إنتاج انزيم السليوليز من بعض العزلات الفطرية المحلية ودراسة تأثير بعض الظروف الزرعية

شمال يونس عبد الهادي   نور عامر محمد علي   بشرى عصام كامل
قسم علوم الحياة / كلية التربية
جامعة الموصل

الاستلام   القبول
١٢ / ٠٢ / ٢٠١٢   ٠٦ / ٠٦ / ٢٠١٢

Abstract:

Ten local strains of fungi were isolated and identified. these fungi are belong to the following genera: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Penicillium sp*, *Rhizopus sp*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Chaetomium sp*, *Macrophomina sp.*, *Cladosporium sp.* and *Aspergillus flavus*, isolated from the soil of Mosul University. The ability of isolated fungi to cellulase production in a solid media was investigated. A quantitative test using liquid media was used to determine the best effective isolate for cellulase production. determine *A. niger* gave the highest production of cellulase (8.12) unit/ml. Carboxymethyl cellulose as a carbon source gave highest production of cellulase (8.15) unit/ml. The best concentration of the carbon source was (12) gm/L which gave highest production of enzyme (8.67) unit/ml. The optimum temperature gave the highest production of cellulase (8.36) unit/ml was 30C^{O}. The pH 5.5 considered as the optimum one for enzyme production, as it gave (9.22) unit/ml.

الخلاصة

تم عزل وتشخيص عشر عزلات محلية تعود الى الاجناس التالية : *Aspergillus niger* ، *Alternaria alternate*، *Penicillium sp*، *Rhizopus sp*، *Rhizoctonia solani*، *Fusarium solani*، *Chaetomium*, *Macrophomina sp*, *Cladosporium sp.*, *Aspergillu flavus* ، والتي عزلت من التربة /جامعة الموصل . تم الكشف عن قابلية

العزلات لإنتاج انزيم السليوليز في الأوساط الصلبة. اجري اختبار كمي باستخدام الاوساط السائلة لتحديد اكفأ عزلة فطرية في إنتاج انزيم السليوليز . اعطت عزلة الفطر *A.niger* اعلى إنتاجية لانزيم السليوليز وكانت (8.12) وحدة/مل. وأعطى المصدر الكاربوني كاربوكسي مثيل سليلوز انتاجية بلغت (8.15) وحدة/مل. وأفضل تركيز للمصدر الكاربوني كان 12غم/لتر اذ اعطى انتاجية بلغت (8.67) وحدة/مل وأعطت درجة الحرارة 30^{o} م إنتاجية بلغت (8.36) وحدة/مل. وتميز الأس الهيدروجيني الأولي (5.5) بكونه الأمثل لإنتاج الإنزيم إذ أعطى إنتاجية (9.22) وحدة/مل.

المقدمة:

انزيم السليوليز عبارة عن مجموعة من الانزيمات تسمى أحيانا Cellulases وهي ثلاث انزيمات تساهم مجتمعة في تكسير الاصرة الكلايكوسيدية بيتا 1 – 4 والانزيمات الثلاث هي: (Cellobiohydrolase, ، CMCase, EC 3.2.1.4) Endo -1,4-B-glucanases Cellobiase , EC 3.2.1.21) B-) ،EC3.2.1.91) Exo-1, 4- B-glucanases glucosidase [1–2].

يستخدم السليوليز لعدة إغراض منها إضافته الى عليقة الماشية كمادة مساعدة على الهضم ويستخدم في عملية استخلاص القهوة والشاي وفي استخلا ص فول الصويا . والاستخدام الحديث هو تحليل المخلفات السليلوزية لإنتاج الكلوكوز الذي يمكن الاستفادة منه في تنمية العديد من الأحياء المجهرية لإنتاج منتجات مفيدة مثل الكحول وبروتين احادي الخلية وغيرها من منتجات التخمر . كما ان لأنزيم السليوليز تطبيقات كثيرة في الصناعات الكيمياوية والغذائية والطبية والصناعات النسجية [3–4].

تنتج أنواع عديدة من الاحياء المجهرية انزيم السليوليز مثل بعض الفطريات التابعة للأجناس *Trichoderma*, *Aspergillus*،*Mucor* ، *Cladosporium*.... [5–6] بالإضافة إلى بعض أنواع البكتريا مثل *Bacillus*، *Streptomyces* [7–8]. ينتج الإنزيم على المستوى التجاري من الفطر *Trichoderma reesei* وبعض سلالاته المطفرة باستخدام تخمرات الحالة الصلبة [9– 10].

إن هدف البحث عزل وتشخيص الفطريات من التربة والحصول على عزلات محلية تمتلك قابلية عالية لإفراز إنزيم السليوليز ودراسة تأثير بعض المصادر الكاربونية ودرجة الحرارة والأس الهيدروجيني الأولي الامثل على انتاج انزيم السليوليز .

المواد وطرائق العمل

العزل من التربة:

أخذت عينات التربة بعمق 20 سم. واعتمدت طريقة التخافيف في عزل الفطريات من عينات التربة المستخدمة [11].

العزل والتشخيص للكائنات المجهرية المستخدمة:

استخدم عشرة عزلات فطرية محلية مختلفة والتي عزلت من التربة /جامعة الموصل . حفظت العزلات بتنميتها على موائل وسط البطاطا والدكستروز والاكار (PDA) داخل انابيب اختبار Slants في الثلاجة عند درجة حرارة 4 سيليزية. تم تجديد المزارع الفطرية كل اسبوعين . وللحصول على مزارع فطرية نقية اخذت وخزة من كل مستعمرة واعيد زراعتها على وسط PDA زائدا Streptomycein، واستمرت عملية التنقية للحصول على مستعمرات نقية لكل من الفطريات المعزولة النامية. ثم اخذت عينة من كل مستعمرة فطرية نقية وزرعت في قناني حاوية على وسط PDA مائل واعطي رقم خاص بها وبعد التحضين بدرجة 28±1°م حفظت جميع العينات المعزولة والنقية في الثلاجة لحين الاستعمال . واعتمد في تشخيص العزلات الفطرية طريقة الزرع على الشريحة Slide Culture Technique الموصوفة من قبل [12−13]. وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية التي وردت في المصادر [14-15].

الأوساط الزرعية:

وسط الكشف عن النشاط الانزيمي للسليوليز :

اجري اختبار نوعي لدراسة النشاط الانزيمي للعزلات الفطرية التي تم الحصول عليها باستخدام اوساط الزرع الصلبة الخاصة بالكشف عن قابلية العزلات على افراز انزيم ا لسليوليز. حيث استخدم وسط الكاربوكسي مثيل سليلوز اكار Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC Agar)

والذي يتكون من المواد التالية (غم/لتر من الماء المقطر):− $NaNO_3$ ، 2.0 ; K_2HPO4 ، 1.0 ; MgSO4. 7 H_2O ، 0.5; KCL ،0.5 ; FeSO4 ، 0.01 ; CMC-Na Salt ، 10.0 ; Agar ، 20.0 [16]. حضر الوسط باذابة جميع المواد في الماء المقطر ما عدا (CMC– Na Salt) الذي اضيف تدريجيا باستخدام خلاط مغناطيسي مع التسخين حتى يتجانس الوسط ثم ضبط الاس الهيدروجيني عند 6.0. عقم الوسط بجهاز المعقام عند ضغط ١ كغم/سم ٢ ودرجة حرارة 121 سيليزية لمدة 15 دقيقة. وزرع الوسط بعد التعقيم في

أطباق بتري معقمة تحت ظروف معقمة وتركت الأطباق ليتصلب الوسط فيها وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 سيليزية لحين الاستخدام.

وسط الإنتاج:

استخدم الوسط ألزرعي الخاص بانتاج الانزيم والذي يتكون من المواد التالية (غم/لتر من الماء المقطر): $(NH4)_2$ SO4، 1.4 ; KH_2PO4 ، 2.0 ; Urea ، 0.3 ; $CaCL_2$ ، 0.3 ; $MgSO4. 7 H_2O$ ، 0.005 ; $FeSO4. 7 H_2O$ ، $MnSO4. H_2O$; 0.0016 ; $ZnSO4. 7 H_2O$ ، 0.0014 ; $CoCl_2$ ، 0.002 ; Peptone ، 1.0 ; CMC، 10.0 و Tween ، 2.0 مل [17]. تم اذابة جميع مكونات الوسط في الماء المقطر المعقم عدا اليوريا وضبط الاس الهيدروجيني عند 6.0 باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم (1ع) وحامض الهيدروكلوريك (1ع). وزع الوسط في دوارق مخروطية حجم 250 مل بواقع 50 مل/دورق، سدت الدوارق باحكام بسدادات قطنية ثم عقمت تحت نفس الظروف السابقة الذكر و بعد التعقيم اضيف محلول اليوريا المعقم بالبسترة الى الدوارق تحت ظروف معقمة . لقحت الدوارق بعالق ابواغ الفطر بعمر اسبوع في محلول Tween 80 1 % كان تركيز الابواغ في اللقاح بمقدار 5×10^7 بوغ / مل وبتركيز 2 % [18]. حضنت الدوارق بعد التلقيح في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 28 ±1 سيليزية وبمعدل رج 150 دورة/دقيقة ثم سحبت الدوارق من الحاضنة بعد 7 أيام من التحضين.

طرائق التحليل:

الكشف عن إفراز إنزيم السليوليز باستخدام محلول كونكو الاحمر :

يؤخذ (0.1%) من المحلول ويكمل الحجم إلى لتر من الماء المقطر . تغمر الأطباق به لمدة عشرة دقائق ثم تزال من الأطباق بعد أن تغسل الأطباق من 3_4 مرات بمحلول NaCl تركيزه M1 [19].

الكشف عن إنتاج انزيم السليوليز:

تم الاستدلال عن انتاج الانزيم بملاحظة ظهور هالة فاتحة اللون حول المستعمرة الفطرية النامية في وسط الكشف عن انزيم السليوليز والتي امكن ملاحظتها بعد يومين من التحضين عند درجة حرارة 28 ± 1 سيليزية والتي يزداد قطرها باستمرار فترة التحضين دلالة على زيادة قدرة الفطر على انتاج انزيم السليوليز باستمرار النمو والتي تعطي دليلا على تحلل ال CMC بوساطة انزيم السليوليز CMCase المفرز الى الوسط الصلب ، ولمدة خمسة ايام من

التحضين سحبت الاطباق من الحاضنة وقيس قطر المستعمرة الفطرية النامية وقطر الهالة المتكونة. تم حساب قابلية العزلات على انتاج انزيم السليوليز باستخدام المعادلة التالية [16]:

$$\text{قابلية الفطر لإنتاج انزيم السليوليز} = \frac{\text{قطر هالة التحلل (ملم)}}{\text{قطر المستعمرة الفطرية (ملم)}}$$

تقدير الكتلة الحيوية:

بعد انتهاء فترة التحضين المعينة سحبت الدوارق من الحاضنة و قيس الاس الهيدروجيني النهائي لكل دورق ثم اجريت عملية الترشيح لمحتوى كل دورق من الوسط الغذائي باستخدام اوراق ترشيح مجففة وموزونة مسبقا من نوع (Whatman No. 1) مثبتة على قمع بخنر المجهز بمفرغ هوائي كهربائي ، بعد الترشيح جففت اوراق الترشيح الحاملة للكتلة الحيوية في فرن كهربائي عند درجة حرارة 70 سيليزية لمدة 24 ساعة. تم قياس الكتلة الحيوية بفارق الوزنين باستخدام ميزان حساس . ترك الرائق (الراشح) جانبا لقياس الفعالية الإنزيمية للفطر حيث اضيف للرائق Sodium azide بتركيز 0.2 % وذلك لايقاف نمو الفطريات عند عدم استخدامه مباشرة لتقدير كمية الانزيم المنتج ، ثم حفظ في الثلاجة عند درجة حرارة 4 سيليزية لحين الاستخدام [20].

قياس فعالية انزيم السليوليز:

قيست فعالية أنزيم السليوليز اعتمادا على قياس احد نواتج التفاعل وهو سكر الكلوكوز D- glucose المتحرر من ورقة الترشيح حسب طريقة [17] طريقةFilter Paper Assay. تم قياس فعالية هذا الانزيم باخذ 0.5 مل من الراشح او محلول الانزيم في انبوبة اختبار حجم 18 مل وأضيف إليها 1 مل من المحلول المنظم (Na – Citrate Buffer) ذو اس هيدروجيني 4.8 وغمر بالمزيج شريط ورقة الترشيح (Whatman No. 1) بأبعاد 1 × 6 سم زنة 50 ملغم. وحضنت لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة 50 سيليزية بعدها أضيف لكل أنبوبة اختبار 3 مل من كاشف Dinitro Salicylic acid (DNS) 3,5. بعد ذلك وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق، بعد تبريد المزيج إلى درجة حرارة المختبر تم قياس كمية الكلوكوز المتحرر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع (ECIL, CE1021) عند طول موجي 550 نانوميتر.

استخدم المنحنى القياسي للكلوكوز النقي (المحضر بنفس الطريقة السابقة الذكر) وذلك لتقدير الكلوكوز المتحرر . تحدد الوحدة الواحدة One Unit لانزيم السليوليز بقيمة الانزيم التي تحرر 1 مايكرومول من السكر المختزل (D- glucose) لكل دقيقة من الوقت تحت ظروف طريقة الاختبار المستخدمة انفا.

النتائج والمناقشة:

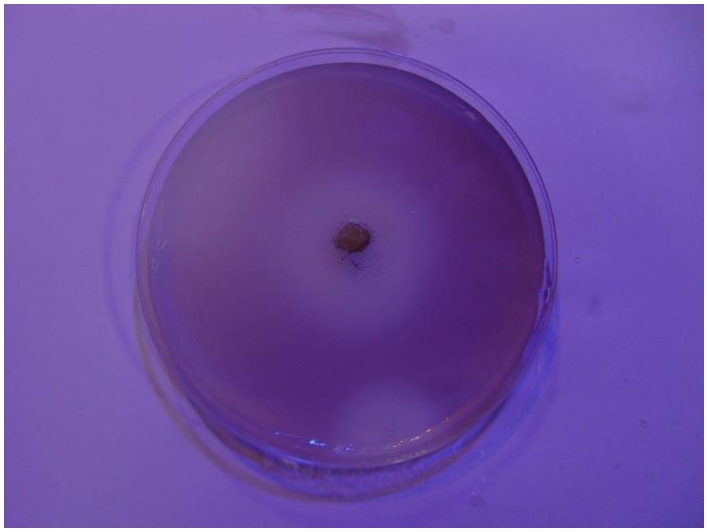
١ –عزل وتشخيص الفطريات:

عزلت الفطريات من التربة ، وظهرت انواع فطرية تعود الى الاجناس التالية: *Aspergillus niger* ، *Alternaria alternata* ، *Penicillium sp* ، *Rhizopus sp*، *Cladosporium* ،*Fusarium solani* ،*Rhizoctonia solani* *Aspergillus flavus* , *Chaetomium sp.* ,*Macrophomina sp.*, واكد التشخيص بملاحظة النمو على الوسط الزرعي والصفات الزرعية وأيضاً بالاعتماد على صفات الفطريات المورفولوجية واجراء الفحص المجهري [13-14].

٢ –دراسة النشاط الانزيمي للفطريات:

تم اجراء اختبار نوعي لتحديد العزلات الاكثر نشاطا ف ي انتاج انزيم السليوليز ، اذ ان العديد من الفطريات لها القدرة على انتاج هذا الانزيم ، واستخدمت طريقة الاوساط الصلبة لتقدير انتاج الانزيمات من قبل العزلات الفطرية المستخدمة ، اذ تم استخدام الوسط الزرعي الصلب الحاوي على مادة كاربوكسي مثيل سليلوز (CMC Na-salt) ويعد ظهور هالة فاتحة اللون حول المستعمرة الفطرية دليلا على انتاج انزيم السليوليز من قبل الفطر والذي يعمل بدوره على تحليل السليلوز المعقد الموجود في الوسط الزرعي الى سكريات بسيطة . بينت النتائج جدول (1) ان العزلات الفطرية (*A. niger* و *Penicillium sp*) أعطت كفاءة عالية في انتاج الانزيم وتحليل مادة الكاربوكسي مثيل سليوليز، كما لوحظ ظهور هالة التحلل حول المستعمرات الفطرية في اليوم الثاني من التحضين واستمر بزيادة فترة التحضين الى اليوم الخامس وكانت قطر هالة التحلل لكل من الفطر (*A. niger* و*Penicillium sp*) هو (25 و22) ملم على التوالي. وتمثل هذه القيم فعالية عالية في انتاج انزيم السليوليز . كما أظهرت العزلات الفطرية الاخرى قدرات متفاوتة في انتاج الانزيم، اذ كانت قيمة النشاط الانزيمي لعزلة الفطر (*Rhizopus* sp.) هي (18) ملم وتمثل هذه القيمة فعالية جيدة في انتاج انزيم السليوليز وكذلك العزلتان (*A. alternata* و *Cladosporium sp*) اما بقية العزلات الفطرية فقد أظهرت نشاطا إنزيميا تراوح مابين المتوسط والضعيف، اذ أعطت العزلات الفطرية (*Chaetomium sp* , *Rhizoctonia solani* , *A. flavus*) نشاطا انزيميا متوسط بلغت قيمته (13و5 و18) ملم على التوالي. بينما أعطت عزلتا الفطر (*Microphomina sp* و *Fusarium solani*) نشاط انزيمي ضعيف بلغت قيمته (10 و11) ملم على التوالي. وعلى ضوء هذه النتائج نستنتج بان العلاقة ما بين

قطر هالة التحلل وكفاءة الفطريات في انتاج انزيم السليوليز هي علاقة طردية اذ يزداد قطر هالة التحلل في الوسط الصلب كلما زادت قدرة العزلة على انتاج الانزيم . كما يمكن تفسير ضعف قابلية بعض العزلات على انتاج انزيم السليوليز بسبب عدم كفاية فترة التحضين لتحفيز انتاج الانزيم من قبل العزلات الفطرية واختلافها في القدرة على استغلال الوسط ألزرعي ومدى ملائمة الأس الهيدروجيني للوسط ألزرعي لهذه العزلات . وان الاجناس (*Penicillium , A. niger*) هي الاكثر ظهورا في وسط العزل . ان النتائج التي تم الحصول عليها مطابقة لما توصل إليه [21]. اذ ان الفطريات المعزولة من مصادر مختلفة تنتج انزيم السليوليز بكميات مختلفة عندما تم عزل 61 نوع من الفطريات من المناطق الجذرية لعدد من النباتات .



إفراز انزيم السليوليز من قبل عزلة الفطر *A.niger* وظهور المنطقة الرائقة حول المستعمرة الفطرية باستخدام صبغة كونكو الحمراء.[19].

جدول (1): كفاءة العزلات الفطرية المختلفة على إنتاج انزيم السليوليز باستخدام طريقة الأوساط الصلبة

نوع الفطر	قطر الهالة (ملم)
Aspergillus niger	25
Alternaria alternate	15
Penicillium sp	22
Chaetonium sp.	5
Cladosporium sp	17
Fusarium solani	11
Macrophomina sp	10
Rhizopus sp	18
Rhizoctonia solani	13
Aspergillus flavus	18

كفاءة الفطريات المختلفة في إنتاج انزيم السليوليز باستخدام الوسط السائل:

بينت نتائج الجدول (2) بان هناك تباين في كفاءة انتاج انزيم السليوليز بين العزلات الفطرية المستخدمة في الدراسة، وكانت النتائج المتحصل عليها مطابقة لنتائج الوسط الصلب ، اذ اعطت عزلتا الفطريات (*Penicillium sp , A. niger*) اعلى فعالية لانزيم السليوليز والتي بلغت (8.12،7.59) وحدة/مل على التوالي بعد مرور 7 أيام من التحضين، في حين اعطت الفطريات (*Rhizopus, Cladosporium, Alternaria*) فعالية انزيمية بلغت (4.72 و5.27 و5.68) وحدة/مل على التوالي. بينما بلغت الفعالية الانزيمية الانتاجية للفطر (*Chaetonium, R.solani, A. flavus*) هي (3.76 و4.35 و3.15) وحدة/مل، في حين اعطت الفطريات (*F.solani , Microphomina sp.*) اقل انتاجية وكانت الفعالية الانزيمية ضعيفة وبلغت (2.88 و3.25) وحدة/مل على التوالي. اما بالنسبة لانتاج الكتلة الحيوية فنلاحظ من الجدول ان اعلى انتاجية للكتلة الحيوية كانت (13.63) غم/لتر لعزلة الفطر (*A. niger*) والتي اعطت اعلى فعالية لانزيم السليوليز، بينما اعطت عزلة الفطر *F.solani* اقل انتاجية للكتلة الحيوية بلغت (5.93) غم/لتر والتي بدورها اعطت اقل فعالية للانزيم في الوسط السائل.

وفيما يخص الأس الهيدروجيني النهائي فقد انخفض في معظم العزلات عند الأس الهيدروجيني الأولي ماعدا عزلة الفطر *R.solani* والتي ارتفع فيها الرقم الهيدروجيني النهائي عن الرقم الهيدروجيني الأولي بدرجة قليلة ووصل إلى (6.17). ويعزى الانخفاض في درجة الأس الهيدروجيني النهائي إلى نشاط الفطريات في النمو وإنتاج إنزيم السليوليز ، اذ تطرح الفطريات بعض الحوامض العضوية في الوسط مما يسبب الانخفاض في الاس الهيدروجيني النهائي. وهذه النتائج جاءت مطابقة لما جاء به [22] اذ اشار ان النمو في ا لأوساط الحاوية على الكلوكوز والكليسرول يرافقه انخفاض مفاجيء في الاس الهيدروجيني لوسط التخمر كما جائت مطابقة لما ذكره [23 و24] من إن فعالية انزيم السليوليز تتباين باختلاف السلالات . كما اختلفت عن ما ذكره [25] بان عزلة الفطر *A. flavus* قد اعطت نتائج جيدة في انتاج انزيم السليوليز بعد معاملتها بمادة الصودا الكاوية وباستخدام مادة نشارة الخشب الكاربوني .

جدول (2): كفاءة العزلات الفطرية على إنتاج انزيم السليوليز باستخدام الوسط السائل

العزلات الفطرية	الكتلة الحيوية غم/لتر	فعالية انزيم السليوليز وحدة/مل	الاس الهيدرودجيني النهائي
Aspergillus niger	13.63	***8.21	4.35
Alternaria alternate	10.48	4.72	4.26
Penicillium sp	12.55	7.59	4.57
Chaetonium sp.	8.48	4.35	4.51
Cladosporium	10.83	5.27	4.95
Fusarium solani	5.93	*2.88	3.74
Macrophomina	6.37	3.25	4.52
Rhizopus sp	11.10	***5.68	5.26
Rhizoctonia solani	7.54	**3.76	6.17
Aspergillus flavus	7.50	3.15	4.39

كل قيمة هي معدل لمكررين.

***pH الاولي = 6**

تأثير مصادر كاربونية مختلفة على إنتاج انزيم السليوليز بوساطة عزلة الفطر *Aspergillus niger* بعد 7 أيام من التحضين:

تم اختيار خمس انواع من السكريات وهي (سكروز، كلوكوز، نشا، سليوبايوز وكاربوكسي مثيل سليلوز) كمصادر كاربونية لتنمية عزلة الفطر *A. niger* وتم اختيار هذه العزلة لانها الاكفا في انتاج انزيم السليوليز حيث أضيفت هذه السكريات بنسبة 10غم/لتر من الوسط الغذائي ويبين جدول (3) ان السكريات المستخدمة كمصادر كاربونية قد اظهرت اختلافا واضحا في انتاج انزيم السليوليز حيث بلغت الفعالية الانزيمية عند استخدام المصدر الكاربوني كاربوكسي مثيل سليلوز (8.15) وحدة/مل، بينما اعطى المصدر الكاربوني سليوبايوز فعالية انزيمية بلغت (6.36) وحدة/مل في حين بلغت الفعالية الانزيمية في المصدر الكاربوني السكروز (6.33) وحدة/مل بينما أعطت المصادر الكاربونية الكلوكوز والنشا اقل فعالية انزيمية والتي بلغت (3.72 و2.53) وحدة/مل على التوالي.

أما بالنسبة لانتاجية الكتلة الحيوية فقد بينت النتائج ان المصدر الكاربوني كاربوكسي مثيل سليلوز اعطى اعلى انتاجية للكتلة الحيوية والتي بلغت (13.74) غم/لتر، يليه المصدر الكاربوني السكروز الذي اعطى انتاجية للكتلة الحيوية بلغت (8.61) غم/لتر واعطى المصدر الكاربوني الكلوكوز كتلة حيوية بلغت (7.30) غم/لتر.

وفيما يخص الاس الهيدروجيني النهائي فنلاحظ من النتائج ان هناك انخفاض في قيمة الاس الهيدروجيني النهائي عن الاس الهيدروجيني الاولي (6.0) في جميع المصادر الكاربونية المستخدمة اذ وصل الانخفاض في الأس الهيدروجيني النهائي عند استخدام المصادر الكاربونية كاربوكسي مثيل سليلوز ، النشا والسليوبايوز الى القيم (4.2 و4.1 و4.02) على التوالي. ويعزى سبب ذلك الى قابلية هذه السكريات على تحفيز ا لفطر على انتاج حوامض عضوية تعمل على تقليل الاس الهيدروجيني لوسط التنمية . جائت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه [26] اذ اعطى المصدر الكاربوني كاربوكسي مثيل سليلوز والسليوبايوز اعلى فعالية لانتاج السليوليز باستخدام عزلة الفطر *T. viride*.

كما جاءت النتائج مطابـقة لما ذكره [27] اذ بينت ان استخدام مادة الكاربوكسي مثيل سليلوز ونشارة الخشب ١% كمصدر كاربوني قد اعطت الانتاجية القصوى لانزيم السليوليز بواسطة عزلة الفطر *A. niger*.

جدول (3): تأثير مصادر كاربونية مختلفة على انتاج انزيم السليوليز لعزلة الفطر*A.niger* بعد 7 ايام من التحضين.

المصدر الكاربوني	الكتلة الحيوية غم/لتر	فعالية انزيم السليوليز وحدة/مل	الاس الهيدروجيني النهائي
سكروز	8.16	6.33	4.25
كلوكوز	7.30	3.72	5.43
نشا	5.68	2.53	4.11
سليوبايوز	5.44	6.36	4.02
كاربوكسي مثيل سليلوز	13.74	8.15	4.20

كل قيمة هي معدل لمكررين.

***pH الاولي = 6**

تأثير تراكيز مختلفة من المصدر الكاربوني كاربوكسي مثيل سليلوز على انتاج انزيم السليلوز بواسطة عزلة الفطر A.niger بعد 7 أيام من التحضين.

تبين نتائج الجدول (4) تاثير استخدام تراكيز مختلفة من المادة الاساس (كاربوكسي مثيل سليلوز) بتراكيز هي (8 ,10, 12, 14) غم/لترعلى انتاج انزيم السليوليز، ويلاحظ من النتائج التي تشير الى ان فعالية انزيم السليوليز تزداد بزيادة تركيز المادة الأساس، اذ بلغت اعلى فعالية للانزيم (8.67) وحدة/مل عندما كان تركيز المادة الأساس (12) غم/لتر، الا ان فعالية الا نزيم بدأت بالتناقص عندما ازداد تركيز الكاربوكسي مثيل سليلوز عن (12) غم/لتر ووصلت إلى (6.27) وحدة/مل عند التركيز (14) غم/لتر كما سجلت الكتلة الحية اعلى قيمة لها عند نفس تركيز المادة الأساس الذي أعطى أعلى فعالية انزيمية بلغت (13.88)غم/لتر، بينما سجل الاس الهيدروجيني النهائي تناقصا عن الاس الهيدروجيني الاولي ولجميع القيم المستخدمة في التجربة . ويمكن تفسير النتائج بان الانزيم المنتج من قبل الفطر قد وصل الى درجة التشبع بالنسبة للمادة الأساس المستخدمة في التجربة [4] وبهذا فان عملية الزيادة في تركيز المادة الأساس قد سببت إعاقة في عمل الانزيم، وهذا مطابق لما أشار إليه [22] حيث ذكر بان الزيادة في تركيز الكلوكوز (كمادة أساس) يؤثر بشكل واضح في إعاقة الانزيمات المنتجة من قبل *A. niger* كما رافقه انخفاض في قيمة pH وسط التخمر الى (2.0). كما ان النتائج جاءت مخالفة لما ذكره [28] حيث لاحظ زيادة انتاجية انزيم السليوليز من قبل الفطر *A. terreus* عند استخدام وسط بذور الفول السوداني كمادة أساس.

جدول (4): تأثير تراكيز مختلفة من المصدر كاربوكسي مثيل سليلوز على انتاج انزيم السليوليز بواسطة عزلة الفطر *A.niger* بعد 7 أيام من التحضين.

تركيز المصدر الكاربوني غم/لتر	الكتلة الحيوية غم/لتر	فعالية انزيم السليوليز وحدة/مل	pH النهائي
8	8.42	5.69	4.53
10	13.52	8.52	4.62
12	13.88	8.67	4.35
14	10.05	6.27	4.11

تأثير درجات الحرارة المختلفة على إنتاج انزيم السليوليز بواسطة عزلة الفطر *A.niger* بعد 7 أيام من التحضين:

تعد درجات الحرارة احد العوامل المهمة التي تؤثر على انتاجية الانزيم وتبين النتائج في الجدول (5) تأثير درجات الحرارة على فعالية انتاج انزيم السليوليز اذ سجلت اعلى فعالية للانزيم والتي بلغت (8.36) وحدة/مل عند درجة الحرارة (30° م) ويلاحظ انخفاض فعالية الانزيم بزيادة

درجات الحرارة عند القيمة المذكورة أعلاه كما سجلت الكتلة الحيوية أعلى قيمة لها عند نفس درجة الحرارة وبلغت (15.18)غم/لتر والتي بدورها بدأت تتناقص عند زيادة درجة الحرارة عن(30 °م). اما الاس الهيدروجيني النهائي فقد حصل فيه انخفاض عن الاس الهيدروجيني الأولي ولجميع قيم الدرجات الحرارية المستخدمة في التجربة.

ويمكن تفسير ذلك ان الانزيمات هي بروتينات واذا ما ارتفعت او انخفضت درجة الحرارة في نطاق محدود مابين 35–55م° بصورة عامة فان الانزيمات تبدأ بالتحوير في حالة زيادة درجة الحرارة وتفقد فعاليتها فلكل انزيم درجة حرارة تكون فعالية الانزيم في اوجها تدعى Optimum temperature واذا ازدادت فان الانزيم يبدأ بالتحوير ويفقد فعاليته [4] كما ان زيادة إنتاج الفطر للحوامض العضوية أدى الى انخفاض في الأس الهيدروجيني النهائي إلى الدرجة الحامضية [26].

في دراسة أشار إليها [23] ان افضل انتاجية لانزيم السليوليز في الوسط الصلب من قبل الفطر *A. niger* كانت تتراوح مابين (28–34° م) وهي نفس النتيجة التي اشار اليها [22] على نفس الفطر . كما اشار [29] ان أقصى انتاجية لانزيم السليوليز من قبل *T.reesi* في الوسط السائل والتي بلغت (56.5) وحدة/مل قد سجلت عند درجة الحرارة 28° م وقد انخفضت الإنتاجية عند زيادة درجة الحرارة عن (28° م).

جدول (5): تأثير درجات الحرارة المختلفة على إنتاج انزيم السليوليز بواسطةعزلة الفطر *A.niger* بعد 7 أيام من التحضين.

درجات الحرارة	الكتلة الحيوية (غم/لتر)	فعالية انزيم السليوليز وحدة/مل	pH النهائي
20	8.92	4.85	4.70
25	12.55	7.47	4.53
30	15.18	8.36	4.27
35	10.63	5.27	3.90
40	6.77	3.85	4.52

تأثير الاس الهيدروجيني الاولي على إنتاج انزيم السليوليز بوساطة عزلة الفطر *A.niger* بعد 7 أيام من التحضين:

ان لدرجة الاس الهيدروجيني تاثير كبير على نمو الكائنات المجهرية اذ يؤثر التغير في قيمة الاس الهيدروجيني بشكل سلبي او ايجابي على نمو هذه الاحياء حيث ان لكل كائن اس هيدروجيني امثل يعمل عنده . بالنسبة لفعالية انزيم السليوليز فقد كانت متباينة بالنسبة للأسس الهيدروجينية المختلفة وقد تحققت اعلى فعالية انزيمية عند الاس الهيدروجيني (5.5) اذ بلغت (9.22) وحدة/مل بينما اعطى الاس الهيدروجيني الاولي (6.0) فعالية انزيمية بلغت (8.15)

وحدة/مل. اما فيما يخص الاس الهيدروجيني النهائي فقد حصل فيه انخفاض عن الاس الهيدروجيني الاولي ولجميع قيم الاس الهيدروجيني المستخدمة ان تفسير هذه النتائج بان للاس الهيدروجيني تأثير على سلوك الانزيمات حيث ان لكل انزيم اس هيدروجيني مثالي يكون الانزيم فعال فيه بدرجة كبيرة ، ولكون الانزيمات مواد بروتينية فان التغير في قيمة الاس الهيدروجيني سيؤثر على الصفات الايونية للمجاميع الامينية والكاربوكسيلية الموجودة في جزيئة البروتين وهذا يؤدي الى التاثير على المواقع الفعالة للانزيم . كما تؤدي الزيادة او النقصان في قيمة الاس الهيدروجيني الى التاثير على الحالة الطبيعية للبروتين وبالتالي الاقلال من فعالية الانزيم [30-4]. هذه النتائج جاءت مطابقة لما أشار إليه [25] حيث سجلت أعلى فعالية لانزيم السليوليزمن قبل *T.viride* عند الاس الهيدروجيني (5.5). كما أشار [31] إلى ان فعالية انزيم السليوليز المنتج من قبل الفطر *A. niger* لها مدى واسع من الاس الهيدروجيني يتراوح مابين (3–9).

يبين الجدول (6) تأثير الاس الهيدروجيني الاولي على نمو الفطر *A. niger* ونلاحظ من خلال النتائج ان للاس الهيدروجيني الاولي تأثير على نمو الفطر اذ ان معدل نمو الفطر قد ازداد بزيادة درجة الاس الهيدروجيني الاولي نحو الحامضية اذ بلغت الكتلة الحيوية للفطر أعلى قيمة لها عند استخدام الاس الهيدروجيني الاولي 5.5 (13.72) غم/لتر ثم بدأت الكتلة الحيوية بالتناقص عند زيادة الاس الهيدروجيني الاولي الى القيمة 6.0 وبلغت الكتلة الحيوية (13.43) غم/لتر.

جدول (6): تأثير الاس الهيدروجيني الاولي على إنتاج انزيم السليوليز لعزلة الفطر *A. niger* بعد 7 أيام من التحضين.

الاس الهيدروجيني الاولي	الكتلة الحيوية غم / لتر	فعالية انزيم السليوليز وحدة / مل	الاس الهيدروجيني النهائي
3.5	4.59	2.86	2.16
4.0	6.28	3.55	3.52
4.5	6.85	4.22	3.75
5.0	8.16	5.52	4.39
5.5	13.72	9.22	4.17
6.0	13.34	8.15	4.55

كل قيمة هي معدل لمكررين.

References:

1) Bhat, M. K. 2000. Cellulose and related enzymes in biotechnology. Biotech. Adv. 18:355-383.

2) Singh, A.; Singh, N. and Bishnoi, N. R. 2009. Production of cellulases by *Aspergillus heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation. J. Environmental Science and Engeneering. 1:1. 23-26.

3) Voragen, A. G. J.; Hentink, R. and Pilnik, W. 1980. Solubilization of apple cell wall with polysacchariede degrading enzymes. J. Appl. Biochem. 2:4. 52-68.

4) Simeon, O. K.; Emma, W. G.; Bridget, O. O. and Olusola, O. S. 2006. Purification and biochemical characterization of carboxymethyl cellulose (CMCase) from a catabolite repression insensitive mutant of *Bacillus pumilus.* J. Agri-Biol. 8: 286-292.

5) Shin, C. S.; Lee, J. P.; Lee, I. S. and Park, S. C. 2000. Enzyme production of *T. reesei* Rut C-30 on various lignocellulosic substrates. Appl. Bioch. 84-86 (1-9).

6) Liu, J. and Yang, J. 2007. Cellulase production by *Trichoderma koningii* AS3. 4262 in solid state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry. Food Technol. Biotechnol. 45:420-425.

7) Chen, P. J.; Wei, T. C.; Change, Y. T. and Lin, L. P. 2004. Purification and charachterization of carboxymethyl cellulose from *Sinorhizobium fredii.* Bot. Bull. Acad.sci.:111-118.

8) Bijender, K. B.; Himani, P.; Masood, A. W.; Priyanka, S. and Ajay, S. 2009. Partial Purification and charachterization of highly thermostable and pH stable endogluconase from anewaly isolated *Bacillus* strain M-9. India. J. Chemi. technol. 16: 382-387.

9) Webr, J. and Agbleron, F. A. 2005. Microbubble fermentation of *Trichoderma reeseifor* cellulose production. Process. Biochemist. 40: 669-676.

10) Wen, Zh. Y.; Liao, W. and Chen, S. L. 2005. Production of cellulose by *Trichoderma reesei* from dairy manure Bioreson. Technol. 96: 91-99.

11) Johnson, L. E.; Curl, E. A.; Bomd, J. H. and Fribourg, H. A. 1959. Methods for studying Soil Microflora-Plant Disease Relationship. Burgess pub. Com. USA.

12) Booth, C. 1971. Methods in Microbiology. Common Wealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. Pp. 20-23.UK.

13) Benson, H. J. 2002. Microbiological Applications. 8th ed. Mc Graw-Hill Companies, Inc. USA. Pp. 22-105.

14) Elliis, M. B. 1971. Dematiaceouse hypomycetes. Common Wealth mycological Institute. Kew, Surrey England. 608 pp.UK.

15) Pitt, J. I. and Hocking, A. D. 1997. Fungi and Food Spoilage 2nd ed. Gaithersburg, Maryland. 593 pp.USA.

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

17) Mandles, M. and Strenbery, D. 1976. Recent advances in cellulose technology. J. Ferment. Technol. 54: 267-286.

18) Zaldivar, M.; Velasqes, J. C.; Contreras, I. and Perez, L. M. 2001. *Trichoderma aureovinda* T-121, Amutant with enhanced production of lytic enzymes: Its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Electron. J. Biotechnol. 3: 160-168.

19) Lakshmi, A. S. and Narasimha, G. 2012. Production of cellulases by fungal culture isolated from forest litter soil Ann.For.Res.:55.

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

21) Bokhary, H. A. and Parrez, S. 1994. Extracellular cellulose enzyme production by soil mycoflora in Saudia Arabia. King saud Univ: 6:137-148.

22) Gokhale, D. V.; Patil, S. G.; Bastawde, K. B. 1991. Optimization of cellulose production by *Aspergillus niger* NCIM 1207. Appl-Biochem-Biotechnol. 30: 99-109.

23) Luiza, J. 2000. Solid-state fermentation of agricultural wastes for endogluconaes production. Industrial Crops and Products. 11. 1-5.

24) El-Refai, A. M. h.; Atalla, M. M. and El-Safty, h. A. 1984. Microbial formation of cellulases and proteins from cellulosic residues. Agri. wastes. 11: 105-113.

25) Ojumu, T. V.; Solomon, B. O.; Betko, E.; Layokun, S. K. and Amigun, B. 2003. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. Afri. J. of biotech. 2(6): 150-152.

٢٦) عبد الهادي، شمال يونس . 2010. تحديد كفاءة بعض العزلات الفطرية المحلية في إنتاج انزيم السليوليز. مجلة تكريت للعلوم الصرفة.

27) Narasimha, G.; Sridevi, A.; Buddolla, V.; Subhosh, C. M.; Rajasekhar, R. B. 2006. Nutrient effect on production of cellulytic enzymes by *Aspergillus niger*. Afri. J. of Biotech. 5: 472-476.

28) Ashish, V.; Deepak, V. and K. M. Vyas. 2005. Production and optimization of cellulases on pretreated groundnut shell by *Aspergillus terreus* AV49. J. of Sci. and Idustr. Res. 64:281-286.

29) Reeta, R. S.; Rajeev, K. S.; Anu, P.; Prema, P.; George, S. and Ashok, P. 2006. Solid-state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulose production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. Indian J. of Biotech. 5: 332-336.

٣٠) دلالي، با سل كامل . 1990. موضوعات مختارة في التكنولوجيا الحيوية . دار الكتب للطباعة والنشر. مطبعة جامعة الموصل. العراق.

31) Gokhan, C.; Burhan, A.; M. Nisa U.; Hatice, G. 2002. Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain.Turk J. Biol. 209-213.