيم مع ازدياد عدد أيام الحضن لتصل أدناها في اليوم الثاني عشر بفعالية أنزيمية (1.65 U/mL). بينما كان اليوم الثامن من الحضن هو الأمثل لرفع كفاءة الفطر *A.alternate* لأفضل إنتاجية للسيلّولاز إذ بلغت فعاليتة في اليوم الثامن من الحضن (3.29 U/mL)، وانخفضت إلى أدناها في اليوم الثاني عشر (1.28 U/mL) وهذا يؤكد بأنّ فترة الحضن المثالية لرفع مستوى إنتاج السيلّولاز تختلف باختلاف نوع العزلة الفطرية، كما وأنّ تباين العزلات الفطرية في كفاءتها وإنتاجها للأنزيمات تختلف باختلاف ظروف التخمر وعوامل النمو المختلفة [21]. وتعد إنتاجية أنزيم السيلّولاز من النوعين الفطريين المدروسين جيدة مقارنةً مع ما تمّ الحصول عليه من قبل عدد من الباحثين، فقد ذكر [15] أنّ العزلة الأبوية *للفطر T.aureoviridia* قد أعطت فعالية أنزيمية من غلوكوزيداز *Glucosidase* بلغت 1.25U/mL، بينما أعطت نفس العزلة بعد إجراء طفرة كيميائية عليها 4.9 U/mL. وتعارضت نتائجنا من حيث مدّة الحضن المناسبة للحصول على أعلى فعالية من السيلّولاز مع [22]، حيث بيّن أنّ الفعالية الأنزيمية القصوى رافقت استخدام 4 أيام تخمير لإنتاج السيلّولاز من الفطر *T.viride* .



المخطط (1): تأثير فترة الحضن على فعالية أنزيم السيلّولاز المنتج من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternate*

الجدول (1): تأثير فترات مختلفة من الحضن بدرجة حرارة 28±1°C و pH=6.0 على مستوى إنتاج أنزيم السيلّولاز من النوعين الفطريين*T.harzianum* و *A.alternate* المعزولين من المحيط الجذري لنبات القمح

فترة الحضن بالأيام	أنزيم السيللولاز المنتج من الفطر *T.harzianum*			أنزيم السيللولاز المنتج من الفطر *A.alternate*		
	الكتلة الحيوية g/L	الفعالية الأنزيمية U/ml	درجة pH النهائية	الكتلة الحيوية g/L	الفعالية الأنزيمية U/ml	درجة pH النهائية
3	g9.37±0.16	d2.58±0.07	f6.32±0.02	j9.89±0.03	c2.52±0.03	h 6.33±0.04
4	f8.89±0.26	de2.64±0.03	ef6.23±0.03	i9.16±0.09	de2.59±0.02	g 6.19±0.03
5	e7.91±0.29	e2.76±0.04	e6.13±0.03	h8.03±0.05	e2.65±0.03	f 6.12±0.03
6	D7.64±0.17	f3.10±0.06	d5.97±0.04	g7.16±0.04	f2.79±0.06	e 5.87±0.05
7	c7.54±0.21	h3.97±0.06	c5.27±0.14	f6.22±0.03	h3.15±0.04	d 5.57±0.03
8	B6.14±0.17	g3.63±0.05	c5.26±0.07	e6.05±0.04	i3.29±0.02	cd5.56±0.03
9	b5.56±0.13	f2.99±0.08	bc5.22±0.03	d5.63±0.03	g3.07±0.04	c 5.51±0.05
10	b4.97±0.12	c2.31±0.04	abc5.19±0.02	c5.10±0.03	cd2.56±0.06	bc5.50±0.04
11	b4.86±0.19	b1.96±0.07	ab5.15±0.03	b4.86±0.06	b1.85±0.03	ab5.43±0.03
12	a4.19±0.16	a1.65±0.19	a5.09±0.09	a3.98±0.08	a1.28±0.04	a 5.44±0.02
F	270.39	231.89	218.41	4349.18	773.13	306.29
P–value	*0	*0	*0	*0	*0	*0

يدل كل متوسطين لهما حرف مشترك في العمود نفسه على عدم وجود فرق معنوي بينهما.

حيث أنّ: F – قيمة إحصاء فيشر، P–Value – المعنوية، n.s – يدل على عدم وجود فرق معنوي. *– يدل على وجود فرق معنوي.

أما إنتاجية الكتلة الحيوية والتي تعكس نمو الفطور في أوساط الاستنبات، بلغت أقصاها في اليوم الثالث من الحضن (9.37 g/L) للفطر *T.harzianum* و (9.89 g/L) للفطر *A.alternate* ، ثم تدرجت بالنقصان مع استمرار فترة الحضن لتصل أدناها في اليوم الأخير (الجدول 1). وهذا يدل على أنّ ثلاث أيام حضن هي فترة كافية لنمو الخيوط الفطرية ولتعطي أقصى إنتاجية من الكتلة الحيوية، وأنّ تدرج انخفاض الكتلة الحيوية مع استمرار الحضن دليل على استهلاك المغذيات وازدياد مواد الأيض التي تؤدي لموت الخلايا وتحللها. وتعد إنتاجية هذين النوعين

الفطريين المدروسين جيدة نسبياً مقارنةً مع [23] عندما استخدم فطر *T.reesi* . كما ويتضح من الجدول (1) ارتفاع درجة حموضة الوسط pH النهائية بشكل طفيف في الأيام الثلاث الأولى من الحضن لينخفض بعد ذلك عن الأولي (6.0) ليصل أدناه في اليوم الثاني عشر لكل من النوعين الفطريين المدروسين. إن ارتفاع درجة حموضة الوسط في الأيام الأولى يعود إلى تحرير شوارد الهيدروكسيل OH نتيجة العمليات الاستقلابية والنمو، بينما انخفاض ه مع استمرار فترة الحضن فهو من المألوف في التخمرات الصناعية التي تستخدم فيها أوساط تركيبية، وترجع لإفراز بعض الحموض العضوية إلى وسط التخمر نتيجة نشاط الفطور في إنتاج السيلّولاز [14].

ولوحظ وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية ($P<0.05$) بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية، الفعالية الأنزيمية ودرجة pH النهائية لكلا النوعين الفطريين (الجدول 1) وذلك ما بين فترات الحضن المدروسة عند مستوى معنوية 5%. وتبين من اختبار ستودنت t.test بأنّ فترات الحضن التي تشابهت خلالها الفعالية الأنزيمية للفطرين هي الأيام (11,9,4,3) ($P>0.05$)، بينما اختلفت في باقي الأيام ($P<0.05$) كما هو موضح في الجدول (2) ، مع الملاحظة أنّ متوسط الفعالية الأنزيمية للفطر *T.harzianum* في أماكن الاختلاف كانت أعلى من متوسط الفعالية الأنزيمية للفطر *A.alternate* في أغلب فترات الحضن، وهذا يدل على تفوق فعالية السيلّولاز المنتج من الفطر *T.harzianum* على فعالية السيلّولاز المنتج من الفطر *A.alternate*.

ومن خلال دراسة الارتباط بين عامل الزمن والفعالية الأنزيمية لكل فطر كما هو موضح بالمعادلتين:

عامل الزمن والفعالية الأنزيمية للفطر *T. harzianum*: $U_1 = 13.83 - 1.59t + 0.068t^2$

عامل الزمن والفعالية الأنزيمية للفطر *A.alternate*: $U_1 = 0.213 + 0.867t - 0.064t^2$

ومن حساب معامل التحديد تبيّن أنّ تأثير زمن الحضن على إنتاج السيلّولاز من الفطر *T.harzianum* أعلى (97.2%) من تأثيره على إنتاج السيلّولاز من الفطر *A.alternate* (87.1%).

جدول (2): المقارنة بين الفعالية الأنزيمية للسيلّولاز المنتج من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternate* خلال فترات مختلفة من الحضن

فترة الحضن بالأيام	فعالية السيلّولاز المنتج من *T.harzianum* U/ml	فعالية السيلّولاز المنتج من *A.alternate* U/ml	فرق المتوسطات	t.test	P-value
3	2.58±0.07	2.52±0.03	0.06	1.50	n.s0.21
4	2.64±0.03	2.59±0.02	0.05	2.21	n.s0.09
5	2.76±0.04	2.65±0.03	0.11	4.00	*0.02
6	3.10±0.06	2.79±0.06	0.31	6.34	*0.00
7	3.97±0.06	3.15±0.04	0.82	19.15	*0.00
8	3.63±0.05	3.29±0.02	0.34	11.78	*0.00
9	2.99±0.08	3.07±0.04	0.08	1.62	n.s0.18
10	2.31±0.04	2.56±0.06	0.25	6.27	*0.00
11	1.96±0.07	1.85±0.03	0.11	2.36	n.s0.08
12	1.65±0.19	1.28±0.04	0.38	3.42	*0.03

حيث أنّ: n.s – يدل على عدم وجود فرق معنوي. * – يدل على وجود فرق معنوي.

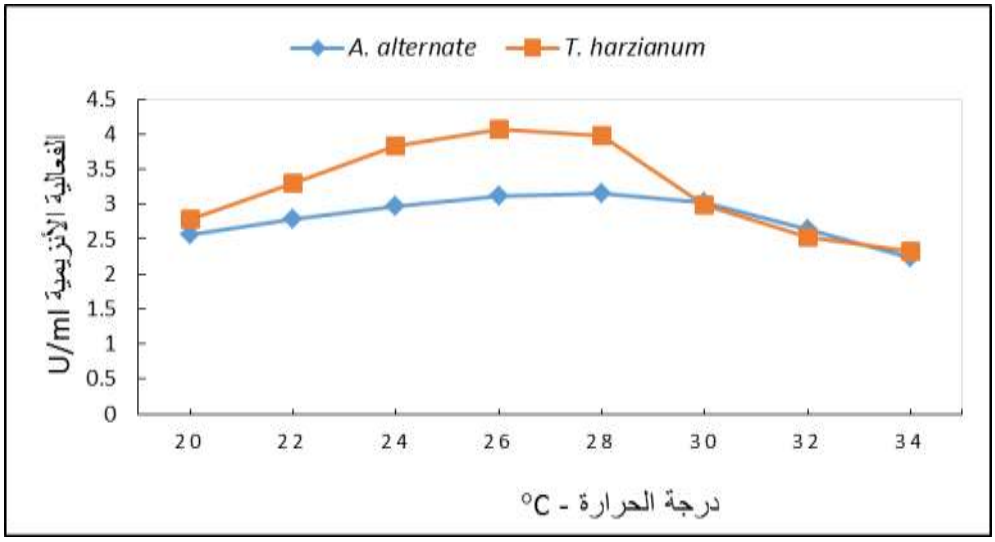
تأثير درجة الحرارة على إنتاج أنزيم السيلّولاز : درسنا تأثير درجة حرارة حضن وسط إنتاج السيلّولاز لكل من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternate* ضمن مجال يتراوح من 20°C إلى 34°C بفارق درجتين بعد سبعة أيام من الحضن ودرجة pH=6. وأظهرت نتائج الدراسة بأنّ لكل فطر درجة حرارة حضن مثالية لأفضل إنتاجية من السيلّولاز تختلف عن الآخر (المخطط 2)، ويتضح من خلال نتائج الجدول (3) ازدياد الفعالية الأنزيمية تدريجياً بازدياد درجة حرارة الحضن حتى الدرجة 26°C للسيلّولاز المنتج من الفطر *T.harzianum* والتي بلغت عندها فعالية السيلّولاز أقصاها (4.07U/mL) والكتلة الحيوية أعلاها (7.86g/L). أما بالنسبة للفطر *A.alternate* فقد ازدادت الفعالية الأنزيمية تدريجياً بازدياد درجة حرارة الحضن حتى الدرجة 28°C إذ تحققت أعلى فعالية أنزيمية (3.15 U/mL) وأعلى كتلة حيوية (6.22g/L). ومع استمرار ارتفاع درجة حرارة الحضن لكلا النوعين الفطريين انخفضت الفعالية الأنزيمية دلالة على انخفاض إنتاجية الفطرين للسيلّولاز، كما وانخفضت الكتلة الحيوية للفطرين المدروسين. أما بالنسبة لدرجة pH النهائية فقد انخفضت عن الأولية (pH=6.0). وهذه النتيجة تتعارض مع [24]، حيث درس تأثير درجات حرارة مختلفة على فعالية أنزيم السيّلولاز ووجد أنّ درجة الحرارة المثلى لإنتاج أنزيم السيلّولاز من الفطور باستخدام التبن كركيزة هي 30°C.

وتبين وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية للسيلّولاز المنتج من كلا النوعين الفطريين المدروسين، وكذلك بين متوسطات درجة pH النهائية للسيلّولاز المنتج من الفطر *A.alternate* (P<0.05)، بينما لا توجد أي فروق معنوية بين متوسطات درجة pH النهائيّ للسيلّولاز المنتج من الفطر *T.harzianum* (P>0.05)، وذلك ما بين درجات الحرارة المدروسة عند مستوى معنوية 5% (الجدول3). ولوحظ من اختبار t.test أنّ درجات الحرارة التي تشابهت خلالها فعالية السيلّولاز لكلا الفطرين المدروسين هي الدرجة 28°C (P>0.05) أما في باقي الدرجات فقد اختلفت (P<0.05) كما هو موضّح في الجدول (4)، مع الملاحظة أنّ متوسط فعالية أنزيم السيلّولاز المنتج من الفطر *T.harzianum* في أماكن الاختلاف كانت أعلى من متوسط فعالية السيلّولاز المنتج من الفطر *A.alternate* في جميع الدرجات المدروسة باستثناء الدرجتين 30°C و32°C. ومن خلال دراسة الارتباط بين درجة الحرارة والفعالية الأنزيمية لكل فطر كما هو موضح بالمعادلتين:

عامل درجة الحرارة والفعالية الأنزيمية للفطر *T. harzianum*: $U_1 = -10.62 + 1.12C - 0.022C^2$

عامل درجة الحرارة والفعالية الأنزيمية للفطر *A.alternata*: $U_1 = -7.25 + 0.78C - 0.015C^2$

ومن حساب معامل التحديد تبيّن أنّ تأثير درجة الحرارة على فعالية السيلّولاز المنتج من الفطر *T.harzianum* أقل (80.1%) من تأثيرها على فعالية السيلّولاز المنتج من الفطر *A.alternate* (95.2%).



المخطط (2): تأثير درجة الحرارة على فعالية أنزيم السيلّولاز المنتج من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternate*

جدول(3): تأثير درجة الحرارة على انتاج أنزيم السيلّولاز من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternate* المعزولين من المحيط الجذري للقمح بعد سبعة أيام من الحضن و pH=6.0.

درجة الحرارة	أنزيم السيلّولاز المنتج من الفطر *T.harzianum*			أنزيم السيلّولاز المنتج من الفطر *A.alternate*		
	الكتلة الحيوية g/L	الفعالية لأنزيمية U/ml	درجة pH النهائية	الكتلة الحيوية g/L	الفعالية لأنزيمية U/ml	درجة pH النهائية
20	c6.98±0.06	c2.78±0.04	6.00±0	b5.97±0.1	b2.56±0.03	g6.00±0
22	d7.12±0.03	f3.29±0.03	5.92±0.04	b6.04±0.03	d2.78±0.02	g5.97±0.03
24	f7.63±0.07	g3.84±0.03	4.89±2.72	c6.13±0.04	e2.96±0.04	f5.80±0.02
26	g7.86±0.04	h4.07±0.04	5.74±0.02	cd6.17±0.02	f3.12±0.04	e5.65±0.04
28	e7.54±0.04	e3.97±0.02	5.27±0.02	d6.22±0.02	g3.15±0.02	d5.57±0.04
30	cd7.04±0.06	d2.98±0.02	5.23±0.01	c6.15±0.02	f3.03±0.03	c5.49±0.03
32	b6.48±0.03	b2.53±0.02	5.16±0.03	b5.97±0.03	c2.63±0.04	b5.34±0.05
34	a6.08±0.05	a2.32±0.02	5.08±0.04	a5.64±0.03	a2.23±0.03	a5.17±0.03
F	442.76	1389.34	1.236	56.92	300.265	249.26
P–value	*0	*0	n.s 0.340	*0	*0	*0

يدل كل متوسطين لهما حرف مشترك في العمود نفسه على عدم وجود فرق معنوي بينهما.

حيث أنّ: F – قيمة إحصاء فيشر، P–Value – المعنوية، n.s – يدل على عدم وجود فرق معنوي. *

– يدل على وجود فرق معنوي.

الجدول (4): المقارنة بين الفعالية الأنزيمية للسيلّولاز المنتج من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternate* تحت تأثير درجات حرارة مختلفة أثناء الحضن

درجة الحرارة	فعالية السيلّولاز المنتج من *T.harzianum* U/ml	فعالية السيلّولاز المنتج من *A.alternate* U/ml	فرق المتوسطات	t.test	P–value
20	2.78±0.04	2.56±0.03	0.22	8.00	*0.00
22	3.29±0.03	2.78±0.02	0.51	27.05	*0.00
24	3.84±0.03	2.96±0.04	0.88	31.78	*0.00
26	4.07±0.04	3.12±0.04	0.95	29.98	*0.00
28	3.97±0.02	3.15±0.02	0.82	1.57	n.s0.19
30	2.98±0.02	3.03±0.03	0.05	2.87	*0.049
32	2.53±0.02	2.63±0.04	0.09	3.96	*0.02
34	2.32±0.02	2.23±0.03	0.09	4.07	*0.02

يدل كل متوسطين لهما حرف مشترك في العمود نفسه على عدم وجود فرق معنوي بينهما.

حيث أنّ: n.s – يدل على عدم وجود فرق معنوي. * – يدل على وجود فرق معنوي.

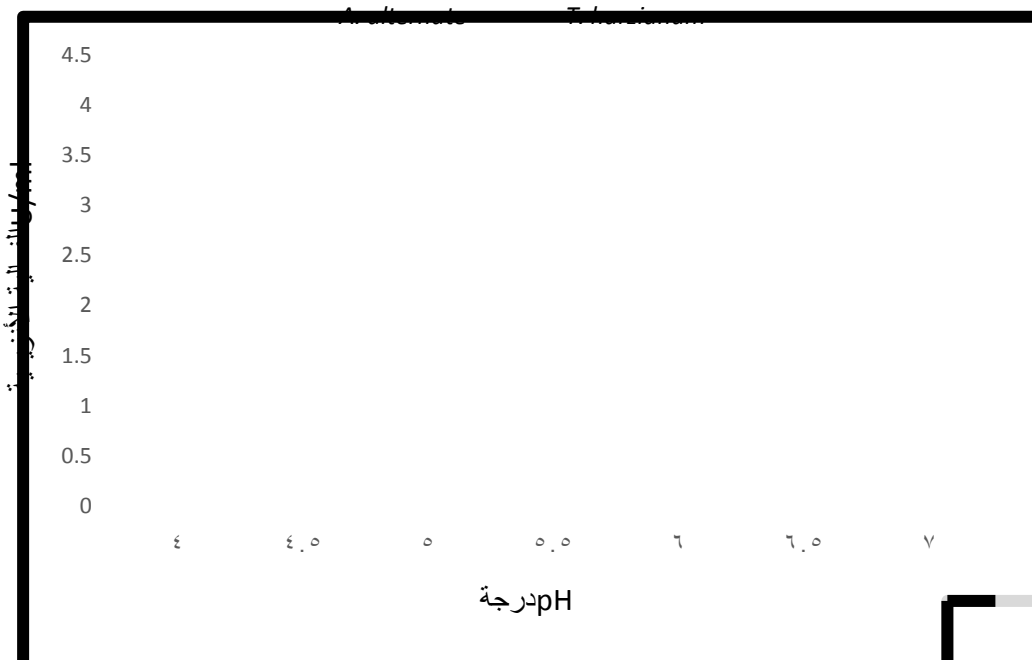
تأثير درجة حموضة الوسط pH على إنتاج السيلّولاز: تؤثر درجة pH على نمو الكائنات الحية الدقيقة وعلى إنتاج المواد الاستقلابية المختلفة، حيث أنّ لكل أنزيم درجة pH معينة يعمل عندها بالشكل الأمثل. وبما أنّ درجة pH تؤثر تأثيراً كبيراً على سلوك وفعالية الأنزيمات، فقد أجريت هذه التجربة لبيان تأثير درجة pH المثلى على نمو الفطور وعلى فعالية أنزيم السيلّولاز المنتج من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternate* وذلك عند مجال pH تتراوح ما بين (7.0– 4.0) بفارق نصف درجة بعد سبعة أيام من الحضن ودرجة حرارة 28°C. يتضح من خلال نتائج الجدول (5) ازدياد معدل نمو كل من الفطرين *T.harzianum* و *A.alternate* بازدياد pH الوسط الأولية إلى حد معين بعدها تراجع نمو الفطرين مع ازدياد قيمة pH. كما وانخفضت درجة pH النهائية عن pH الأولية لجميع القيم المدروسة. وتحققت أعلى فعالية للسيلّولاز المنتج من الفطر *T.harezianum* (4.19 U/mL) عند pH=5.5، كما وبلغت الكتلة الحيوية أقصاها (7.87 g/L)، ثمّ اتجهت نحو النقصان عند زيادة pH حتى الدرجة 7.0. بينما تحققت أعلى فعالية للسيلّولاز المنتج من الفطر *A.alternate* (3.86 U/ml) عند pH =5.0، كما وبلغت الكتلة الحيوية أقصاها (7.53 g/L)، بعدها اتجهت كل من الفعالية الأنزيمية والكتلة الحيوية نحو النقصان مع ازدياد درجة pH حتى الدرجة 7.0. وهذا يدل على أنّ لكل فطر درجة حموضة pH مثلى لإنتاج السيلّولاز تختلف عن الآخر (المخطط 3). كما وتبين وجود فروق معنوية ذات دلالة إحصائية ($p<0.05$) بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية، الفعالية الأنزيمية ودرجة pH النهائية لكلا الفطرين وذلك ما بين درجات pH المدروسة عند مستوى معنوية 5% الجدول(5).

جدول(5): تأثير درجة pH الوسط على انتاج أنزيم السيلّولاز من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternate* المعزولين من المحيط الجذري للقمح بعد سبعة أيام من الحضن ودرجة حرارة 28°C.

أنزيم السيلّولاز المنتج من الفطر *A.alternata*			أنزيم السيلّولاز المنتج من الفطر *T.harzianum*			pH
pH النهائي	الفعالية الأنزيمية U/ml	الكتلة الحيوية g/L	pH النهائية	الفعالية الأنزيمية U/ml	الكتلة الحيوية g/L	
a3.88±0.06	c2.89±0.05	a4.28±0.04	a3.86±0.04	b2.79±0.03	a3.04±0.02	4.0
b4.32±0.04	e3.30±0.03	d6.13±0.04	b4.33±0.03	d3.11±0.03	d5.14±0.03	4.5
c4.80±0.04	g3.86±0.04	g7.53±0.03	c4.89±0.03	f3.65±0.04	f6.93±0.04	5.0
d5.24±0.05	f3.40±0.09	f6.86±0.04	d5.14±0.1	g4.19±0.04	g7.87±0.03	5.5
e5.57±0.05	d3.15±0.09	e6.22±0.05	e5.27±0.05	e3.97±0.03	e7.54±0.04	6.0
f6.03±0.03	b2.74±0.06	c5.15±.05	f6.03±0.04	c2.98±0.03	c5.66±0.03	6.5
g6.86±0.04	a2.32±0.08	b4.67±0.04	g6.57±0.05	a2.54±0.03	b4.18±0.03	7.0
1517.46	199.49	2610.23	975.52	890.2	8593.62	F
*0	*0	*0	*0	*0	*0	P-value

يدل كل متوسطين لهما حرف مشترك في العمود نفسه على عدم وجود فرق معنوي بينهما.

حيث أنّ: F – قيمة إحصاء فيشر، P-Value – المعنوية، * – يدل على وجود فرق معنوي.



المخطط (3): تأثير درجات مختلفة من pH على فعالية السيلّولاز المنتج من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternata*

جدول (6): المقارنة بين الفعالية الأنزيمية للسيلّولاز المنتج من النوعين الفطريين *T.harzianum* و *A.alternate* تحت تأثير درجات pH مختلفة أثناء الحضن

pH	فعالية السيلّولاز المنتج من *T.harzianum*	فعالية السيلّولاز المنتج من *A.alternate*	فرق المتوسطات	t.test	P-value
4.0	2.79±0.03	2.89±0.05	0.11	3.58	*0.02
4.5	3.11±0.03	3.30±0.03	0.19	9.17	*0.00
5.0	3.65±0.04	3.86±0.04	0.21	6.36	*0.00
5.5	4.19±0.04	3.40±0.09	0.79	10.67	*0.00
6.0	3.97±0.03	3.15±0.09	0.82	0.83	n.s0.46
6.5	2.98±0.03	2.74±0.06	0.25	6.32	*0.00
7.0	2.54±0.03	2.32±0.08	0.21	4.53	*0.01

حيث أنّ: n.s – يدل على عدم وجود فرق معنوي. * – يدل على وجود فرق معنوي.

ولوحظ من خلال اختبار t.test تشابه قيمة فعالية السيلّولاز المنتج من كلا الفطرين المدروسين عند درجة pH= 6.0 (P>0.05)، أما في باقي الدرجات فقد اختلفت الفعالية (P<0.05) كما هو موضّح في الجدول (6)، مع ملاحظة أنّ متوسط فعالية أنزيم السيلّولاز المنتج من الفطر *T.harzianum* في أماكن الاختلاف كانت أعلى من متوسط فعالية السيلّولاز المنتج من الفطر *A.alternate* في الدرجات التي تفوق قيمة pH فيها عن 5.0 . ومن خلال دراسة الارتباط بين درجة الـ pH والفعالية الأنزيمية لكل فطر كما هو موضح بالمعادلتين:

عامل pH والفعالية الأنزيمية للفطر *T. harzianum* : $U_1 = -11.02 + 5.46P - 0.506P^2$

عامل pH و الفعالية الأنزيمية للفطر *A.alternata* : $U_1 = -8.44 + 0.4.62P - 0.44P^2$

ومن حساب معامل التحديد تبيّن أنّ تأثير درجة الـ pH على إنتاج السيلّولاز من الفطر *T.harzianum* أقل (77.2%) من تأثيرها على إنتاج السيلّولاز من الفطر *A.alternate* (90.5%).

فدرجة حموضة الوسط pH لها دور فعّال في عملية إنتاج الأنزيم، فدرجة pH الملائمة لعزلة فطرية قد لا تكون ملائمة لعزلة أخرى [25]. يمكن تفسير هذه النتائج بأنّ درجة pH تؤثر على سلوك وفعالية الأنزيمات، حيث أنّ الأنزيمات مواد بروتينية يعتمد نشاطها على وجود بعض المجموعات الأمينية والكربوكسيلية في بروتين الأنزيم بدرجة معينة من التأين، فإنّ أي تغيير في درجة pH ستتأثر به المراكز الفعّالة للأنزيم وبالتالي ينخفض نشاطه. كما أنّ القيم المرتفعة والمنخفضة من درجة pH تؤثر على الحالة الطبيعية للبروتين وبالتالي تؤدي إلى خفض فعالية الأنزيم المنتج [5]. إنّ النتائج التي توّصلنا إليها تشابه [24] عندما درس إنتاج أنزيم السيلّولاز من مزرعة مختلطة للفطرين *T.viride, A.niger* إذ كانت درجة pH 5.5 هي الأفضل. في حين [26] توصّل إلى أنّ درجة pH 4.8 هي الأفضل لإنتاج أعلى كمية من الأنزيم باستخدام عزلة فطر *T.reesei* .

الاستنتاجات والتوصيات:

a) حددت الفعالية الأنزيمية لكل من الفطرين المدروسين بتنميتهما على وسط الاستنبات الخاص بالإنتاج خلال فترات مختلفة من الحضن وبدرجة حرارة 28±1°C و pH=6.0. فتبين أنّ اليوم السابع من الحضن هو الأمثل لإنتاج السيلّولاز من الفطر *T. harzianum* بفعالية أنزيمية (3.97U/mL)، بينما اليوم الثامن هو الأمثل لإنتاجه من *A. alternate* بفعالية أنزيمية(3.29U/mL). ولوحظ وجود فروق معنوية بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية، الفعالية الأنزيمية ودرجة pH النهائية.

b) كما وحددت الفعالية الأنزيمية لكل من الفطرين بتنميتهما على وسط الاستنبات الخاص بالإنتاج بعد سبعة أيام من الحضن و pH=6.0 ومجال من درجات الحرارة تراوحت من 20°C إلى 34°C. فتبين أنّ الدرجة 26°C كانت المثلى لإنتاج السيلّولاز من الفطر *T. harzianum* بفعالية أنزيمية (4.07/mL)، بينما الدرجة 28°C هي المثلى لإنتاجه من الفطر *A.alternate* بفعالية أنزيمية (3.15 U/mL). وتبين وجود فروق معنوية بين متوسطات الكتلة الحيوية والفعالية الأنزيمية للسيلّولاز المنتج من الفطرين المدروسين، وكذلك بين متوسطات pH النهائية للسيلّولاز المنتج من الفطر *A.alternate*، بينما لا توجد أي فروق معنوية بين متوسطات pH النهائية للسيلّولاز المنتج من الفطر *T.harzianum*.

c) أيضاً حددت الفعالية الأنزيمية لكل من الفطرين بتنميتهما على وسط الاستنبات الخاص بالإنتاج بعد سبعة أيام من الحضن بدرجة حرارة 28±1°C وضمن مجال pH تراوح من 4.0 إلى 7.0. فتبين أنّ درجة pH 5.5

هي الأمثل لإنتاج السيلّولاز من الفطر *T.harzianum* بفعالية أنزيمية (4.19 U/mL)، بينما درجة pH 5.0 هي الأمثل لإنتاجه من الفطر *A.alternate* بفعالية أنزيمية (3.86 U/mL). وتبين وجود فروق معنوية بين متوسطات كل من الكتلة الحيوية، الفعالية الأنزيمية وpH النهائيّ.

d) تبين من خلال المقارنة بين متوسطات الفعالية الأنزيمية للفطرين المدروسين تفوق الفطر *T.harzianum* على الفطر *A.alternate* في إنتاج السيلّولاز، كما وتبين أنّ تأثير زمن الحضن على إنتاج أنزيم السيلّولاز من الفطر *T.harzianum* أكبر من تأثيره على إنتاج السيلّولاز من الفطر *A.alternate* . في حين كان تأثير كل من درجة الحرارة ودرجة pH الوسط على إنتاج الأنزيم من الفطر *T.harzianum* أقل من تأثيرهما على إنتاج السيلّولاز من الفطر *A.alternate*.

اعتماداً على نتائج البحث نوصي أن تكون الدراسات القادمة مكملة له وتتعلق بدراسة الإنتاج الحيوي للسيلّولاز من خلال تنمية الفطور على المخلفات الصناعية السليلوزية الرخيصة الثمن، ودراسة الظروف المثلى للأنزيمات الثلاث التي يتكون منها معقد السيلّولاز والتي تعمل بشكل تعاوني تعاقبي لإكمال تحلل السليلوز إلى سكاريدات بسيطة. بالإضافة إلى دراسة قدرة الفطور على إنتاج أنزيمات أخرى كالأميلاز، الكاتيناز والليباز..... .

المراجع:

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

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

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

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

5. دلالي، باسل كامل. *موضوعات مختارة في التكنولوجيا الحيوية*. دار الكتب للطباعة والنشر، مطبعة جامعة الموصل، العراق، 1999.

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

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

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

9. Irfan, M.;Nadeen,M. and Syed,Q. *Influence of nutritional conditions for endoglucanase production by T.viride in SSF*. Global journal of biotechnology & Biochemistry, 2012, 7 (1):07-12.

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

11. Vllena,G. K. and Gutierrez – Correa, M.*production of cellulose by Aspergillus niger 91 ellulos developd on polyester cloth.* Letters in Applied Miceobiol.43.Issue, 2006, 3:262-268.

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

13. Yeoh,H.H.; Khew, E. and Lim,G. *A simple method of screening cellulolytic fungi*. Mycologia,1985, 77(1):161-162

14. Mandels, M. and Strenbery, D. *Recent advances in 91ellulosi technology*. J. Ferment. Technol,1976, 54: 267 – 286.

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

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

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

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

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

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

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

22. AL-Taweil,H.I.; Bin Osman,M .; Abdul Hamid,A. and Yusoff,W.M.W. *Optimizing of Trichoderma viride cultivation in submergal state fermentation*. American Journal of Applied Scienes,2009, 6(7): 1284-1288.

23. Chahal,D.S. *Solid-stat fermentation with Trichoderma reesi for cellulose production*. Appl.Environ, Micobiol,1985, 49:205-210.

24. Ikram-UI-H.; Muhammad, M. J.; Tehamina,S.K. AndZafar,S. *Cotton saccharifying activity of cellulases production by c0- culture of Aspergillus niger and Trichoderma viride*. Agriculture and Biological sciences,2005, 1(3):241-245.

25. دنحا، رياض فرنسيس، الخزرجي، طالب عويد. *تغذية وعلم وظائف الفطريات* ، مطبعة جامعة الموصل، الفصل الثامن، 1990، ص: 544.

26. Das,M.; Banerjee,R. andBal,S. *Multivariable parameter optimization for the endoglucanase production by Trichoderma reesei Rut C30 from Ocimum gratissimum seed*. Braz.Arch. Biol. Technol, 2008, 51(1):35-41.