تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز من الفطر Trichoderma fertile

أ. م. د. علي عبد الكاظم الغانمي / جامعة كربلاء ـ كلية العلوم ـ قسم علوم الحياة
* حوراء عباس حيدر / جامعة كربلاء ـ كلية العلوم ـ قسم علوم الحياة
المراسلات إلى : أ. م. د. علي عبد الكاظم الغانمي

* البحث مستل من رسالة طالبة الماجستير حوراء عباس

الخلاصة :

اختيرت العزلة الفطرية المحلية *Trichoderma fertile* كأكفأ عزلة لإنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز وذلك بعد غربلة شملت 25 عزلة فطرية عائدة لأجناس مختلفة ، كما درست الظروف البيئية لإنتاج الإنزيمين المشار إليهما من العزلة *Trichoderma fertile* وأوضحت النتائج أن استخدام الحاضنة الهزازة بسرعة رج 125 دورة / دقيقة بدرجة حرارة 30 مْ لمدة 96 ساعة كانت أفضل الظروف للحصول على أعلى حصيلة من الإنزيمين .

ABSTRACT

The local Fungal Isolate *Trichoderma fertile* was chosen as the most efficient isolate for Chitinase and β 1-3 glucanase production after screening 25 fungal isolates belong to different genes . The environmental conditions for both enzymes production from *Trichoderma fertile* were studied and the results showed that incubation in a rotary shaker with 125 rpm at 30 ˚C for 96 h. gave the highest yields of both enzymes .

المقدمة (Introduction)

تشير الإحصائيات العالمية إلى أن ما يقرب من 30 % من النباتات تتعرض للتلف بفعل الممرضات النباتية[1] وتحتل الفطريات و الحشرات الصدارة من بين الممرضات المذكورة نظراً لشدة ضراوتها في إحداث الخسائر المشار إليها و خاصة في المحاصيل الاقتصادية المهمة .

وعلى الرغم من استخدام المبيدات الكيميائية في الحد من تلك الممرضات إلا أن استخدام هذا النوع من المكافحة بدأ يقترن بظهور العديد من المشاكل مثل صعوبة تكسير هذه المبيدات مما يؤدي إلى تركيزها و / أو تجمعها في السلاسل الغذائية إلى الحد الذي يتسبب بظهورها بمستويات عالية السمية في الحيوانات ، و تقليل الفلورا الطبيعية في التربة ، وتلوث المياه الجوفية وتقليل التنوع الإحيائي فضلاً عن ظهور سلالات من المسببات المرضية مقاومة لتأثير بعض المبيدات الكيميائية[1,2] لذا فقد انصبت الدراسات حول إيجاد البديل المناسب للمكافحة الكيميائية وتكللت الجهود بظهور السيطرة الحيوية (Biological control) التي تعد التقنية الواعدة بالمحافظة على الإنتاج الزراعي ، كما تتميز بكونها عوامل صديقة للبيئة أولاً وغير ضارة بصحة الإنسان ثانياً فضلاً عن كفاءة استخدامها ثالثاً.

تتكون جدران الفطريات من تركيب معقد من الكايتين (chitin) و (1-3 و 1-6) بيتا- كلوكان (glucan β 1-6 , 1-3) و المانان (mannan) و البروتين (protein) ، ويتباين هذا التركيب المعقد باختلاف الأنواع المختلفة للفطريات[3] .

وتعد الإنزيمات المحللة لجدران الفطريات عوامل سيطرة حيوية مهمة إذ تقوم إنزيمات الكايتينيز (Chitinases) وبيتا1-3 كلوكانيز (β 1-3 glucanases) بتكسير الكايتين و الكلوكان الداخلة في تركيب معقد جدران الفطريات على التوالي .

وتميزت بعض الأجناس الفطرية بإنتاجها الوفير للإنزيمين المشار إليهما لذا فقد استخدمت هذه الأجناس كعوامل سيطرة حيوية كفوءة . ولعل جنس الـ *Trichoderma* واحداً من ابرز عوامل السيطرة الحيوية المستخدمة على المستوى التجاري و ذلك من خلال الآليات المتنوعة التي يمتلكها هذا الجنس و المتمثلة بإفرازه للإنزيمات المحللة و المضادات الفطرية وكونه منافساً للممرضات الفطرية و تحفيزه لنمو النبات[1] .

و نظراً لما تمتلكه الإنزيمات المحللة لجدران الفطريات من أهمية كبيرة في مجال السيطرة الحيوية لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى :

1- غربلة العزلات الفطرية المحلية و تحديد الأكفأ منها في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز .
2- تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج الإنزيمين من العزلة المنتخبة .

المواد و طرائق العمل

اختيار العزلة الفطرية المناسبة :

استخدمت 25 عزلة فطرية تعود لأجناس مختلفة لتحديد أكفأها في إنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا 1-3 كلوكانيز إذ تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة كربلاء ونشطت هذه العزلات على طبق بتري يحتوي على أكار ديكستروز البطاطا (PDA) بدرجة حرارة 28 مئوية لمدة (7-10) أيام .

تحضير وسط الإنتاج :

استخدم وسط الإنتاج الموصوف من قبل(1995) .De La Cruz *et al*[4] مع بعض التحوير لغربلة العزلات الفطرية المستخدمة في هذه الدراسة لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز إذ تم تحضير الوسط الإنتاجي على النحو الآتي :

استخدمت خميرة الخبز (Baker's Yeast) بنسبة 1 % كمصدر كاربوني وحيد للوسط و أضيف إليها 0.1 % (وزن / حجم) من كل من كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و بعد إتمام عملية الإذابة لهذه المواد عُدِّل الرقم الهيدروجيني إلى 5 أعقبه عملية غليان للوسط لمدة ثلاث دقائق و من ثم ترشيحه بواسطة أوراق ترشيح ، وزع بعدها الوسط في دوارق زجاجية سعة 250 مليلتر بواقع 50 مليلتر /دورق وعقم بجهاز الموصدة لمدة 15 دقيقة ، وبعد انتهاء عملية التعقيم أخرجت الدوارق و بردت إلى درجة حرارة الغرفة لتهيئتها لعملية التلقيح .

تلقيح وسط الإنتاج :

لغرض اختيار العزلة الفطرية الأكفأ في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز لقحت الدوارق الحاوية على الوسط الإنتاجي (كلاً على انفراد) بسبورات الفطريات بواقع 2.5×10^6 سبور / مل من الوسط وتم الحضن بالحاضنة الهزازة بسرعة رج 150 دورة /دقيقة و بدرجة حرارة 30 مئوية لمدة 96 ساعة ، وبعد انتهاء مدة الحضن تم ترشيح الوسط لفصل الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الفطرية الذي استخدم في تقدير فعالية إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز فضلاً عن تقدير البروتين لحساب الفعالية النوعية التي اعتمدت مقياساً لتحديد أفضل إنتاج من الإنزيمين في مراحل الدراسة كلها .

تقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين :

ـ تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز

قدرت فعالية إنزيم الكايتينيز المنتج من الفطر *Trichoderma fertile* تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Yanai *et al.*[5] (1992) مع بعض التحوير ، وذلك بمزج 0.75 مل من المستخلص الإنزيمي مع 0.75 مل من الكايتين الغروي في أنابيب اختبار وحُضِن المزيج في حمام مائي هزاز بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة ساعتين بعدها فُصل محلول المادة الأساس – الإنزيم بالطرد المركزي بسرعة 5000 دورة /دقيقة لمدة 5 دقائق لإيقاف التفاعل ومن ثم أضيف 0.1 مل من محلول منظم البورات تركيز 0.1 مولر ورقم هيدروجيني 9.8 إلى 0.5 مل من الراشح الإنزيمي و وضعت أنابيب الاختبار في حمام مائي مغلي لمدة ثلاث دقائق بالضبط ثم بردت في حمام مائي ثلجي ، بعدها أضيف 3 مل من محلول dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) إلى كل أنبوبة مع الرج جيداً وحُضِن المزيج في حمام مائي هزاز لمدة عشرين دقيقة ثم تمت قراءة الامتصاص على 585 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي .

وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكايتينيز بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من سكر N- اسيتل كلوكوز أمين (N-acetylglucosamine ,GlcNAc) في الدقيقة الواحدة و تحت ظروف التقدير.

ـ تقدير فعالية إنزيم بيتا1-3 كلوكانيز

قدرت فعالية إنزيم بيتا1-3 كلوكانيز المنتج من الفطر *Trichoderma fertile* تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Tangarone *et al.* (1989)[6] مع بعض التحوير ، وذلك بمزج 0.1 مل من المستخلص الإنزيمي مع 0.9 مل من محلول منظم الخلات تركيز 0.1 مولر ورقم هيدروجيني 4.5 الحاوي على 250 مايكروغرام /مل من مادة التفاعل اللامينارين وحُضِن المزيج في حمام مائي بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 30 دقيقة ، أوقف التفاعل بإضافة 1 مل من محلول 3,5 Dinitrosalycilic acid (DNSA) لكل انبوبة اختبار ومن ثم وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة خمس دقائق بالضبط ثم بردت في حمام مائي ثلجي وأضيف 5 مل ماء مقطر لكل أنبوبة ، بعدها تمت قراءة الامتصاص على 540 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي .

وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم بيتا1-3 كلوكانيز بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من سكر الكلوكوز في الدقيقة الواحدة و تحت ظروف التقدير .

ـ تقدير البروتين

استخدمت طريقة Bradford (1976)[7] في تقدير البروتين باستخدام ألبومين المصل البقري بروتيناً قياسياً . واستخدمت الفعالية النوعية كمقياس لإنتاج الإنزيمين والمقارنة .

تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *Trichoderma fertile*

تمت دراسة عدد من العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile* اشتملت هذه العوامل على :

1- طريقة النمو :

حضن وسط إنتاج الإنزيمين الموصوف سابقاً و الملقح بسبورات الفطر *T. fertile* في حاضنة ساكنة و أخرى هزازة باستخدام سرع رج مختلفة هي (50 و 100 و 125 و 150 و 200) دورة / دقيقة .

2- تأثير درجة الحرارة :

درس تأثير درجة الحرارة بحضن وسط الإنتاج الملقح بسبورات الفطر *T. fertile* على درجات حرارة (25 و 30 و 35) مْ .

3- تأثير مدة الحضن :

تم متابعة إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز من الفطر قيد الدراسة لمدة 168 ساعة وذلك بسحب مكررين كل 24 ساعة لتقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين حيث حضن الوسط بدرجة حرارة 30 مْ وبسرعة رج 125 دورة / دقيقة .

النتائج والمناقشة

اختيار العزلة الفطرية المناسبة :

تمت غربلة 25 عزلة فطرية عائدة لأجناس مختلفة لإختبار قابليتها في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز الخارج خلويين (extracellular) وتمت تنمية هذه العزلات على وسط خميرة الخبز المدعم بالأملاح المعدنية وتحت ظروف نمو محددة وأظهرت النتائج المبينة في جدول (1) أن لبعض العزلات الفطرية القابلية على إنتاج الإنزيمين معاً ولكن بدرجات متفاوتة ، بينما اقتصر بعضها على إنتاج إنزيم واحد فقط ، في حين عجزت بعض العزلات عن إنتاج أي من الإنزيمين . إذ تبين أن 60% من العزلات تنتج الإنزيمين بينما 4% من العزلات تنتج فقط إنزيم الكايتينيز بدون إنزيم بيتا1-3 كلوكانيز و 28% تنتج فقط إنزيم بيتا1-3 كلوكانيز بدون إنزيم الكايتينيز ، أما العزلات غير المنتجة لكلا الإنزيمين فتمثل ما نسبته 8% من المجموع الكلي لهذه العزلات . وعند مقارنة قيم الفعالية النوعية يلاحظ أن الفعالية النوعية لإنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز المنتجين من العزلة *Trichoderma* sp. كانت هي الأعلى ، إذ بلغت (93.70 و 6.26) وحدة /ملغم بروتين على التوالي .

جدول (1) : غربلة الفطريات لإختبار قابليتها على إنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز .

الفطر	الفعالية النوعية لإنزيم الكايتينيز (وحدة / ملغم بروتين)	الفعالية النوعية لإنزيم بيتا1-3 كلوكانيز (وحدة / ملغم بروتين)
***Rhizopus* sp.1**	**0.00**	**0.55**
***Rhizopus* sp.2**	**0.00**	**1.88**
***Rhizopus* sp.3**	**2.8**	**1**
***Rhizopus* sp.4**	**1.31**	**1.85**
***Rhizopus* sp.5**	**4.57**	**0.51**
***Rhizopus* sp.6**	**4.46**	**1.15**
***Rhizopus* sp.7**	**5.45**	**1.55**
***Rhizopus* sp.8**	**7**	**0.92**
***Rhizopus* sp.9**	**7.5**	**0.29**
***Penicillium* sp.1**	**3.05**	**0.34**
***Penicillium* sp.2**	**4.04**	**0.11**
***Penicillium* sp.3**	**9.17**	**0.077**
***Penicillium* sp.4**	**2.5**	**0.00**
***Penicillium* sp.5**	**0.00**	**0.00**
Penicillium restrictum	**6.7**	**0.185**
***Aspergillus niger* 1**	**0.00**	**2.31**
***Aspergillus niger* 2**	**6**	**2.29**
Aspergillus ustus	**9.35**	**2.39**
***Aspergillus* sp.1**	**13.67**	**0.184**
***Aspergillus* sp.2**	**0.00**	**2.08**
***Aspergillus* sp.3**	**0.00**	**2**
***Aspergillus* sp.4**	**0.00**	**1**
***Cuninnghamella* sp.**	**0.00**	**0.13**
***Rhizoctonia* sp.**	**0.00**	**0.00**
***Trichoderma* sp.**	**93.70**	**6.26**

وفي ضوء هذه النتائج اختيرت العزلة.sp *Trichoderma* كمصدر لإنتاج الإنزيمين كونها أكفأ العزلات المستخدمة والتي شخصت فيما بعد على أنها *Trichoderma fertile* .

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ورد في دراسات سابقة ، إذ اختيرت بعض الأنواع العائدة لجنس *Trichoderma* المتمثلة بـ *T. harzianum* -8 و *T. atroviride* PTCC5220 و *T. longibrachiatum* PTCC5140 لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز من بين 30 عزلة فطرية[8] . إن تفوق جنس الـ *Trichoderma* في إنتاج الإنزيمين المشار إليهما متوقعاً نظراً لأن هذا الجنس يعد من أهم عوامل السيطرة الحيوية وأكثرها شيوعاً في العالم[9] .

تحديد الظروف البيئية المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *Trichoderma fertile* :

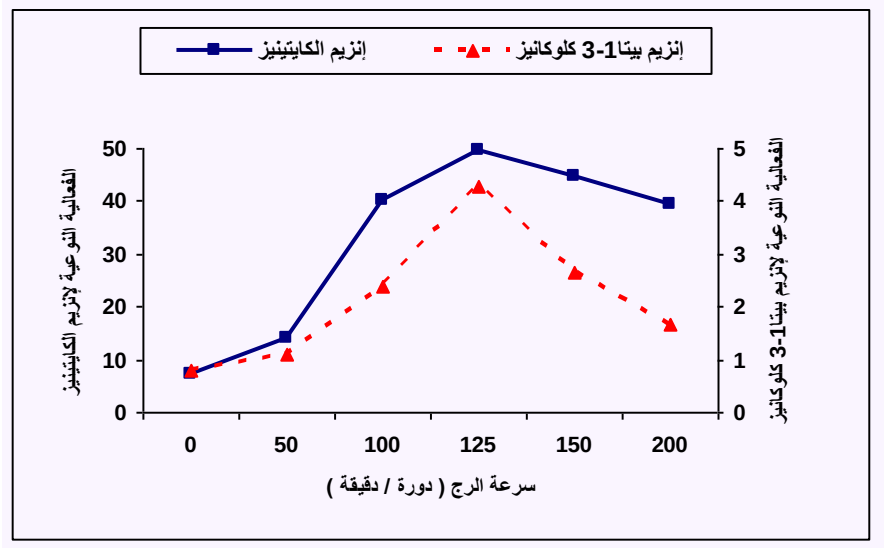
1- طريقة النمو :

يتضح من الشكل (1) أن إنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز يكون أعلى عند استخدام الحاضنة الهزازة و بسرعة رج 125 دورة /دقيقة إذ بلغت الفعالية النوعية (49.74 و 4.28) وحدة /ملغم بروتين لإنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز على التوالي ، بينما كانت أوطأ فعالية نوعية باستخدام الحاضنة الساكنة إذ بلغت 7.12 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز و 0.79 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم بيتا1-3 كلوكانيز .

إن استخدام الحاضنة الهزازة في إنتاج الإنزيمات بوساطة الأحياء المجهرية الهوائية كالأعفان يسمح بالاستغلال الأمثل لمكونات البيئة فضلاً عن تكوين طبقة رقيقة نسبياً من البيئة المهواة بوساطة الانتشار خلال سطح السائل عن طريق الحركة الرحوية للرج ، وبذلك يسمح الرج أو التحريك بمزج و تجانس مكونات البيئة بشكل جيد و كفوء بحيث يستطيع الفطر من النمو في اتزان بين الإمداد من الهواء في الأعلى والإمداد من المواد المغذية في الأسفل[12,11,10] . كما يلاحظ من الشكل (1) أيضاً أن الفعالية النوعية للإنزيمين انخفضت بزيادة سرعة الرج إذ بلغت 39.39 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز و 1.68 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم بيتا1-3 كلوكانيز عند سرعة رج 200 دورة /دقيقة .

إن السرع العالية من الرج لا تؤدي إلى زيادة في فعالية الإنزيمين و ربما يعزى ذلك إلى القوة الميكانيكية الكبيرة التي تؤدي إلى تكسر الغزل الفطري[13] .

و في ضوء هذه النتيجة اختيرت الحاضنة الهزازة بسرعة رج 125 دورة /دقيقة لإنتاج الإنزيمين من الفطر *T. fertile* و اعتمدت في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها . و تعد النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة مماثلة لدراسات أخرى حيث استخدمت سرعة رج مقدارها 120 دورة /دقيقة لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. virens* UKM1 [14] و إنزيم بيتا-كلوكانيز من الفطر *Rhizopus microsporus* var *icrosporus* [15] . وتم إنتاج كلا الإنزيمين من الفطر *Stachybotrys elegans* باستخدام الحاضنة الهزازة بسرعة رج 110 دورة /دقيقة [16] .

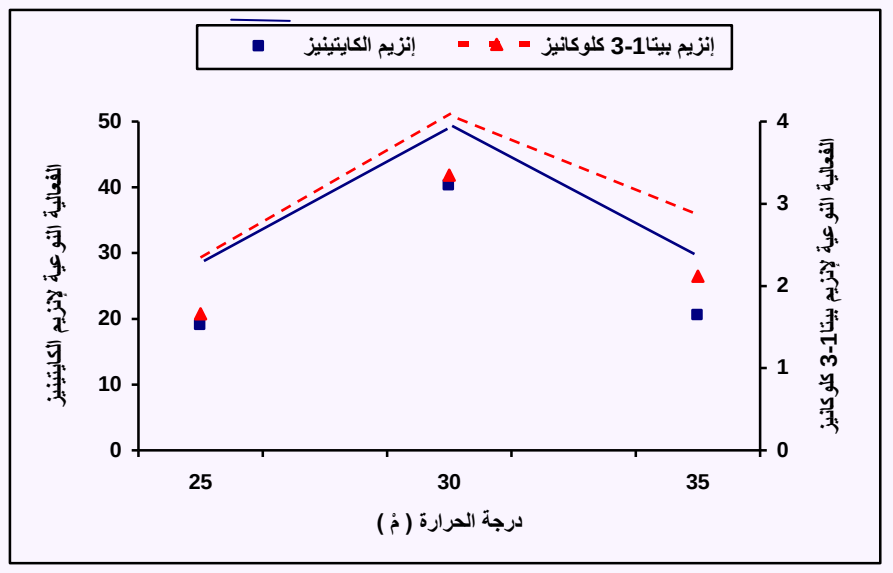


الشكل (1) : تأثير طريقة النمو في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile*

2- تأثير درجة الحرارة :

درس تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile* . ويتضح من الشكل (2) أن أعلى فعالية نوعية للإنزيمين كانت باستخدام الدرجة الحرارية 30 مْ ، إذ بلغت 40.27 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز و 3.35 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم بيتا1-3 كلوكانيز ، في حين انخفضت الفعالية النوعية للإنزيمين باستخدام الدرجتين الحراريتين (25 و 35) مْ . و في ضوء هذه النتائج فقد تم اختيار الدرجة الحرارية 30 مْ كأفضل درجة حرارة لإنتاج الإنزيمين و اعتمدت في التجارب اللاحقة كافة .

إن النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة تؤيد ما ورد في العديد من الدراسات فقد كانت درجة الحرارة 30 مْ هي المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* [17] .



الشكل (2) : تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile*

3- تأثير مدة الحضن :

تم متابعة إنتاج الإنزيمين من الفطر *T. fertile* خلال سبعة أيام من التخمر وذلك بسحب كمية من وسط التخمر يومياً لتقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين ، كما تمت متابعة تغيرات الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر خلال المدة المذكورة من التخمر .

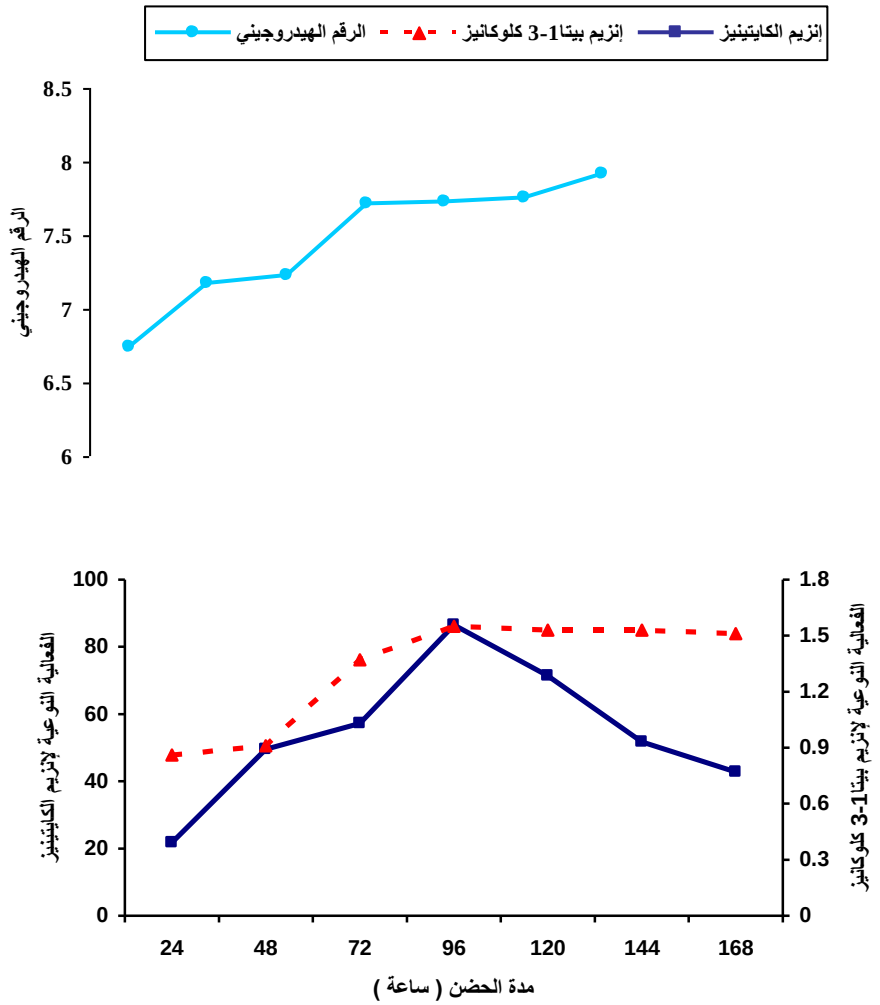
يتضح من الشكل (3) أن إنتاج الإنزيمين يبدأ بعد 24 ساعة من التخمر بفعالية نوعية 21.79 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز و 0.86 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم بيتا1-3 كلوكانيز ليصل إلى أقصاه بعد 96 ساعة من التخمر بفعالية نوعية (86.49 و 1.55) وحدة /ملغم بروتين لإنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز على التوالي .

وبعد مدة الحضن المثالية يبدأ إنتاج الإنزيمين بالانخفاض تدريجياً إذ تصل الفعالية النوعية في اليوم السابع إلى (42.76 و 1.51) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز على التوالي .

إن الانخفاض في إنتاج الإنزيمين بعد مدة الحضن المثالية قد يعزى إلى انخفاض مستوى المواد المغذية في الوسط بما ينعكس على مستوى تخليق الإنزيم فضلاً عن احتمال مسخ الإنزيمين بوساطة إنزيم البروتييز المنتج من الفطر نفسه[18] .

وفي ضوء هذه النتائج فقد تم تثبيت مدة حضن قدرها 96 ساعة لأفضل إنتاج من الإنزيمين وتم استخدامها في التجارب كافة، وتتفق هذه النتائج مع الدراسة التي أشارت إلى أن مدة حضن 96 ساعة هي الأفضل للحصول على أقصى إنتاج من إنزيم الكايتينيز من الفطر *Aspergillus terreus* [19] . كما استخدمت مدة الحضن المذكورة لإنتاج إنزيم بيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *T. viride* TP09 [20] ، بينما كانت مدة حضن مقدارها 72 ساعة هي الأفضل لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* 1051 [21] .

يلاحظ من الشكل (3) أيضاً أن الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر يبدأ بالارتفاع بعد 24 ساعة من التخمر ليصبح 6.75 ثم يستمر بالارتفاع ليصل إلى 7.72 بعد 96 ساعة حيث يصل إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز إلى أقصاه ، و بلغ أقصى ارتفاع لهذا الرقم 7.92 في اليوم السابع من التخمر . وتتفق هذه النتيجة مع ما أشارت إليه بعض الدراسات إذ لوحظ ارتفاع الرقم الهيدروجيني من 7 إلى 8.5 في وسط إنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Serratia marcescens* GG5 [22] .



الشكل (3) : تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile*

المصادر

1. Kucuk, C. and Kivanc, M. (2003) . Isolation of *Trichoderma* Spp. and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features . Turk J. Biol. , 27:247-253 .
2. Sharma, N. ; Sharma, K. P. ; Gaur, R. K. and Gupta, U. K. (2011) . Role of Chitinase in Plant Defense . Asian Journal of Biochemistry , 6(1): 29-37 .
3. Adams, D. J. (2004) . Fungal cell wall chitinases and glucanases . Microbiology , 150: 2029-2035
4. De La Cruz, J. ; Pintor-Toro, J. A. ; Benitez, T. ; Llobell, A. and Romero, L. C. (1995) . A Novel Endo-β-1,3-Glucanase, BGN13.1, Involved in the Mycoparasitism of *Trichoderma harzianum* .Journal of Bacteriology , 177(23): 6937-6945 .
5. Yanai, K. ; Takaya, N. ; Kojima, N. ; Horiuchi, H. ; Ohta, A. and Takagi, M. (1992) . Purification of Two Chitinases from *Rhizopus oligosporus* and Isolation and Sequencing of the Encoding Genes . Journal of Bacteriology , 174: 7398-7406.
6. Tangarone, B. ; Royer, J. C. and Nakas, J. P. (1989) . Purification and Characterization of an Endo-(1,3)-β-D-Glucanase from *Trichoderma longibrachiatum* . Applied and Environmental Microbiology , 55(1): 177-184.
7. Bradford, M. M. (1976) . A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding . Analytical Biochemistry , 72: 248-254 .

8. Matroudi, S. ; Zamani, M. R. and Motallebi, M. (2009) . Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot . Egyptian Journal of Biology , 11: 37-44 .

9. Rajendiran, R. ; Jegadeeshkumar, D. ; Sureshkumar, B.T. and Nisha, T. (2010) . *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens . Journal of Agricultural Technology , 6(1): 31-35 .

10. Rhodes, A. and Fletcher, D. L. (1966) . Principles of industrial microbiology. 1st ed. Pergamon Press , Oxford .

11. Casida, L. E. Jr. (1968) . Industrial microbiology . John Wiley and Sons , Inc. , New York .

12. Stanbury, P. F. and Whitaker, A. (1984) . Principles of fermentation technology . 1st ed. Pergamon Press , Oxford .

13. Wang, L. ; Ridgwaya, D. ; Gua, T. and Moo-Young, M. (2005) . Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations . Biotechnology Advances , 23: 115-129 .

14. Abd-Aziz, S. ; Sin, T. L. ; Alitheen, N. ; Shahab, N. and Kamaruddin, K. (2008) . Microbial Degradation of Chitin Materials by *Trichoderma virens* UKM1 . Journal of Biological Sciences , 8(1): 52-59 .

15. Celestino, K. R. S. ; Cunha, R. B. and Felix, C. R. (2006) . Characterization of a β-glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry . BMC Biochemistry , 7: 23 .

16. Tweddell, R. J. ; Jabaji-Hare, S. H. and Charest, P. M. (1994) . Production of Chitinases and β-1,3-Glucanases by *Stachybotrys elegans*, a Mycoparasite of *Rhizoctonia solani*. Applied and Environmental Microbiology,60(2):489-495.

17. El-Katatny, M. H.; Somitsch, W.; Robra, K.-H.; El-Katatny, M. S. and Gübitz, G. M. (2000). Production of Chitinase and β-1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for Control of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotium rolfsii*. Food technol. biotechnol., 38(3):173-180.

18. Binod, P. ; Sandhya, C. ; Suma, P. ; Szakacs, G. and Pandey, A. (2007) . Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin . Bioresource Technology , 98: 2742-2748 .

19. Ghanem, K. M. ; Al-Garni, S. M. and Al-Makishah, N. H. (2010) . Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus* . African Journal of Biotechnology , 9(32): 5135-5146 .

20. Yi, H. ; Xiong, S. ; Du, M. and Zhang, L. (2008) . Purification and partial characterization of β-glucanase produced by *Trichoderma viride* TP09 isolated from sewage of beer-making . Eur. Food Res. Technol. ,227:821-826.

21. De Marco, J. L. ; Valadares-Inglis, M. C. and Felix, C. R. (2003) . production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis perniciosa* , the causal agent of witches' broom of coca . Brazilian Journal of Microbiology , 34: 33-38 .

22. Singh, G. ; Sharma, J. R. and Hoondal, G. S. (2008) . Chitinase Production by *Serratia marcescens* GG5 . Turk J. Biol. , 32: 231-236 .