تحديد كفاءة بعض العزلات الفطرية المحلية في انتاج انزيم السليوليز

شمال يونس عبد الهادي

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

(تاريخ الاستلام: ٧ / ٢ / ٢٠١٠ ---- **تاريخ القبول:** ٢٣ / ٥ / ٢٠١٠)

الملخص:

تم عزل وتشخيص تسع عزلات محلية تعود الى الاجناس التالية : *Aspergillus niger* ، *Alternaria alternata* ، *Penicillium sp* ، *Rhizopus sp* ، *Rhizoctonia solani* ، *Fusarium solani* ، *Drechslaria sp* و *Trichoderma viride* ، والتي عزلت من التربة / جامعة الموصل، وعزلة للفطر *Aureobasidium pullulans* من اوراق البرتقال. تم الكشف عن قابلية العزلات لانتاج انزيم السليوليز في الاوساط الصلبة . اجري اختبار كمي باستخدام الاوساط السائلة لتحديد اكفا عزلة فطرية في انتاج انزيم السليوليز. اعطت عزلة الفطر *T.viride* اعلى انتاجية لانزيم السليوليز كانت (٤,٦٧) وحدة / مل. واعطى المصدر الكاربوني كاربوكسي مثيل سليلوز انتاجية بلغت (٤,٧٢) وحدة / مل . وتميزالاس الهيدروجيني الاولي ٥,٥ بكونه الامثل لانتاج الانزيم اذ اعطى انتاجية (٤,٩٦) وحدة /مل .

المقدمة:

يعد السليلوز احد المركبات العضوية الاكثر وفرة على سطح الارض ، حيث يكون حوالي ١٥-٦٠ % من مكونات الجدار الخلوي للنباتات الناضجة [١] ، اذ ينتج النبات كميات هائلة منه كل عام يتراكم بعضها دون استخدام مسببا مشاكل بيئية كثيرة [٢]. وهنا تظهر الاحياء المجهرية كاحد الحلول فعندما تنمو على هذه المواد النباتية فانها تحلل السليلوز الى سكريات بسيطة يسهل استخدامها في العديد من التخمرات الصناعية لانتاج مواد ذات قيمة اقتصادية عالية [٣].

انزيم السليلوز عبارة عن مجموعة من الانزيمات تسمى احيانا Cellulases وهي ثلاث انزيمات تساهم مجتمعة في تكسير الاصرة الكلايكوسيدية بيتا ١ ⟵ ٤ والانزيمات الثلاث هي :

Endo -1,4-B-glucanases (EC 3.2.1.4 , CMCase) ، Exo-1, 4- B-(Cellobiohydrolase, EC3.2.1.91) ، B- (Cellobiase, EC 3.2.1.21) glucosidase [٤-٨].

يستخدم السليوليز لعدة اغراض منها اضافته الى عليقة الماشية كمادة مساعدة على الهضم ويستخدم في عملية استخلاص القهوة والشاي وفي استخلاص فول الصويا . والاستخدام الحديث هو تحليل المخلفات السليلوزية لانتاج الكلوكوز الذي يمكن الاستفادة منه في تنمية العديد من الاحياء المجهرية لانتاج منتجات مفيدة مثل الكحول وبروتين احادي الخلية وغيرها من منتجات التخمر . كما ان لانزيم السليوليز تطبيقات كثيرة في الصناعات الكيمياوية والغذائية والطبية والصناعات النسجية [٩-١٣].

تنتج انواع عديدة من الاحياء المجهرية انزيم السليوليز مثل بعض الفطريات التابعة للاجناس *Trichoderma* ، *Aspergillus* ، *Mucor* ، *Cladosporium* .... [١٤-١٨] بالاضافة الى بعض انواع البكتريا مثل *Bacillus* ، *Streptomyces* [١٩-٢٢]. ينتج الانزيم على المستوى التجاري من الفطر *Trichoderma reesei* وبعض سلالاته المتطفرة باستخدام تخمرات الحالة الصلبة [٢٣-٢٤].

ان هدف البحث الحصول على عزلات محلية من الفطريات تمتلك قابلية عالية لافراز انزيم السليوليز ودراسة تاثير بعض المصادر الكربونية والاس الهيدروجيني الاولي الامثل على انتاج انزيم السليوليز.

المواد وطرائق العمل:

الكائنات المجهرية المستخدمة:

استخدمت تسعة عزلات فطرية محلية مختلفة هي : *Aspergillus niger* ، *Alternaria alternata* ، *Penicillium sp* ، *Rhizopus sp* ، *Rhizoctonia solani* ، *Fusarium solani* ، *Trichoderma viride* والتي عزلت من التربة / جامعة الموصل ، وعزلة للفطر *Aureobasidium pullulans* عزلت من اوراق نبات البرتقال. حفظت العزلات بتنميتها على وسط البطاطا والدكستروز والاكار (PDA) بشكل مائل داخل انابيب اختبار Slants في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ سيليزية. تم تجديد المزارع الفطرية كل اسبوعين. واستخدمت طريقة البوغ المنفرد للحصول على مزرعة فطرية نقية ، واعتمد في تشخيص العزلات الفطرية طريقة الزرع على الشريحة Slide Culture Technique الموصوفة من قبل [٢٥-٢٦]. وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفية التي وردت في المصادر[٢٧-٩].

العزل من التربة: اخذت عينات التربة بعمق ٢٠سم. واعتمدت طريقة التخافيف في عزل الفطريات من عينات التربة المستخدمة(٣٠).

الاوساط 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 السليوليز. حيث استخدم وسط الكاربوكسي مثيل سليلوز اكار Carboxymethyl Cellulose Agar (CMC Agar) والذي يتكون من المواد التالية (غم / لتر

من الماء المقطر) : – $NaNO_3$ ، ٢,٠ ; K_2HPO4 ، ١,٠ ; $MgSO4 . 7 H_2O$ ، ٠,٥ ; KCL ، ٠,٥ ; $FeSO4$ ، ٠,٠١ ; CMC-Na Salt ، ١٠,٠ ; Agar ، ٢٠,٠ [٣١] . 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 ٦,٠ . عقم الوسط بجهاز المعقام عند ضغط ا كغم / سم ٢ ودرجة حرارة ١٢١ سيليزية لمدة ١٥ دقيقة . وزع الوسط بعد التعقيم في اطباق بتري معقمة تحت ظروف معقمة وتركت الاطباق ليتصلب الوسط فيها وحفظت في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ سيليزية لحين الاستخدام.

وسط الانتاج :

استخدم الوسط الزرعي الخاص بالانتاج والذي يتكون من المواد التالية (غم / لتر من الماء المقطر) : $(NH4)_2 SO4$ ، ١,٤ ; KH_2PO4 ، ٢,٠ ; Urea ، ٠,٣ ; $CaCL_2$ ، ٠,٣ ; $MgSO4 . 7 H_2O$ ، ٠,٣ ; $FeSO4 . 7 H_2O$ ، ٠,٠٠٥ ; $MnSO4 . H_2O$ ، ٠,٠٠١٦ ; $ZnSO4 . 7 H_2O$ ، ٠,٠٠١٤ ; $CoCl_2$ ، ٠,٠٠٢ ; Pepton ، ١,٠ و Cellulose، ١٠,٠ و Tween ، ٢,٠ مل [٣٢] . تم اذابة جميع مكونات الوسط في الماء المقطر المعقم عدا اليوريا وضبط الاس الهيدروجيني عند ٦,٠ باستخدام محلول هيدروكسيد الصوديوم ١ ع وحامض الهيدروكلوريك ١ع . وزع الوسط في دوارق مخروطية حجم ٢٥٠ مل بواقع ٥٠ 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 ١ % كان تركيز الابواغ في اللقاح بمقدار ٥ × ١٠ ^{٧} بوغ / مل وبتركيز ٢ % [٣٣]. حضنت الدوارق بعد التلقيح في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة ٢٨ ± ١ سيليزية وبمعدل رج ١٥٠ دورة / دقيقة ثم سحبت الدوارق من الحاضنة بعد ٧ ايام من التحضين .

طرائق التحليل :

الكشف عن انتاج 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 ٢٨ ± ١ 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 [٣١]:

$$\text{قابلية الفطر لانتاج انزيم السليوليز} = \frac{\text{قطر هالة التحلل}}{\text{قطر المستعمرة الفطرية}}$$

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 ٧٠ سيليزية لمدة ٢٤ ساعة . تم قياس الكتلة الحيوية بفارق الوزنين باستخدام ميزان حساس. ترك الرائق (الراشح) جانبا لقياس الفعالية الانزيمية للفطر حيث اضيف للرائق Sodium azide بتركيز ٠,٢ % وذلك لايقاف نمو الفطريات عند عدم استخدامه مباشرة لتقدير كمية الانزيم المنتج ، ثم حفظ في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ سيليزية لحين الاستخدام [٣٤].

قياس فعالية انزيم السليوليز:

قيست فعالية انزيم السليوليز اعتمادا على قياس احد نواتج التفاعل وهو سكر الكلوكوز D- glucose المتحرر من ورقة الترشيح حسب طريقة (٣٢) طريقة Filter Paper Assay . تم قياس فعالية هذا الانزيم باخذ ٠,٥ مل من الراشح او محلول الانزيم في انبوبة اختبار حجم ١٨ مل واضيف اليها ١ مل من المحلول المنظم (Na – Citrate Buffer) ذو اس هيدروجيني ٤,٨ وغمر بالمزيج شريط ورقة الترشيح (Whatman No. 1) بطول ١ × ٦ سم زنة ٥٠ ملغم . وحضنت لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة ٥٠ سيليزية بعدها اضيف لكل انبوبة اختبار ٣ مل من كاشف 3,5 Dinitro Salicylic acid (DNS) . بعد ذلك وضعت الانابيب في حمام مائي مغلي لمدة ٥ دقائق ، بعد تبريد المزيج الى درجة حرارة المختبر تم قياس كمية الكلوكوز المتحرر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع (ECIL, CE1021) عند طول موجي ٥٥٠ 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 ١ مايكرمول 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* ، *Rhizoctonia solani* ، *Fusarium solani* ، *Drechslaria sp* و *Trichoderma viride* . واكد التشخيص بملاحظة النمو على الوسط الزرعي والصفات الزرعية وايضا بالاعتماد على صفات الفطريات المورفولوجية واجراء الفحص المجهري .

اما عزلة الفطر *Aureobasidium pullulans* فقد تم عزل المستعمرات السوداء التي نمت على سطح الاكار حيث ان الفطر يتميز بانتاجه لصبغة الميلانين السوداء. وبينت العزلة ظاهرة تعدد الاشكال وهي تواجد الطور الخميري والطور الخيطي وطور الكلاميدوسبور [٣٥] .

٢- دراسة النشاط الانزيمي للفطريات:

نظرا لقدرة العديد من الفطريات على انتاج انزيم السليوليز فقد تم اختبار نوعي لتحديد العزلات الاكثر نشاطا في انتاج انزيم السليوليز . استخدمت طريقة الاوساط الصلبة لتقدير انتاج الانزيمات من قبل العزلات الفطرية المستخدمة ، حيث تم استخدام الوسط الزرعي الصلب الحاوي على مادة الكاربوكسي مثيل سليلوز (CMCNa-Salt) ويعتبر ظهور هالة فاتحة اللون حول المستعمرة الفطرية دليلا على تحلل هذه المادة بواسطة انزيم السليلوز المفرز من قبل العزلات الفطرية وذلك لتحول السليلوز المعقد الى سكريات بسيطة . لوحظ ان جميع العزلات الفطرية اعطت نتائج ايجابية متفاوتة بقدرتها على انتاج الانزيم (الجدول ١) . وقد اعطت عزلة الفطر *Trichoderma viride* كفاءة عالية في تكسير مادة الكاربوكسي مثيل سليلوز، اذ لوحظ ظهور هالة التحلل حول المستعمرة الفطرية في اليوم الثاني من التحضين وازداد قطر الهالة باستمرار فترة التحضين الى اليوم الخامس اذ بلغت قطر الهالة (٦,٨٣٥) هذه القيمة تمثل فعالية عالية في انتاج انزيم السليوليز. كما اظهرت بقية العزلات قدرات متفاوتة في انتاج انزيم السليوليز اذ اعطت العزلات *Fusarium solani* ، *Alternaria alternata* و *Aspergillus niger* نشاط انزيمي بلغت قيمته (٥,٢٧١ ، ٥,١٨٥ ، ٤,٦٨٣) وان هذه القيمة تمثل فعالية جيدة في انتاج الانزيم. اما بقية العزلات فقد تراوح نشاطها الانزيمي بين المتوسط والضعيف والعزلات التي اعطت نشاط متوسط هي عزلات الفطريات *Penicillium sp* ، *Rhizopus sp* و *Rhizoctonia solani* بينما حققت عزلتا الفطر *Drechslaria sp* و *Aureobasidium pullulans* نشاط انزيمي ضعيف بلغت قيمته (٢,٣٥٠ و ٢,١٣٢) . ويمكن تفسير ضعف قدرة بعض العزلات على افراز انزيم السليوليز بان فترة التحضين قد تكون غير كافية لتحفيز العزلات على تكوين السليوليز . كذلك اختلاف في قدرة بعض العزلات على استغلال الوسط الزرعي ومدى ملائمة الاس الهيدروجيني للوسط الزرعي لهذه العزلات

مما سبق نستنتج وجود علاقة طردية بين قطر هالة التحلل وكفاءة الفطريات في انتاج الانزيم وكلما ازدادت قدرة العزلة على انتاج الانزيم ازداد قطر هالة التحلل . ولقد استخدمت طريقة الاوساط الصلبة في انتاج الانزيمات المحللة (الفا – بيتا اميليز ، سليوليز ، بكتينيز واللاييبز) من قبل البكتريا والفطريات والخمائر لتحليل مخلفات المصانع من قشر ولب البرتقال من قبل [٣٦] .

ان النتائج التي تم الحصول عليها مطابقة لما توصل اليه [٣٧]. اذ ان الفطريات المعزولة من مصادر مختلفة تنتج انزيم السليلوز بكميات مختلفة عندما تم عزل ٦١ نوع من الفطريات من المناطق الجذرية لعدد من النباتات. كما كانت مطابقة لما ذكره [٣٨]. الذي اشار الى ان عزلة الفطر *T.reesei* من افضل العزلات الفطرية المنتجة لانزيم السليلوز عند استخدام طريقة الاوساط الصلبة . كما اكد [٣٩-٤١] ان الفطريات التابعة لجنس *Trichoderma* اكثر الفطريات انتاجا لانزيم السليوليز.

جدول (١): كفاءة العزلات الفطرية المختلفة على انتاج انزيم السليوليز باستخدام طريقة الاوساط الصلبة

نوع الفطر	الكشف عن انتاج انزيم السليوليز بدون استخدام كاشف
Aspergillus niger	***٤,٦٨٣
Alternaria alternata	***٥,١٨٥
Penicillium sp	**٣,٦٧٠
Fusarium solani	***٥,٢٧١
Rhizopus sp	**٣,٤٧٥
Rhizoctonia solani	**٣,٣٩٠
Trichoderma viride	****٦,٨٣٥
Drechslaria sp	*٢,٣٥٠
Aureobasidium pullulans	*٢,١٣٢

* يمثل كفاءة ضعيفة للفطر على افراز انزيم السليوليز وتكون هالة رائقة حول المستعمرة الفطرية بقطر (١-٢,٥) ملم

** يمثل كفاءة متوسطة للفطر على افراز انزيم السليوليز وتكون هالة رائقة حول المستعمرة الفطرية بقطر (٢,٦-٤,٠) ملم

*** يمثل كفاءة جيدة للفطر على افراز انزيم السليوليز وتكون هالة رائقة حول المستعمرة الفطرية بقطر (٤,١-٥,٥) ملم

**** يمثل كفاءة عالية للفطر على افراز انزيم السليوليز وتكون هالة رائقة حول المستعمرة الفطرية بقطر (٥,٦-٧,٠) ملم

كفاءة الفطريات المختلفة في انتاج انزيم السليوليز باستخدام الوسط السائل:

اظهرت نتائج دراسة كفاءة تسعة انواع فطرية مختلفة (جدول ٢) ان هناك تباين بين هذه الفطريات في انتاج انزيم السليوليز. وقد كانت النتائج التي تم الحصول عليها مطابقة لنتائج الوسط الصلب، اذ اعطت عزلة الفطر *Trichoderma* اعلى فعالية لانزيم السليوليز والتي بلغت (٤,٦٧) وحدة/ مل بعد مرور ٧ ايام من التحضين. في حين اعطت الفطريات *Alternaria*، *Fusarium* و *Aspergillus* فعالية انزيمية بلغت (٣,٥١ ، ٣,٤٣ و ٣,٢٧) وحدة / مل على التوالي . اما الفطريات التي اعطت اقل انتاجية فهي عزلتا الفطر *Drechslare* و *Aureobasidium* فقد كانت الفعالية الانزيمية ضعيفة وبلغت (١,٥٥ و١,١٦) وحدة / مل على التوالي. اما بالنسبة لانتاج الكتلة الحيوية فيلاحظ من الجدول ان اقصى انتاجية للكتلة الحيوية كانت (٩,٢٤) غم / لتر لعزلة الفطر *T. viride* وهي العزلة التي اعطت اعلى فعالية لانزيم السليوليز . اما ما يتعلق بالاس الهيدروجيني النهائي فقد انخفض في معظم العزلات عن الاس الهيدروجيني الاولي ما عدا عزلتا الفطر *Aspergillus niger* و *Fusarium solani* اللتان ارتفع فيهما الرقم الهيدروجيني النهائي عن الاس الهيدروجيني الاولي قليلا ووصل الى ٦,٤٤ و ٦,٢٦ على التوالي . ان الانخفاض في الاس الهيدروجيني النهائي يعزى الى نشاط الفطريات في النمو وانتاج انزيم السليوليز ونتيجة لذلك تطرح بعض الحوامض العضوية في وسط النمو مما يسبب خفض الاس الهيدروجيني النهائي . ويعزى وجود اختلاف بين قدرة هذه العزلات على استغلال الوسط الغذائي وظروف التخمير ومدى ملاءمة الاس الهيدروجيني لهذه العزلات مما اثر في كفاءتها على انتاج انزيم السليوليز وهذا ما اكده[٤٢-٤٤]. كما كانت مطابقة لما اكده [٤٥,١٧,٢].من ان فعالية انتاج انزيم السلوليز تتباين باختلاف السلالات المختلفة. اما ما يتعلق بانتاجية الفطر *Aureobasidium* فقد جاءت النتائج مطابقة لما توصل اليه [٤٦] من ان بعض عزلات الفطر منتجة لانزيم السلوليز . وقد ذكر[٤٧-٤٨] ان الفطر *Trichoderma* يعتبر فطر قياسي لانتاج انزيم السليوليز . وعلى ضوء ما تم الحصول عليه في هذه التجربة اختيرت عزلة الفطر *T. viride* لكونها افضل عزلة فطرية من حيث انتاجيتها لانزيم السليوليز في التجارب اللاحقة .

جدول (٢): كفاءة العزلات الفطرية على انتاج انزيم السليوليز باستخدام الوسط السائل

العزلات الفطرية	الكتلة الحيوية غم / لتر	فعالية انزيم السليوليز وحدة / مل	الاس الهيدرودجيني النهائي
Aspergillus niger	٨,٩٣ (٠,١٠)	٣,٢٧ (٠,٠٦٠)	٦,٤٤٠ (٠,٠٣٠)
Alternaria alternata	٦,٣٢ (٠,٠٠٢)	٣,٤٣ (٠,٠٠٥)	٥,١٥ (٠,٠٤٢)
Penecillium sp	٧,١٢ (٠,٠٤١)	٢,٩٩ (٠,٠١٥)	٥,٧٨ (٠,٠٥٨)
Rhizopus sp	٦,٨٤ (٠,٠١١)	٢,١٦ (٠,٠٢٣)	٥,٩٠ (٠,٠٧١)
Rhizoctonia solani	٥,٩٨ (٠,٠٣٢)	٢,٣٨ (٠,٠٠٩)	٥,٢٢ (٠,٠١٤)
Fusarium solani	٨,٥١ (٠,٠٦٦)	٣,٥١ (٠,٠١٣)	٦,٢٦ (٠,٠٥٠)
Drechslaria sp	٥,٧٤ (٠,٠٠٣)	١,٥٥ (٠,٠٠٠)	٤,٦٣ (٠,١١٠)
Aureobasidium pullulans	٤,٠٣ (٠,٠٠٦)	١,١٦ (٠,٠٠٤)	٥,٠٢ (٠,٠١٩)
Trichoderma viride	٩,٢٤ (٠,٠٢٥)	٤,٦٧ (٠,٠٠٧)	٥,٧٧ (٠,٠٢٢)

كل قيمة هي معدل لمكررين . اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحراف المعياري .S.D

تاثير مصادر كاربونية مختلفة على انتاج انزيم السليوليز بوساطة عزلة الفطر *Trichoderma viride* بعد ٧ ايام من التحضين:

اختيرت ستة انواع من السكريات كمصادر كاربونية (اضيفت بنسبة ١٠غم / لتر من الوسط الغذائي) لتنمية عزلة الفطر *T. viride* . يلاحظ من نتائج (جدول ٣) ان السكريات المختلفة والمستخدمة كمصادر كاربونية اظهرت تباين واضح في انتاج انزيم السلوليز ، اذ اعطى المصدر الكاربوني الكاربوكسي مثيل سليوليز فعالية انزيمية بلغت ٤,٧٢ وحدة / مل . في حين اعطى المصدر الكاربوني سليوبايوز فعالية انزيمية بلغت ٤,٦٣ وحدة / مل يليه المصدر الكاربوني السكروز والذي اعطى انتاجية بلغت ٣,٨٥ وحدة / مل . بينما اعطت المصادر الكاربونية الكلوكوز والارابينوز والنشا اقل انتاجية بلغت (٢,٥٢ ، ٢,٣١ و ١,٧٦) وحدة / مل على التوالي. اما بالنسبة لانتاجية الكتلة الحيوية فقد اوضحت النتائج ان المصدر الكاربوني كاربوكسي مثيل سليلوز اعطى اقصى انتاجية للكتلة الحيوية بلغت ٨,٦٨غم / لتر يليه من حيث الانتاجية المصدر الكاربوني سليوبايوز اذ اعطى كتلة حيوية بلغت (٦,٥٩) غم / لتر واعطى المصدر الكاربوني السكروز كتلة حيوية بلغت ٥,٩٦ غم / لتر . اما الاس الهيدروجيني النهائي فنلاحظ ارتفاع طفيف في الاس الهيدروجيني النهائي عن الاس الهيدروجيني الاولي(٦,٠) في معظم المصادر الكاربونية المستخدمة ،وقد وصل الارتفاع في الاس الهيدروجيني النهائي الى ٦,٨٤ عند استخدام الكاربوكسي مثيل سليلوز

ويرجع هذا الارتفاع في الاس الهيدروجيني النهائي الى تحرر ايونات oH نتيجة لعمليات الايض المحفزة من قبل الكاربوكسي مثيل سليلوز . بينما لوحظ انخفاض في الاس الهيدروجيني النهائي وصل الى ٤,٤٢ عند استخدام الارابينوز كمصدر كاربوني وقد يرجع الانخفاض الى قابلية هذا السكر على تحفيز الفطر لانتاج حوامض عضوية تؤدي الى رفع حموضة الوسط الغذائي . ان النتائج التي تم التوصل اليها جاءت مطابقة لما توصل اليه [٧]عند دراسة تاثير عدة مصادر كاربونية على انتاح انزيم السليوليز باستخدام عزلة الفطر *A.niger* اذ اعطى المصدر الكاربوني كاربوكسي مثيل سليلوز ثم المصدر الكاربوني السليلوز اعلى فعالية لانتاج انزيم السليلوز . وكانت النتائج المتحصل عليها مختلفة مع ما توصل اليه [٤٤] اذ اعطى مسحوق السليلوز اعلى فعالية انزيمية عند استخدامه كمصدر كاربوني في مزرعة مختلطة للفطر *A.niger* و *T.viride* . كما اختلفت هذه النتائج مع ما توصل اليه [٤٩] اذ اعطى المصدر الكاربوني السكروز اعلى انتاجية من انزيم البيتا – كلوكوسايديس بوساطة عزلة الفطر *T.harzianum* .

جدول (٣): تاثير مصادر كاربونية مختلفة على انتاج انزيم السليوليز لعزلة الفطر *T.viride* بعد ٧ ايام من التحضين

المصدر الكاربوني	الكتلة الحيوية غم/ لتر	فعالية انزيم السليوليز وحدة / مل	الاس الهيدروجيني النهائي
سكروز	٥,٩٦(٠,١٠٠)	٣,٨٥(٠,٠٥٥)	٦,٣٧(٠,٠١٧)
ارابينوز	٢,٦٢(٠,١٥٢)	٢,٣١(٠,٠٠٦)	٤,٤٢(٠,٠٠٣)
كلوكوز	٣,٢٢(٠,٠٥٤)	٢,٥٢(٠,٠٠١)	٦,٣٠(٠,٠١٦)
نشا	٢,٦٠(٠,٠٠٦)	١,٧٦(٠,٠٠١)	٦,١١(٠,٠٠٢)
سليوبايوز	٦,٥٩(٠,١١٠)	٤,٦٣(٠,٠٣٢)	٦,٥٢(٠,٠٠٢)
كاربوكسي مثيل سليلوز	٨,٦٨(٠,٠١٢)	٤,٧٢(٠,٠٢٥)	٦,٨٤(٠,٠٣١)

كل قيمة هي معدل لمكررين . اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحراف المعياري .S.D

تاثير الاس الهيدروجيني الاولي على انتاج انزيم السليوليز بوساطة عزلة الفطر *T.viride* بعد ٧ ايام من التحضين:

يؤثر الاس الهيدروجيني على نمو الكائنات الحية المجهرية وعلى انتاج المنتجات الايضية المختلفة ، حيث ان لكل كائن اس هيدروجيني معين يعمل عنده . وبما ان الاس الهيدروجيني يؤثر تاثير كبير على سلوك الانزيمات ، فقد صممت هذه التجربة لبيان تاثير الاس الهيدروجيني الامثل على نمو الفطر وفعالية انزيم السليوليز (جدول ٤) يبدو من نتائج الجدول ان للاس الهيدروجيني الاولي تاثير على نمو الفطر حيث ازداد معدل نمو الفطر بازدياد الاس الهيدروجيني الاولي نحو الحامضية وبلغت الكتلة الحيوية للفطر اقصاها عند استخدام الاس الهيدروجيني الاولي ٥,٥ (٩,٢٥) غم / لتر ثم اتجهت الكتلة الحيوية نحو النقصان عند زيادة الاس الهيدروجيني الاولي الى الرقم ٦,٠ والذي اعطت كتلة حيوية بلغت (٨,٥٢) غم / لتر . اما فعالية انزيم السليوليز فقد تباينت بالنسبة للاس الهيدروجينية المختلفة وتحققت اعلى فعالية انزيمية عند الاس الهيدروجيني (٥,٥) اذ بلغت (٤,٩٦) وحدة / مل واعطى الاس الهيدروجيني الاولي ٥,٠ فعالية انزيمية بلغت (٤,٧٥) وحدة/ مل في حين اعطى الاس الهيدروجيني الاولي ٦,٠ فعالية انزيمية بلغت (٤,٥٥) وحدة / مل. اما الاس الهيدروجيني النهائي فقد حصل فيه ارتفاع عن الاس الهيدروجيني الاولي ولجميع قيم الاس الهيدروجيني الاولي المستخدمة . يمكن تفسير هذه النتائج بان الاس الهيدروجيني يؤثر على سلوك الانزيمات حيث ان للانزيمات اسس هيدروجينية مثالية تكون الانزيمات فعالة فيها بدرجة كبيرة وبما ان الانزيمات هي مواد بروتينية فان أي تغيير في الاس الهيدروجيني سوف يؤثر على الصفات الايونية للمجاميع الامينية والكاربوكسيلية الموجودة في جزئية البروتين وبالتالي تؤثر على المواقع الفعالة للانزيم ، كما ان القيم العالية او الواطئة نوعا ما من الاسس الهيدروجينية تؤثر على الحالة الطبيعية للبروتين وبالتالي تؤدي الى الاقلال من فعالية الانزيم المنتج [٥٠]. ان النتائج التي تم الحصول عليها مشابهه لما توصل اليه [٤٤] اذ كان الاس الهيدروجيني ٥,٥ الافضل لانتاج انزيم السليوليز من مزرعة مختلطة للفطر *A.niger* و *T.viride* . كما كانت مقاربة لما توصل اليه [٥١]الذي حصل على اعلى فعالية لانزيم السليوليز تراوحت بين (٩,٦٠ – ٩,١٠) وحدة / مل باستخدام اسس هيدروجينية تراوحت بين (٤,٥ – ٥,٥) وهذه النتائج مشابهة لما توصل اليه بالنسبة لفطريات اخرى منتجة لانزيم السليوليز من قبل[٥٢ و٥٣].في حين توصل[٥٤] الى ان الاس الهيدروجيني ٤,٨ الافضل لانتاج اعلى كمية من الانزيم باستخدام عزلة الفطر *T.reesei* في حين حصل [٥٥] على اعلى فعالية لانتاج انزيم السليوليز باستخدام عزلة الفطر *T.harzianum* عند استخدام الاس الهيدروجيني ٥,٨ .

جدول (٤): تاثير الاس الهيدروجيني الاولي على انتاج انزيم السليوليز لعزلة الفطر *T.viride* بعد ٧ ايام من التحضين .

الاس الهيدروجيني الاولي	الكتلة الحيوية غم / لتر	فعالية انزيم السليوليز وحدة / مل	الاس الهيدروجيني النهائي
٤,٠	٢,٥٥(٠,٠٠٢)	٢,٧٠(٠,١٤١)	٥,٢٨(٠,٠٣١)
٤,٥	٢,٤٧(٠,٠١٧)	٣,٢٠(٠,٠٠٥)	٦,٣٤(٠,٠١٤)
٥,٠	٦,١٠(٠,٠٠٤)	٤,٧٥(٠,٠٢٢)	٦,٨٢(٠,٠٠١)
٥,٥	٩,٢٥(٠,٠٣٥)	٤,٩٦(٠,٠٠٢)	٦,٣٧(٠,٠١٧)
٦,٠	٨,٥٢(٠,٠١٢)	٤,٥٥(٠,١٠١)	٦,٦٣(٠,٠١٣)
٦,٥	٦,٣٥(٠,٠٢٦)	٤,١٥(٠,٠١١)	٦,٨٠(٠,٠٠٨)

كل قيمة هي معدل لمكررين . اما الارقام بين القوسين فانها تمثل الانحراف المعياري S.D.

المصادر

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

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

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

4.Bhat, M. K .2000.Cellulose and related enzymes in biotechnology. biotech . Adv. 18 : 355-383 .

5. Rajoka,m. I.;Durrani, I. S. and Khalid, A.M. 2004. kinetics of improved production and thermostability of an intracellular-glucosidase from amutant derivative of *Cellulomonas biozotea* . Biotech.Lett. 26 : 281-285.

6. Shafique, S.; Asgher, M.; Sheikh, M. A. and Asad, M.J. 2004. Solid state fermentation of banana stalk for exoglucanase production. agriculture 7 Biology. 6 (3) : 488-491.

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

8. 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 Engineering . 1:1 .23-26

9. Voragen, A.G.J; Hentink, R. and Pilnik, W. 1980. Solubilization of apple cell wals with polysaccharide degrading enzymes . J.Appl . Biochem. 2 : 452-68 .

10. Wong, K. K.Y. and Saddler, J.N. 1993. Application of hemicellulases in the food, feed and pulp and paper industries. In: coughlan MP, Hazlewood GP. editors. hemicellulose and hemicellulases. London: Portland Press , 127-143 .

11. Ojumn, T. V.; Solomon, B. O.; Betiku, E.; Kolawole, L.S. and Amigun, B.2003. Cellulase production by *Aspergillus flavus* Linn isolate NSPR 101 fermented in sawdust bagasse and corncob. J . Biotechnol. 2 (6) : 150-152 .

12. Jang, H.D.and Chen, K. S. 2003. Production and Characterization of thermostable cellulose from *Streptomyces* transformant T3-1. J. Microbiol. Biotechnol . 19 : 263-8 .

13. 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 (2): 286 - 292.

14. 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 substrares. Appl. Bioch. 84 - 86 (1- 9) .

15. Saha, B.C.2003. Production, Purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides* . Process biochemistry. 39 : 1871-1876 .

16. Villena, G. K. and Gutierrez –Correa, M. 2006. Production of cellulose by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. Letters in Applied Microbiol . 43 . Issue, 3 : 262-268 .

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

18. Liu, J. and yang, J. 2007. Cellulase production by *Trichoderma koningii* AS3. 4262in solid state fermentation using lignocellulasic waste from the vinegar industry. Food Technol . Biotechnol. 45 (4) 420-425.

19. Chen, P.J.; Wei, T. C.; Chang, Y. T. and Lin, L.P.2004. Purification and characterization of carboxymethyl cellulose from *Sinorhizobium fred* . Bot. Bull. Acad . sin . 45: 111 – 118 .

20. Arrifin, H.; Abdullah, N.; Umikalsom, M. S.; Shirai, Y. and Hassan, M. A. 2006. Production and characterization of cellulose by *Bacillus pumilus* EB3. Engineering and Technology. 3: 47-53 .

21. Femi-ola, T.O. and Aderibigbe. E.Y. 2008. Studies on the effect of some wood extracts on

growth and cellulose production by strains of *Bacillus subtilis* . Asian j . Blant Science . Issn : 1682-3974 .
22. Bijender ,K.B.; Himani,P.; Masood, A. W.; Priyanka, S. and Ajay, S.2009. Partial purification and characterization of a highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus* strain M-9 . Indian . j. Chemical Technol . 16: 382-387.
23 Weber, J. and Agbleron, F. A. 2005. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulose production. process .Biochemist . 40: 669-676.
24. Wen, Zh. Y.; Liao, W. and Chen, S.L. 2005 .Production of cellulose by *Trichoderma reesei* from dairy manure .Bioreson. Technol . 96 : 91-99 .
٢٥. Booth ,C. 1971. Methods in Microbiology. Common wealth mycological Institute. kew , Surrey, England . pp. 20 -23.
٢٦. Benson, H.J. 2002. Microbiological Applications. 8thed. McGraw-Hill Companies, Inc. USA. pp .22-105.
٢٧. Ellis, M.B. 1971 Dematiaceous hypomycetes. Common wealth mycological Institute . kew , surrey , England . 608 pp.
٢٨. Barnett, H.L. and Hunter,B.B.1972. Illustrated geuera of Imperfect Fungi . Burgess Publishing Company . Minnesota. 241pp.
٢٩. Pitt, J. I. and Hocking, A.D. 1997. Fungi and food Spoilage 2 nd ed . Gaithersburg, Maryland . 593pp.
30. Johnson,L.E.; Curl,E.A.;Bomd,J.h.and Fribourgh, H.A.1959. Methods for studing soil microphlora – plant disease relationshipe . Burgess Pub.Com .
٣١. Hankin, L .and Anagnostakis, S.1977 .Solid media containing carboxy methyl cellulose to detect Cx – cellulose activity of micro- organisms . J .Gen Microbiol . 98: 109-115 .
٣٢. Mandels, M. and Strenbery, D. 1976. Recent advances in cellulose technology. j. Ferment. Technol. 54: 267-286.
٣٣. Zaldivar ,M.; Velasqez, J.C.; Contreras, I. and Perez,L.M.2001. *Trichoderma aureovinde* 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 .
٣٤. 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 .
35. Pollock,T.J.; Thorne,L. and Armentront, R.W. 1992. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high molecular weight pullulan with reduced pigmentation . Appl . Environ . Microbiol . 58: 877-887 .
36. Shahera, H. A and Sanna, M. A. 2002. Biodegradation of agro-indusrrial orange waste under solid
37. Bokhary, H.A. and Parrez, S.1994. Extracellular cellulose enzyme production by soil mycoflora in Saudi Arabia . king saud Univ . vol. 6 , Science .2 : 137-148.
38. Deshpande,S.K.;Bhotmange, M.G.; Chakrabarti, T.and Shastri, P.N. 2008. Production of cellulose and xylanase by *Trichoderma reesei* (QM9414) mutant, *Aspergillus niger* and mixed culture by solid state fermentation (SSF) of water hyacinth (Eichhornia crassipes). Chen . Technol . 15 : 449-456.
39. Alam ,Md. Z.; Muhammad, N. and Mahmat, M.E. 2005. Production of cellulose from oil palm biomass as substrate by solid state bioconversion. Appl. Science . 2(2) ; 569-572.
40. Pothiraj, C.; Balaji, P. and Eyini, M. 2006. Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste . Biotech . 5(20) : 1882-1885.
41. Mekala, N.k. and Singhania ,R.R. 2008. Cellulase production under solid state fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C30 : statistical optimization of process parameters. Appl. Biochem. Biotechnol. 151;122-131.
42. Takao,S.; Kamagata,Y. and Sasatri, H. 1985. Cellulase production by *Penicillium purpurogenum*. Ferment. Technol . 63 (2) : 127-134.
43. Mangat, M.K. and Mandahr, C.L. 1998. Effect of cultural conditions on the production of cellulases by *Helminthosporium teres* . Res . Bull . Punjab University Sci . 46 (1-4) : 139-145 .
44. Ikram-Ul-H.; Muhammad, M.J.; Tehamina, S.K. and Zafar,S. 2005. Cotton saccharifying activity of cellulases production by co-culture of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. Agriculture and Biological sciences. 1(3): 241-245.
45. El-Refai, A.M.H.; Atalla, M. M. and El-Safty, H.A. 1984. Microbial formation of cellulases and proteins from cellulosic residues . Agriculture wastes. 11: 105-113.
46. kudanga, T. and Mwenje, E.2005. Extracellular cellulose production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. Can. J. Microbiol. 51 (a) : 773-776 .
47. Wan Mohtar, W.Y.; Muhannad, I.M.; Othman, O. and Jalil,K.2000. Sugar cane bagasse degradation by mixed culture of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus terreus* in solid substrate fermentation . Biological Sciences. 3(10): 1758-1761.
48. Muthuvelayudham,R.and Viruthagir, A. 2006. Fermentative production and kinetics of cellulose protein on *Trichoderma reesei* using sugar cane bagasse and rice straw .African J. Biotechnol. 5 (20) : 1873-1881 .
٤٩–الصميدعي ، طه عبدالوهاب. ٢٠٠٨ .تاثير فترات مختلفة من التحضين ومصادر كاربونية مختلفة في انتاج انزيم البيتا – كلوكوسايديس بوساطة عزلة محلية للفطر *Trichoderma harzianum* . مجلة تكريت للعلوم الصرفة . مجلد ١٣ . العدد ٢ : ٣٣–٣٧ .

٥٠–دلالي ، باسل كامل . ١٩٩٠. موضوعات مختارة في التكنلوجيا الحيوية . دار الكتب للطباعة والنشر . مطبعة جامعة الموصل . العراق .

51. luiza, J. 2000. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. Industrial crops and Products . 11 : 1-5 .

52. Acebal, C.;Castillon, M.; Estrada, P.; Mata, I. and Costa,E. 1986. Enhanced cellulose production from *Trichoderma reesei* QM 9414 on physically treated wheat straw . Appl . Microbiol. Biotechnol . 24: 218-223.

53. Murao, S.; Sakamoto, R. and Arai, M. 1988. Cellulase of *Aspergillus aculeatus*. In: Methods in enzymology. Academic Press . 160 : 275-284 .

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

55. Deschamps, F.; Giuliano, C.; Asther, M.; Huet, M.C. and Oussos, S. 2004. Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid state fermentation reactors under non aseptic conditions. Biotech & Bioengine. 27. Issue. 9: 1385-1388 .

Assesment The Efficiency of Some Local Fungal isolates in The Production of Cellulase Enzyme

Shimal Y.Abdul-Hadi

Department of Biology , College of Education , Mosul University , Mosul , Iraq

(**Received:** 7 / 2 / 2010 ---- **Accepted:** 23 / 5 / 2010)

Abstract:

Nine local strains of fungi were isolated and characterized they are related to the following genera: *Aspergillus niger* , *Alternaria alternate*, *Penecillium sp*, *Rhizopus sp*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Drechslaria sp* and *Trichoderma viride* , from the soil of University of Mosul .And another isolation *Aureobasidium pullulans* from orange leaves. The ability of isolated fungi to cellulase production in a solid media was investigated . Aquantitative test using liquid media is used to identify the most effective isolation for cellulase production. The isolation of *T.viride* gave highest production of cellulase (4.67) unit/ml . Carboxymethyl cellulose as a carbon source gave highest production of enzyme cellulase (4.72) unit/ml .The pH 5.5 considered the Optimum one for enzyme production, as it gave (4.96)unit/ml .