تأثير فترات مختلفة من التحضين ومصادر كاربونية مختلفة في إنتاج إنزيم البيتا–كلوكوسايديس بوساطة عُزلة محلية للفطر *Trichoderma harzianum*

طه عبدالوهاب خميس الصميدعي

قسم علوم الحياة ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص:

تم الكشف عن قابلية عزلة محلية للفطر *Trichoderma harzianum* لإنتاج معقد إنزيم السليوليز في الوسط الصلب ولوحظ أن لهذا الفطر فعالية متوسطة في إنتاج هذا الإنزيم إذ بلغت نسبة الفعالية ٣,٨٧٥ .وأعطت هذه العزلة أعلى إنتاجية للبيتا–كلوكوسايديس على أساس كل مل من الوسط الغذائي وكل غرام من الكتلة الحيوية إذ بلغت ٣,٣٦٦ وحدة/مل و ٧٣٤,٩٣ وحدة/غم كتلة حيوية على التوالي عند ثمانية أيام من التحضين . أعطى المصدر الكاربوني السكروز أعلى إنتاجية للبيتا–كلوكوسايديس بلغت ٣,٣١٦ وحدة/مل ، وأعطى الكاربوكسي مثيل سليولوز أعلى إنتاجية للبيتا كلوكوسايديس على أساس الكتلة الحيوية حيث بلغت ١٣٤٨٦,٣ وحدة/غم كتلة حيوية .

الكلمات الدالة: *Trichoderma harzianum* ، فعالية السليوليز، بيتا–كلوكوسايدز.

المقدمة:

يمثل السليلوز الذي هو عبارة عن متعدد وحدات الكلوكوز الحلقي والمرتبطة مع بعضها بالآصرة الكلايكوسيدية بيتا–١, ٤ ، المركب الرئيسي للجدر الخلوية لخلايا النباتات كما أنه يعتبر أحد المركبات العضوية الأكثر وفرة على سطح الأرض. لقد تم دراسة تكسير السليلوز بوساطة الأحياء المجهرية سواء الفطريات أو البكتريا المنتجة لإنزيم السليوليز من قبل عدد من الباحثين [1-7] إن الغرض من إنتاج إنزيم السليوليز هو محاولة تكسير النفايات السليلوزية (وتحليّة السليلوز) ومحاولة استخدامها في إنتاج ألعلف الحيواني والصناعات النسيجية وصناعة الورق وحيث أن الناتج النهائي لتكسير السليلوز هو سكر الكلوكوز وهذا السكر يمثل احد السكريات السهلة التمثيل من قبل مختلف الأحياء المجهرية المستخدمة في الصناعات التخميرية لإنتاج الكحولات وبروتين أحادي الخلية والحوامض العضوية والمضادات الحيوية وغيرها كما أن لإنزيم السليوليز تطبيقات كثيرة منها استخدامه في الصناعات الكمياوية والطبية والصيدلانية والهندسة الوراثية [8-10]إن تكسير السليلوز بوساطة الأحياء المجهرية يتم بوساطة نظام إنزيمي معقد لإنزيم السليوليز وهذا النظام يتكون من ثلاثة أنواع من الإنزيمات هي اندو– بيتا –١,٤ – كلوكانيز (CMCase, EC 3.2.1.4) واكسو–بيتا –١,٤ – كلوكانيز (Cellobiohydrolase , EC 3.2.1.91) وبيتا –١,٤ – كلوكسايديز (Cellobiase , EC 3.2.1.21) [11-12]

يهدف هذا البحث الكشف عن فعالية احد العزُلات المحلية للفطر *Trichoderma harzianum* لإنتاج معقد إنزيم السليوليز ودراسة تأثير فترات الحضانة المختلفة وبعض المصادر الكربونية على مستويات إنتاج إنزيم البيتا– كلوكوسايديز.

المواد وطرق العمل:

الكائن ألمجهري المستخدم:–

استخدمت عزلة محلية للفطر *T. harzianum* والتي تم الحصول عليها من قسم وقاية النبات / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل/ الموصل /العراق. حفظت عزلة الفطر على وسط البطاطا والدكستروز أكار (PDA) وبشكل مائل في أنابيب اختبار في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ م° وجديد المزارع كل أسبوعين .

الأوساط الزرعية:–

وسط الكشف عن النشاط الإنزيمي للسليلوليز:–

أجري اختبار نوعي باستخدام وسط الزرع الصلب الخاص بالكشف عن فعالية عزلة الفطر *T. harzianum* لإنتاج إنزيم السليوليز، حيث استخدام وسط الكاربوكسي مثيل سليلوز أكار Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC Agar) والذي يتكون من المواد التالية (غم/ لتر من الماء المقطر):– ١,٠ K_2HPO_4 ;٢,٠ $NaNO_3$; ٠,٥ $MgSO_4.7H_2O$; ٠,٥ KCl ;٠,٠١ $FeSO_4$; ١٠,٠ CMC-Na salt ;٢٠,٠ Agar [13] حظر الوسط بإذابة جميع المواد في الماء المقطر ماعدا الـ salt CMC-Naالذي أضيف تدريجيا باستخدام خلاط مغناطيسي مع التسخين حتى يتجانس الوسط ثم ضبط الأس الهيدروجيني عند ٦,٠. عقم الوسط بجهاز المعقام عند ضغط ١ كغم /سم٢ ودرجة حرارة ١٢١م° لمدة ١٥ دقيقة ، وزع الوسط بعد التعقيم في أطباق بتري معقمة تحت ظروف معقمة بواقع ٢٠– ٢٥ مل لكل طبق وتركت الأطباق ليتصلب الوسط فيها وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة ٤م° لحين الاستخدام.

وسط الإنتاج :–

أستخدم الوسط الغذائي الخاص بالإنتاج الذي يتكون من المواد التالية (غم/ لتر من الماء المقطر):– $(NH4)_2SO_4$; ١,٤ KH_2PO4 ; ٢,٠

; $FeSO_4.7H_2O$ ٠,٣ $MgSO_4.7H_2O$; ٠,٣ $CaCl_2$;٠,٣Urea ; $CoCl_2$; ٠,٠٠١٤ $ZnSO_4.7H_2O$;٠,٠٠١٦ $MnSO_4.H_2O$;٠,٠٠٥ ٠,٠٠٢ peptone ; ١,٠ Cellulose ; ١٠,٠ (إلا ما ذكر خلاف ذلك Tween 80) ;٢,٠ مل [14] حيث تم إذابة جميع مكونات الوسط في الماء المقطر عدا اليوريا، وضبط الأس الهيدروجيني عند ٦,٠. ثم وزع الوسط في دوارق زجاجية حجم ٢٥٠ مل بواقع ٥٠ مل / دورق ، سدت الدوارق بسدادات قطنية ثم عقمت تحت نفس الظروف السابقة الذكر ،بعد التعقيم أضيف محلول اليوريا المعقم بالبسترة إلى الدوارق تحت ظروف معقمة . لقحت الدوارق بعد ذلك بعالق أبواغ الفطر بعمر أسبوع في محلول Tween 80 ١% وكان تركيز الابواغ في اللقاح مايقارب ١٠x٥^{٨} بوغ / مل وبتركيز ٢% [15]. حضنت الدوارق بعد التلقيح في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة ٢٨±١م° وبمعدل رج (١٥٠ دورة / دقيقة) ثم سحبت الدوارق من الحاضنة بحسب فترات تحضين معينة.

طرائق التحليل :-

الكشف عن إنتاج إنزيم للسليلوليز:- تم الاستدلال عن إنتاج الإنزيم بملاحظة ظهور هالة فاتحة اللون حول مستعمرة الفطر النامية في وسط الكشف عن انزيم السليوليز والتي أمكن ملاحظتها بعد يومين من التحضين عند درجة حرارة ٢٨±١م° والتي يزداد قطرها باستمرار فترة التحضين دلالة على زيادة قدرة الفطر على إنتاج إنزيم السليوليز باستمرار النمو والتي تعطي دليلا على تحلل الـ CMC بوساطة أنزيم السليوليز المفرز إلى الوسط الصلب . وبعد مرور خمسة أيام من التحضين سحبت الأطباق من الحاضنة وقيس قطر المستعمرة الفطرية النامية وقطر الهالة المتكونة. وتم حساب قابلية عزلة الفطر *Trichoderma harzianum* على إنتاج إنزيم السليوليز باستخدام المعدلة التالية [13] :-

$$\text{قابلية الفطر لإنتاج إنزيم السليوليز} = \frac{\text{قطر هالة التحلل}}{\text{قطر المستعمرة الفطرية}}$$

تقدير الكتلة الحيوية :-

بعد انتهاء فترة التحضين المحددة ، سحبت الدوارق من الحاضنة وتم قياس الرقم الهيدروجيني النهائي لكل دورق بعدها أجريت عملية الترشيح لمحتوى كل دورق من الوسط الغذائي باستخدام ورق ترشيح مجففة وموزونة مسبقآ من نوع (Whatman No.1) مثبتة على قمع بخنر المجهز بمفرغ هواء. بعد الترشيح جففت أوراق الترشيح الحاملة للكتلة الحيوية في فرن كهربائي عند درجة حرارة ٧٠ م° لمدة ٢٤ ساعة. وتم قياس الكتلة الحيوية بفارق الوزنين باستخدام ميزان حساس. ترك الرائق (الراشح) جانبا لقياس الفعالية الإنزيمية للفطر حيث أضيف للرائق Sodium azide بتركيز ٠,٢ % عند عدم استخدامه مباشرة لتقدير كمية الإنزيم المنتج ، ثم حفظ في الثلاجة عند درجة حرارة ٤م° لحين الاستخدام [16].

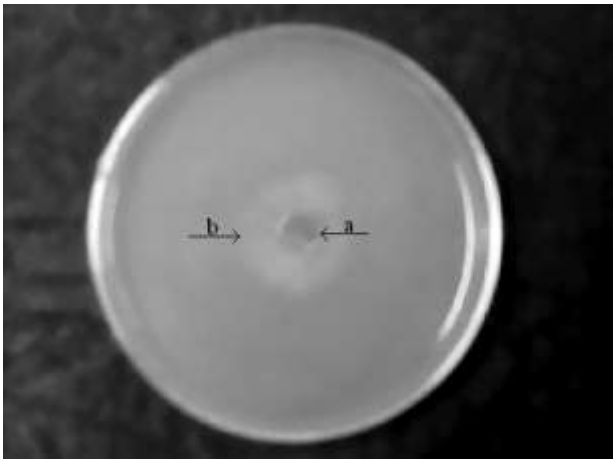
اختبار إنتاج إنزيم البيتا-كلوكوسايديس:-

لتقدير فعالية إنزيم البيتا-كلوكوسايديس المنتج استخدم محلول التفاعل الذي يحتوي على ١ مل من محلول سكر السليوبايوز بتركيز ٠,١ % و ١ مل من محلول Acetate buffer (٥٠ ملي مول) ذو أس هيدروجيني ٤,٥-٥,٠ . وأضيف إلى محلول التفاعل ١ مل من محلول الإنزيم الخام (رائق المزرعة بعد إجراء التخفيفات المناسبة عليه) . بعد ذلك حضن محلول التفاعل عند درجة حرارة ٥٠ م° لمدة ٣٠ دقيقة وتم تقدير الكلوكوز المتحرر خلال تحلل السليوبايوز بواسطة إنزيم البيتا-كلوكوسايديس باستخدام محلول كاشف حامض داي نايتروساليسليك DNSA [17] حيث أضيف ٣ مل من كاشف حامض داي نايتروساليسليك إلى محلول التفاعل الأخير بعد التحضين مباشرة وتم غلي المزيج عند درجة حرارة ١٠٠ م° لمدة ٥ دقائق. بعد تبريد المزيج إلى درجة حرارة المختبر تم قياس كمية الكلوكوز المتحرر باستخدام جهاز المكثاف الضوئي Spectrophotometer طراز (CECIL,CE1021) عند طول موجي ٥٧٥ نانوميتر واستخدم المنحني القياسي للكلوكوز النقي (المحضر بنفس الطريقة الأنفة الذكر) لتقدير الكلوكوز المتحرر. إن الوحدة الواحدة One Unit لإنزيم البيتا-كلوكوسايديس تحدد بقيمة الإنزيم التي تحرر١ مايكرومول من السكر المختزل (D-glucose) لكل دقيقة من الوقت تحت ظروف طريقة الاختبار المستخدمة أنفا ، وقد تم أيضا تحديد وحدة الفعالية النوعية للإنزيم على أساس الكتلة الحيوية المنتجة لكل لتر من الوسط الغذائي والتي تم تقديرها كما ذكر سابقا .

النتائج والمناقشة:-

الكشف عن كفاءة إنتاج معقد إنزيم السليوليز من قبل عزلة الفطر *T. harzianum* باستخدام وسط الكاربوكسي مثيل سليلوز أكار (CMC Agar):-

يلاحظ من الشكل (١) إن عزلة الفطر *T. harzianum* قد أعطت نتيجة موجبة بقدرتها على إنتاج معقد أنزيم السليوليز حيث بلغت النسبة (٣,٨٧٥) وإن هذه النسبة تمثل فعالية متوسطة في إنتاج إنزيم السليوليز، وهذه النتيجة قريبة لما حصل عليها العزو [18] من عزلة الفطر *T.viride* إذ كانت النسبة ٥,٣٢٧ .



شكل ١ :- الكشف عن معقد إنزيم السليوليز المنتج بوساطة عزلة الفطر *T. harzianum*
(a- قطر مستعمرة الفطر ، b- قطر هالة التحلل).

تأثير فترات الحضانة المختلفة على مستويات إنتاج إنزيم البيتا-كلوكوسايديس بوساطة عزلة الفطر *T. harzianum* :-

أظهرت النتائج (جدول ١) إن عزلة الفطر *T. harzianum* ذات إنتاجية متوسطة لأنزيم البيتا- كلوكوسايديس حيث بلغت أقصى إنتاجية ٣,٣٦٦ وحدة/مل عند ثمانية أيام من التحضين .إذ لوحظ زيادة في إنتاجية العزلة

من هذا الإنزيم ابتداء من اليوم الثاني لتصل أقصاها عند اليوم الثامن .ثم لوحظ انخفاض في الإنتاجية بزيادة عدد الأيام لتصل أدناها عند اليوم الأخير (١٤ يوم) من التحضين (٢,٦٣٦) . وهذه الإنتاجية جيدة مقارنة مع ماتم الحصول من قبل عدد من الباحثين فقد ذكر [15] إن العزلة الأبوية للفطر *T.aureoviridia* 7-121 أعطت إنتاجية من البيتا- كلوكوسايديس بلغت ١,٢٥ وحدة/مل ، بينما أعطت نفس العزُلة بعد إجراء تطفير كيميائي عليها ٤,٩ وحدة/مل . بينما حصّل [6] على ٠,٧ وحدة/مل من البيتا- كلوكوسايديس عند ٧ أيام من التحضين باستخدام المزارع المختلطة .

ويلاحظ أيضا من الجدول (١) إن أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية كانت ٩,٢٦ غم/لتر عند اليوم الثاني من التحضين ثم تدرجت الكتلة الحيوية بالنقصان خلال فترات الحضانة المتبقية لتصل في أدناها عند اليوم الأخير (٢,٢٤ غم/لتر) . إن فترة الحضانة يومان التي أعطت أقصى إنتاجية للكتلة الحيوية هي فترة كافية لنمو وإنبات الاسبورات إلى خيوط فطرية جيدة التكوين لتعطي أقصى إنتاجية من الكتلة الحيوية ، وان الاستمرار في انخفاض الكتلة الحيوية خلال فترات الحضانة المتبقية تعطي دليلا على استهلاك المغذيات وزيادة مواد الايض الثانوي التي بدورها تؤدي إلى موت الخلايا وتحللها. أما إنتاجية إنزيم البيتا- كلوكوسايديس على أساس كُل غرام من الكتلة الحيوية فقد ازدادت بزيادة فترة الحضانة لتصل إلى ٧٣٤,٩٣ وحدة/غرام كتلة حيوية عند اليوم الثامن من التحضين ونظرا لكون إنتاجية الإنزيم على أساس الكتلة الحيوية تناسب عكسيا مع الكتلة الحيوية لذلك فإن الإنخفاض المستمر في الكتلة الحيوية خلال فترات الحضانة أدى إلى زيادة في إنتاجية الإنزيم على أساس الكتلة الحيوية في اليوم العاشر ومايليه لتصل في أقصاها عند اليوم الأخير من التحضين حيث بلغت ١١٦٧,٧٨ وحدة/غرام كتلة حيوية إذ بلغت الكتلة الحيوية أدناها ٢,٢٤٠ غم/لتر (جدول ١) . لذلك يعتبر اليوم الثامن من التحضين الأمثل في إنتاجية الإنزيم على أساس كل مِل من الوسط الغذائي وكل غرام من الكتلة الحيوية . وهذه الإنتاجية جيدة نسبيا لِما تم الحصول عليه فقد حصّل [19] على أقصى إنتاجية لإنزيم البيتا- كلوكوسايديس على أساس كل غرام من الكتلة الحيوية والتي بلغت ٢٥٠-٤٣٠ وحدة/غرام كتلة حيوية باستخدام الفطر *T. reesi* . بالنسبة للأس الهيدروجيني فقد لوحظ ارتفاع طفيف في الاس الهيدروجيني النهائي للأيام الأربعة الأولى من التحضين لينخفض بعد ذلك عن الأس الهيدروجيني الأولي (٦,٠) ليصل في أدناه (٥,٢٣٧) عند اليوم الثاني عشر ليرتفع ارتفاعا طفيفا حتى اليوم الأخير.وإن هذا الانخفاض في الأس الهيدروجيني على مدى اغلب أيام التحضين في أوساط التخمر مألوف في التخمرات الصناعية التي تُستخدم فيها أوساط تركيبية ، وقد يرجع ذلك إلى إفراز بعض الحوامض العضوية إلى وسط التخمر [14].

جدول ١ :- تأثير فترات الحضانة المختلفة على مستويات إنتاج إنزيم البيتا- كلوكوسايديز .

فترة الحضانة بالأيام	الكتلة الحيوية غم/لتر	بيتا- كلوكسايديز		الأس الهيدروجيني النهائي
		وحدة / مل	وحدة / غم كتلة حيوية	
2	9.260 (0.056)	2.800 (0.014)	302.37	6.321 (0.030)
3	8.920 (0.010)	2.800 (0.002)	313.90	6.194 (0.070)
4	7.700 (0.021)	2.856 (0.008)	370.90	6.102 (0.006)
5	6.880 (0.007)	2.980 (0.012)	433.14	5.978 (0.022)
6	6.020 (0.085)	3.066 (0.001)	509.30	5.970 (0.060)
7	5.420 (0.044)	3.150 (0.006)	581.18	5.897 (0.005)
8	4.580 (0.110)	3.366 (0.010)	734.93	5.681 (0.001)
9	4.080 (0.039)	2.756 (0.041)	675.49	5.552 (0.009)
10	3.800 (0.081)	2.733 (0.003)	719.21	5.422 (0.000)
11	3.120 (0.072)	2.700 (.0031)	865.38	5.303 (0.006)
12	2.920 (0.011)	2.683 (0.011)	918.83	5.237 (0.047)
13	2.420 (0.101)	2.670 (0.090)	1103.30	5.313 (0.091)
14	2.240 (0.009)	2.636 (0.066)	1176.78	5.471 (0.038)

كل قيمة هي معدل لمكررين..... أما الأرقام بين القوسين تمثل الانحراف المعياري(.S.D).

تأثير مصادر كاربونية مختلفة على مستويات إنتاج إنزيم البيتا- كلوكوسايديس بوساطة عزلةالفطر *T. harzianum* :-

يلاحظ من الجدول (٢) إن السكريات المختلفة والمستخدمة كمصادر كاربونية أعطت تدرجا واضحا في الإنتاجية لإنزيم بيتا-كلوكوسايديس حيث بلغت أقصاها عند استخدام السكروز كمصدر كاربوني (٣,٣١٦ وحدة/مل). وعند استخدام الكاربوكسي مثيل سليولوز كمصدر كربون كانت إنتاجية الفطر لإنزيم بيتا-كلوكوسايديس ٢,٩٦٧ وحدة/مل ، وعلى الرغم من كون كاربوكسي مثيل سليولوز من السكريات المتعددة المحفزة لإنتاج إنزيم بيتا- كلوكوسايديس إلا أن تركيز هذا السكر مرتفع نسبيا(١%) لكون طبيعة هذا السكر يؤدي ذوبانه في الوسط إلى زيادة لزوجة الوسط مما أثر سلبيا على تهوية الوسط الغذائي وصعوبة استغلال المغذيات في الوسط الغذائي من قبل الفطر ،وبعد مرور عدة أيام (٣-٤) من التحضين قلت لزوجة الوسط بدرجة كبيرة بسبب إفراز إنزيم معقد السليوليز الذي أدى إلى تكسير الكاربوكسي مثيل سليولوز. إن البيانات المتحصل عليها (جدول ٢) أعلى نسبيا مما تم الحصول عليه من قبل [16] عند استخدام السليوبايوز كمصدر كاربوني إذ بلغت ٢,٤٨ وحدة/مل. بينما حصّل [20] على ٠,٤٦ وحدة/مل ، ٠,٦٦ وحدة/مل ، ١,٠٢ وحدة/مل و ١,١٢ وحدة/مل عند استخدام مصادر كاربونية مختلفة هي الكلوكوز ، السليوبايوز ، السليولوز و الكاربوكسي مثيل سليولوز على التوالي. ويعد السليولوز أفضل المصادر الكاربونية المستخدمة لإنتاج إنزيم بيتا-كلوكوسايديس. حيث أعطت البيانات (جدول١) أعلى إنتاجية تحت نفس ظروف الزرع والاختبار.

إذ يقوم هذا السكر المتعدد بتحفيز إنتاج أفضل من البيتا– كلوكوسايديس لكونه المادة الأساس الأفضل لفعل معقد إنزيم السليولوز.

بينما لوحظ أعلى إنتاجية من إنزيم بيتا–كلوكوسايديس على أساس الكتلة الحيوية عند استخدام الكاربوكسي مثيل سليولوز كمصدر كاربوني (١٣٤٨٦,٣ وحدة/غم كتلة حيوية) إذ قلل هذا المصدر الكاربوني من إنتاج الكتلة الحيوية والتي تتناسب عكسيا مع إنتاج إنزيم بيتا–كلوكوسايديس . بينما أعطت المصادر الكاربونية التالية سكروز ، نشا ، رايبوز و فركتوز اقل إنتاجية إذ بلغت ١٥٠٧,٢٧ ، ١٥٢٢,١٦ ، ١٥٢٤,٥٣ و ١٦٧٢,٠٤ وحدة/غم كتلة حيوية على التوالي بسبب الارتفاع النسبي للكتلة الحيوية المنتجة . بينما عند استخدام السليوبايوز كمصدر كاربوني بلغت الإنتاجية ٢٩٩٢,٧ وحدة/غم كتلة حيوية وهي أعلى مما تم الحصول عليه (٨٨٥,٧١ وحدة/غم كتلة حيوية) من قبل [16] عند استخدام السليوبايوز كمصدر كاربوني .

أما فيما يتعلق بإنتاج الكتلة الحيوية بينت النتائج (جدول ٢) إن المصدر الكاربوني السكروز أعطى أقصى إنتاجية من الكتلة الحيوية ٢,٢٠ غم/لتر بينما أعطي الكاربوكسي مثيل سليولوز و السليوبايوز أدنى إنتاج للكتلة الحيوية (٠,٢٢ غم/لتر و ٠,٩٦ غم/لتر) على التوالي. وقد ذكر [20] إن المصدر الكاربوني الكاربوكسي مثيل سليولوز و السليوبايوز أعطى اقل إنتاجية من الكتلة الحيوية (١٤,٧٢ غم/لتر و ١٥,٣ غم/لتر) على التوالي وأعطى الكلوكوز أعلى إنتاجية ٢٦,٢٤ غم/لتر .

أما الأس الهيدروجيني النهائي (جدول ٢) يشير إلى عدم حدوث تغير كبير في الأس الهيدروجيني الأولي (٦,٠) في معظم المصادر الكاربونية المستخدمة فيما عدى عند استخدام الكاربوكسي مثيل سليولوز و الرايبوز حيث لوحظ ارتفاع نسبي في الأس الهيدروجيني النهائي إلى ٧,٥٥٢ عند استخدام الكاربوكسي مثيل سليولوز وقد يرجع هذا الارتفاع في الأس الهيدروجيني النهائي إلى تحرر ايونات الـ OH نتيجة لعمليات الايض المحفزة من قبل الكاربوكسي مثيل سليولوز. بينما لوحظ انخفاض كبير في الأس الهيدروجيني النهائي ليصل إلى ٣,٦٥١ عند استخدام الرايبوز (سكر خماسي) كمصدر كاربوني وقد يرجع هذا الانخفاض في الأس الهيدروجيني النهائي إلى قابلية سكر الرايبوز على تحفيز الفطر لإنتاج حوامض عضوية تؤدي إلى رفع حموضة الوسط الغذائي .

جدول ٢ :- تأثير مصادر كاربونية مختلفة على مستويات إنتاج إنزيم البيتا– كلوكوسايديز .

المصدر الكاربوني	الكتلة الحيوية	بيتا– كلوكسايديز		الأس الهيدروجيني النهائي
	غم / لتر	وحدة / مل	وحدة / غم كتلة حيوية	
سكروز	2.200 (0.033)	3.316 (0.042)	1507.27	6.036 (0.015)
رايبوز	2.160 (0.000)	3.293 (0.000)	١٥٢٤,٥٣	3.651 (0.022)
فركتوز	1.860 (0.019)	3.110 (0.034)	١٦٧٢,٠٤	5.976 (0.075)
لاكتوز	1.180 (0.025)	3.017 (0.000)	٢٥٥٦,٧٧٩	6.192 (0.036)
CMC	0.220 (0.000)	2.967 (0.070)	١٣٤٨٦,٣٠	7.552 (0.054)
نشا	1.940 (0.000)	2.953 (0.005)	1522.16	5.649 (0.009)
سليوبايوز	0.960 (0.009)	2.873 (0.061)	٢٩٩٢,٧٠	5.472 (0.001)
كلوكوز	1.360 (0.005)	2.667 (0.009)	١٩٦١,٠٢٩	6.147 (0.018)

كل قيمة هي معدل لمكررين..... أما الأرقام بين القوسين تمثل الانحراف المعياري(S.D).

(CMC :- كاربوكسي مثيل سليلوز).

References

1. Eveleigh, D. E. (1987).Cellulase : a perspective . Philosophicl Transanctions of the Royal Society of London, Seris B-Biological Sciences. 321:435-447.
2. Kawai, S.;Okoshi, H. ;Ozaki, K.;Shikata, S. ;Ara, K. and Ito, S.(1988). Neutrohhilic Bacillus strain , KSM-522, that produces an alkaline carpoxy methyl cellulase .Agri. Biol. Chem. 52:1425-1431.
3. Kurosawa, K. ; Hosoguchi, M. ; Hariantono, J. ;Sasaki, H. and Takao, S.(1989).Degradation of tough materials by cellulase from Corticium rolfsii . Agri. Biol. Chem. 53:931-937.
4. Yoshida, N. ;Fukushima T.; Saito, H.; Shimosaka, M. and Okazaki, M.(1989). Cellulose and xylan degrading enzymes of the Plant Pathogenic Fungus, Fusarium oxysporm SUF850 . .Agri. Biol. Chem. 53:1829-1836 .
5. Mori, Y. (1990).Isolation of mutants of Clostridium thermocellum with enhanced cellulase production. .Agri. Biol. Chem. 54:825-826.
6. Wen, Z. ;Liao, W. and Chen, S.(2005).Production of Cellulase / β-glugosidase by the mixed culture Trichoderma reesei and Aspergillus phoenicis on daiary manure .Process Biochemistry .40:3087-3094.
7. Mes-Hartree, M. ; Hogan, CM. and Saddler, JN. (1988). Influence of growth substrate on production of cellulase enzymes by Trichoderma harzianum E-58. Biotechnol. Bioeng. 31: 725-729.
8. Beguin, P. and Aubert, J. P. (1994). The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol. Rev. 13:25-58.
9. Sunrnakki, A.; Tenkanen, M. ;Siika-aho, M. ; Nikupaavola, M.L. ;Viikari, L. and Buchert, L.(2000). Trichoderma reesei cellulase and their core domains in the hydrolysis and modification of the chemical pulp. Celllose. 7:189-209.
10. Wang, T. ; Liu, X. ;Yu, Q. ;Zhang, X. ;Qu, Y. ;Gao, P.and Wang, T.(2005). Directed evolution for engineering a pH profile endoglucanase III from Trichoderma reesi . Biomol, Eng. 22:89-94.
11. Desrochers, M. ;Jurasek, L.and Paige, M. G.(1981).High production of β-glugosidase in Schizophyllum commune : isolation of enzyme and effect of cuture filtrates on cellulose hydrolysis. Appl. Environ. Micobiol. 41:222-228.
12. Okoshi , H. ; Ozaki , K. ; Shitsuw , S. ; Oshino , K. and Kawai, S. (1990) Purifucation and charcterization of multiple carboxy methyl cellulases from Bacillus sp. KSM-522 . Agri. Biol. Chem. 54:83-89.
13. Hankin, L. and Anagnostakis, S. L.(1977). Solid media containing carboxy methyl cellulose to detect

Cx-cellulase activity of micro-organisms. J. Gen. Microbiol. 98:109-115.
14. Mandels, M. and Strenberg, D.(1976). Recent advances in cellulase technology . J. Ferment. Technol. 54:267-286.
15. Zaldivar, M.; Velasqez, JC. ; Contreras, I. and Perez, LM. (2001). 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. 3: 160-168.
16. Okagbue, R . N. ; Mwenje, T. ; Kudange, T. ; Siwela, M. and Sibanda, T.(2001). Isolation of Aureobasidium pullulans from Zimbabwean sources and glucosidase activities of selected isolates . South African Journal of Botany. 67: 157-160.
17. Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry.31: 426 – 428.
١٨. العزو ، رغد نبهان عبدالقادر ابراهيم (٢٠٠٦). تحسين كفاءة عزلة الفطر في انتاج السليوليز باستخدام عوامل فيزياوية Trichoderma viride وكيمياوية . رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة الموصل/ الموصل / العراق.
19. Chahal, D. S. (1985). Solid-stat fermentation with Trichoderma reesi for cellulase production . Appl. Environ. Micobiol. 49:205-210.
20. Narasimha, G. ; Sridevi, A. ; Buddolla, V. ;Subhosh, C. M. and Rajasekhar, R. B.(2006).Nutrient effects on production of cellulolytic enzymes by Aspergillus niger. African J. of Biotechnology. 5:472-476.

Effect of Different Incubation Period and Different Carbon Sources on Production of β-Glucosidase Enzyme by local Isolate Fungus *Trichoderma harzianum*

Taha A. W. Kh. Al-Someidae
Department of Biology / College of Education / Mosul University

Abstract
The ability of a local isolate fungus *Trichoderma harzianum* to produce the enzyme complex cellulase in a solid medium was investigated. It was observed that this fungus had intermediate activity to produce this enzyme and the activity ratio was 3.875. This isolate gave highest production of β-glucosidase on the basis of each ml of nutrient medium and each gram of biomass (3.366 unit/ml and 734.93 unit/gram) respectively after eight days of incubation. Sucrose as a carbon source gave highest production of β-glucosidase (3.316 unit/ml). Carboxymethyl cellulose gave highest production of β-glucosidase on the basis of biomass (13486.3 nit/gram).