

الشروط المثلى لإنتاج إنزيم الكزلييناز من الفطر *Trichoderma viride* باستخدام منهجية سطوح الاستجابة

د.نسرين نقشو***

د.شيم سليمان**

أ.د.رامز محمد**

سماهر صقور*

(الإيداع: 26 نيسان 2022، القبول: 21 تموز 2022)

الملخص:

يعد إنزيم الكزلييناز من الإنزيمات التي تتميز بتطبيقات صناعية مختلفة وأهمها الوقود الحيوي، الأعلاف، الصناعات الغذائية، الورق، ولذلك هدف هذا البحث إلى تحديد الشروط المثلى لإنتاج إنزيم الكزلييناز من الفطر (*Trichoderma viride*) باستخدام تقنية سطوح الاستجابة، وقرون نبات الغاف كوسط غذائي (*Prosopis juliflora*). تمّ استخدام التصميم المركب المركزي للتحقق من تأثير أربعة متغيرات مستقلة في عامل الاستجابة وهو فعالية إنتاج إنزيم الكزلييناز، والمتغيرات هي رقم الحموضة pH، تركيز قرون نبات الغاف (%)، تركيز السكر (%)، تركيز السكر (كأفضل مصدر للكربون) (%)، تركيز مستخلص الخميرة (كأفضل مصدر للنيتروجين) (%). اختيرت القيم الفعلية بناءً على نتائج التجارب الأولية واختبرت المتغيرات المستقلة على ثلاث مستويات. تمّ توقع نتائج الاستجابة من خلال استخدام نموذج متعدد الحدود من الدرجة الثانية. أظهر تحليل الانحدار أنّ الانحرافات قد فسرت من خلال النموذج، حيث أظهرت نتائج الدراسة شروط الإنتاج المثالية لإنزيم الكزلييناز هي رقم pH يساوي 6.5، وتركيز قرون نبات الغاف 4.6%، تركيز السكر 0.3%، تركيز مستخلص الخميرة 0.4%، وقد تمّ إنتاج إنزيم الكزلييناز تحت الشروط المثالية المتوقعة وذلك للتحقق من صلاحية النموذج وكانت النتائج 122.9 mL/UI. لقد دلّ تطابق النتائج التجريبية مع القيم النظرية المتوقعة على أنّ النموذج المستخدم ملائم وأنّ منهجية سطوح الاستجابة في تحديد الشروط المثلى للإنتاج كانت ناجحة.

الكلمات المفتاحية: *Trichoderma virid*، إنزيم الكزلييناز، شروط إنتاج الكزلييناز.

*طالبة دكتوراه، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية.

** أستاذ، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية.

*** مدرس، قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية.

**** باحثة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق.

Determining Optimum Conditions for production of xylanase From *Trichoderma viride* Using Response Surface Methodology

Samaher sakkour* Dr.Ramez Mohammad** Dr.Sheiam Sulaeman*** Nesrin Naksho****

(Received:26 April 2022,Accepted:21 July 2022)

Abstract:

The xylanase is one of the enzymes that is characterized by various industrial applications, the most important of which are biofuels, feed, food industries, and paper. In this study, the optimal conditions for the production of xylanase by (*Trichoderma viride*) using response surface methodology, and using pods an agricultural, tree could Ghaf (*Prosopis juliflora*), A Central Composite Design was used to investigate the effects of four independent variables: pH, concentration pods (w/v %), concentration sucrose(%),concentration yeast extract(%), on the response factor, xylanase activity (UI/mL), The independent variables were at three levels and their actual values selected on the basis of preliminary experimental results. A second-order polynomial model was used for predicting the response.

Regression analysis showed that the variation was explained by the model. The optimal conditions for xylanase activity were found to be pH=6.5, concentration pods 4.6 (w/v %), concentration sucrose 0.3(%),concentration yeast extract 0.4(%), Under the optimum conditions the corresponding predicted response value for xylanase activity was 122.9 UI/mL.

The good agreement between predicted and experimental values indicated suitability of the model employed and the response surface methodology in optimizing the xylanase activity was successful.

Keywords: xylanase, *Trichoderma viride*, Optimum production of xylanase.

* (Ph.D.) student, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, SYRIA.

**Professor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, SYRIA.

*** Professor, Department of Food Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, SYRIA.

**** Professor in NCBT in Damascus.

1- المقدمة:

إن الكزيليناز من الإنزيمات التي تتوسط عملية التحلل المائي للكيلان، حيث يعتبر الكزيلان (xylan) المكون الرئيسي للهيميسيلوز الذي يحتل المرتبة الثانية بعد السيلوز من حيث وجوده في جدر الخلايا النباتية (Irfan وزملاؤه، 2014)، كما أن عملية التحلل المائي للكيلان معقدة تتطلب تضافر وتداخل العديد من الإنزيمات المحللة للكيلان (xylanolytic)، حيث تتضمن هذه الإنزيمات إنزيم الكزيليناز الذي يهاجم الرابطة 1-4 β ضمن السلسلة الرئيسية للكيلان وينتج عن عمل هذا الإنزيم تحرر سكر D- كزيلوز (D-xylose) (Collins وزملاؤه، 2005).

حيث وجد (Battan وزملاؤه (2006) و Pirota وزملاؤه (2014) أن إنتاج الكزيليناز يتم من قبل العديد من الكائنات الحية الدقيقة مثل الجراثيم، والفطريات، والخمائر عن طريق التخمرات الصلبة والمغمورة (solid and submerged fermentation)، وقد وضع Jurgen و Holke (2005) أن إنتاج الكزيليناز من الميكروبات يعد من الطرائق المهمة والمستخدمة لإنتاج الإنزيمات بسبب العديد من المزايا أهمها الإنتاجية العالية، والتركيز المرتفع نسبياً من الإنزيمات الناتجة، إضافة إلى انخفاض تكلفة معدات التخمر و ذكر Latif وزملاؤه (2006) أن فطريات العفن من أكثر الكائنات الحية الدقيقة استخداماً في إنتاج الكزيليناز وذلك ضمن مجال حراري ما بين 40-60°م، كما تبين أن العديد من العوامل تؤثر في إنتاج الإنزيمات من الميكروبات أهمها اختيار البيئة المناسبة وطريقة معالجتها قبل البدء بعملية التخمر والنشاط المائي للوسط الغذائي، وكذلك نوع الميكروب المستخدم، وتركيز المعلق البوغي، ودرجة الحرارة (Pandey، 2003)، وقد أشار Walia وزملاؤه (2017) إلى أن جنس *Trichoderma* يعتبر من أهم الأجناس الفطرية ذات الإنتاجية المرتفعة لإنزيمات الحلمهة (hydrolase enzyme) خصوصاً الكزيليناز، وتعددت الدراسات التي أشارت إلى إنتاج الكزيليناز من أنواع مختلفة تابعة للجنس *Trichoderma spp.* علماً أن الأنواع التابعة لهذا الجنس تقوم بإفراز كل من الكزيليناز والسيلولاز في آن واحد خلال العديد من التخمرات (Wu، 2012؛ Jun وزملاؤه، 2011).

إن النفايات والمخلفات الناتجة من الزراعة والصناعات المختلفة والتي تتراكم بمعدل مرتفع هي ذات عالي من الكربوهيدرات والمواد المغذية الأخرى يمكن الاستفادة منها كوسط غذائي لإنتاج المواد الكيميائية والإنزيمات عن طريق التخمرات (Longo و Sanromán، 2006؛ Anwar وزملاؤه، 2014)، وقد أشار (Zhang وزملاؤه (2014) إلى تزايد الاهتمام بهذه المخلفات في الآونة الأخيرة، إلا أن إجراء عملية التحلل المائي للسكريات المتعددة باستخدام الأحماض والقلويات مكلف من جهة ومن جهة أخرى توجد مشكلة في كيفية التخلص من الأحماض والقلويات المضافة، لذلك فإن إجراء عملية التحلل باستخدام الإنزيمات أفضل.

وتتجه الدراسات الحالية إلى استبدال الأوساط الصناعية خلال عملية التخمر بأوساط من مخلفات زراعية وذلك بهدف تخفيض تكلفة إنتاج الإنزيم (Narendhirakannan و Manivannan، 2014؛ Lo وزملاؤه، 2010)، نظراً للأسباب السابقة الذكر فقد تمّ اعتماد قرون نبات الغاف البقولي (*Prosopis juliflora*) كوسط غذائي لإنتاج الكزيليناز وفق الدراسات المرجعية (Ramasamy وزملاؤه، 2014).

تزايد الاهتمام حالياً في التحاليل الإحصائية باستخدام منهجية سطوح الاستجابة (Response Surface Methodology) (RSM) في تحديد تأثير تفاعل عدة متغيرات، فقد كانت الدراسات حول تأثير كل عامل بشكل منفصل عن تأثير العوامل الأخرى وهذا لا يعطي نتيجة دقيقة، في حين أن استخدام منهجية سطوح الاستجابة تعطي نتائج دقيقة لتحديد مدى استجابة وتأثر إنتاج إنزيم الكزيليناز بالعديد من العوامل أهمها مصدر النيتروجين والكربون، ودرجة الحرارة، ودرجة الحموضة pH وفق الدراسات المرجعية (Kanaga وزملاؤه، 2016؛ Srikanth وزملاؤه، 2015).

يتم استخدام الكزيليناز في علف الحيوانات، وصناعة العصائر، وتحسين الخصائص الفيزيائية والحسية والريولوجية للعجين والخبز الناتج (Buthelezi وزملاؤه، 2011)، ويعد إنزيم الكزيليناز من الإنزيمات التي تتميز بتطبيقات صناعية مختلفة أهمها الوقود الحيوي، الصناعات الغذائية، والورق، ونظراً لعدم وجود دراسة في سورية تتعلق بإنتاج الإنزيم باستخدام المخلفات الزراعية بهدف تخفيض تكلفة إنتاج الإنزيم فقد هدف البحث إلى تحديد الشروط المثلى لإنتاج إنزيم الكزيليناز من الفطر *Trichoderma viride* باستخدام تقنية سطوح الاستجابة، وقرون نبات الغاف (*Prosopis juliflora*) كوسط غذائي.

2- مواد البحث وطرقه:

1- **الحصول على العزلات الفطرية:** تم الحصول على عزلات الفطر (*Trichoderma viride*) من المحيط الجذري لشجرة الزيتون *Olea europaea* على عمق (5-10سم)، حيث تم أخذ 0.5غ من عينة التربة وجففت بطريقة التجفيف الطبيعي في الظل، وتم طحنها ثم نثرها على سطح طبق بتري بلاستيكي قطر (9سم) يحتوي على (25مل) من الوسط الغذائي PDA (Potato –Dextrose Agar) والمضاف له المضاد الحيوي أمبيسيلين لتفادي نمو الجراثيم، وتم تحضين الأطباق عند درجة حرارة (25±2م) لمدة أسبوع، وسجلت الخصائص المزرعية بعد مرور سبعة أيام من التحضين (Walter وزملاؤه، 2006).

2- **تحضير المعلق البوغي:** تم تحضير المعلق البوغي من مستعمرات متبوعة على أطباق بتري، حيث غمرت المستعمرات بالماء المقطر (20 مل) الممزوج مع Tween-80 (0.1%)، وتركت الأطباق مغطاة لمدة لا تقل عن ساعة حتى تتحرر الأبواغ، ثم ضبط تركيز المعلق بوساطة شريحة العد (Venkatesh و Girija، 2009).

3- **تحضير المادة الغذائية:** تم جمع قرون نبات الغاف (*Prosopis juliflora*) المزروع في حديقة كلية الزراعة بجامعة تشرين، وجففت بشكل طبيعي في الظل، ثم طحنت القرون بمطحنة مخبرية بحيث يصبح قطرها 425 ميكرون (Ramasamy وزملاؤه، 2014).

4- **إنتاج الإنزيم:** أضيف المعلق البوغي (1مل) ذو التركيز (10⁵ بوغ/مل) إلى دوارق مخروطية سعة 250 مل والتي تحوي على 100 مل من وسط معقم فيها (30 غ/ل) من قرون نبات الغاف، و(4 غ) من كربونات الكالسيوم وضبط رقم الحموضة pH عند 6.5، ثم وضعت الدوارق في حاضنة هزازة بسرعة دوران (150 دورة/دقيقة) ولمدة (120 ساعة) عند درجة الحرارة (30 م° مئوية). وبعد انقضاء فترة التخمر أجريت عملية الترشيح لمحتوى كل دورق، وأخذ الراشح لإجراء عملية طرد مركزي بسرعة (10000دورة) rpm) لمدة (10 دقائق) وذلك وفق ما أشار إليه Jampala وزملاؤه، (2017).

5- **قياس فعالية الإنزيم:** تم تحضير سلسلة معيارية من سكر الكزيلوز كما هو موضح في الشكل (2) وذلك لقياس فعالية إنزيم الكزيليناز حيث ينتج عن عمل إنزيم الكزيليناز سكر الكزيلوز، ثم تم قياس فعالية الإنزيم بإضافة 0.5 مل من المستخلص الإنزيمي إلى 1مل من محلول السترات الموقى (0.05 M)، ثم ضبط رقم الحموضة pH عند 4.8، وخلطت مع 0.5 مل من محلول الركييزة birchwood ذي تركيز (1% وزن من الركييزة/حجم ماء مقطر)، ثم وضعت في حمام مائي (50 م°) لمدة 30 دقيقة، وأضيف بعدها 2 مل من حمض ثنائي نثرو سالسليك (dinitrosalicylic acid) (DNS) المحضر بطريقة Miller، (1959)، ثم وضع المزيج في حمام مائي عند درجة حرارة 90م° لمدة 10دقائق، ثم تم قياس الامتصاص الضوئي عند طول الموجة 540 نانومتر. وبذلك تم الحصول على فعالية إنتاج الإنزيم مقدره بوحدة الإنزيم Unit/ملييلتر Jampala وزملاؤه، (2017).

6- **تحديد الشروط المثالية للاستخلاص:** تم في البداية تحديد وسط إنتاج إنزيم الكزيليناز باستخدام أربعة عوامل هي رقم الحموضة pH (A)، وتركيز قرون نبات الغاف (B)، وتركيز مستخلص الخميرة (yeast extract) (C)،

وتركيز السكروز (sucrose) (D)، وتم اختبار عدة مستويات لهذه العوامل حيث تمَّ تحديد هذه المستويات من خلال تجارب أولية أجريت، حيث أنه لاختيار رقم الحموضة pH الأفضل تم استخدام التراكيز الآتية 5، 5.5، 6، 6.5، 7، 7.5، 8، 8.5، ولتحديد التركيز المناسب من قرون نبات الغاف تمَّ تطبيق تراكيز مختلفة هي: 1، 2، 3، 4، 5، 6%، وتمَّ تحديد أفضل مصدر للكربون باستخدام المواد الآتية: الغلوكوز، والفركتوز، والسكروز، والمالتوز، واللاكتوز، وكربوكسي ميثيل السيللوز CMC، حيث تمت إضافتها إلى وسط التخمر بنسبة 0.4% (v/w)، كما تمَّ تحديد أفضل مصدر للنروجين: باستخدام المواد الآتية: بيتون، ومستخلص الخميرة، وكبريتات الأمونيوم، ونترات البوتاسيوم، والكارئين، وكلوريد الأمونيوم، حيث تمت إضافتها إلى وسط التخمر بنسبة 0.4% (v/w) وفق الدراسة المرجعية (Jampala وزملاؤه، 2017).

7- **تصميم التجربة Experimental design:** بعد إجراء التجارب الأولية استخدمت أفضل القيم الناتجة من أجل تحديد أفضل شروط الاستخلاص باستخدام التصميم المركب المركزي Central Composite Design الذي يتضمن إجراء 26 تجربة تتوزع فيها العوامل بشكل عشوائي بمعدل ثلاثة مكررات للنقاط التجريبية. إنَّ المتغيرات الأربعة المدروسة هي: العامل الأول رقم الحموضة pH (A)، والعامل الثاني تركيز قرون نبات الغاف (B) (% نسبة مئوية)، والعامل الثالث تركيز السكروز (C) (% نسبة مئوية)، والعامل الرابع تركيز مستخلص الخميرة (D) (% نسبة مئوية)، بينما عامل الاستجابة فهو فعالية إنتاج إنزيم الكزيليغاز حيث تمَّ التعبير عن القيم بوحدة الإنزيم (UI/mL) (Kanaga وزملاؤه، 2016).

8- **تحليل البيانات Data analysis:** تم استخدام برمجيات (Stat Ease, USA) design expert ver. 9. لتحليل الانحدار لسطوح الاستجابة بيانات التجربة حيث وافقت بيانات التجربة نموذج متعدد الحدود من الدرجة الثانية. إنَّ مدى ملاءمة معادلة النموذج من الدرجة الثانية تظهر من خلال تحديد معامل التحديد R^2 واختبار نقص المطابقة من خلال الفحص باختبار F.

يمثل معامل التحديد (R^2) مربع معامل الارتباط ويشير إلى مدى تطابق البيانات بين النتائج الفعلية والقيم المحسوبة من خلال النموذج. تمَّ حساب

اختبار نقص المطابقة Lack of fit (F) على الشكل الآتي:

$$1- \text{مجموع مربعات أخطاء النموذج } SS(p.e)$$

2- مجموع مربعات نقص المطابقة $SS(L.O.F) = SSe - SS(p.e)$ حيث أن SSe مجموع المربعات (sum of squares) أما احتساب اختبار نقص المطابقة (F) فقد كان وفق الصيغة التالية:

$$F = MS(L.O.F) / MS(p.e) \text{ حيث أن } MS \text{ تباين المعالجات على تباين الخطأ (Kanaga وزملاؤه، 2016).}$$

9- **اختبار موثوقية النموذج:** تعتمد الظروف المثالية لإنتاج إنزيم الكزيليغاز على رقم الحموضة pH، وتركيز قرون نبات الغاف، وتركيز مستخلص الخميرة، وتركيز السكروز المتحصل عليها باستخدام معادلات التنبؤ من منهجية سطوح الاستجابة. تمَّ تحديد فعالية إنتاج الكزيليغاز تحت الشروط المثلى للإنتاج ثم مقارنة القيم الفعلية والنظرية لتحديد صلاحية النموذج.

3- النتائج والمناقشة:

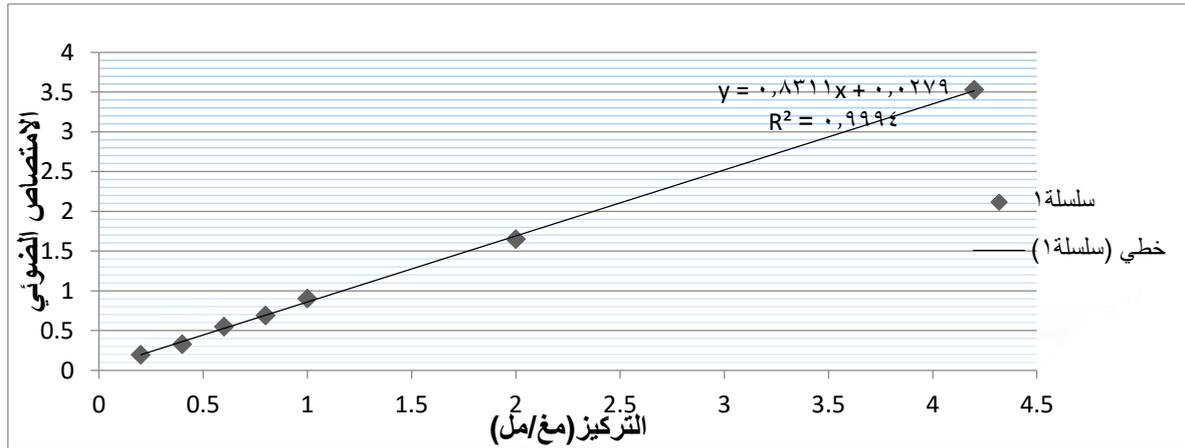
3-1 تعريف النوع الفطري:

تمّ تحديد هوية الفطر (*Trichoderma viride*) اعتماداً على المراجع التصنيفية (Walter et al., 2006)، وتمثلت أهم الصفات المزرعية والمجهريّة للفطر بما يلي: الحوامل الكونيدية طويلة ورفيعة، الزوائد متطاولة وغير متراكمة، المستعمرات ذات لون أخضر مع وجود حوامل متجمعة على شكل عناقيد، الحوامل الكونيدية ذات تفرع غصني، الأبواغ ذات جدار خشن، لون السطح السفلي للمستعمرة أبيض مخضر أما السطح العلوي بلون أخضر فاتح، شكل التبوغ دوائر متداخلة ومتمدة المركز، لون الأبواغ أخضر كما هو موضح في الشكل، بدأ التبوغ في اليوم الرابع من التحضين بشكل خفيف وازداد في اليوم السادس، ولم يتم إنتاج أي صبغة من قبل الفطر. أظهرت هذه الدراسة إمكانية استخدام المواد الأولية السيلولوزية والمخلفات الزراعية كأوساط غذائية في عمليات التخمير للحصول على الأنزيمات، حيث تبين أن قرون الغاف وسط جيد لنمو الأنواع الفطرية المدروسة وهذا يتوافق مع ما أشار إليه Ramasamy وزملاؤه، (2014)، ويتناسب مع ما ذكره Taibi وزملاؤه، (2012) الذي أشار إلى أن احتواء قرون نبات الغاف على الكزيلان يساعد على تحفيز إنتاج الكزيليناز.



الشكل رقم (1): *Trichoderma viride*

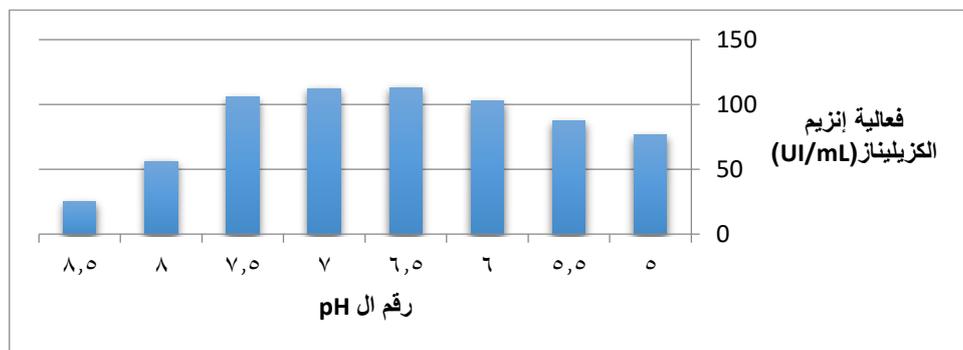
وهنا لا بد من الإشارة إلى أن قياس فعالية إنزيم الكزيليناز تمت بالاعتماد على السلسلة العيارية المحضرة من سكر الكزيلوز الموضحة في الشكل (2)



الشكل رقم (2): السلسلة العيارية لسكر الكزيلوز

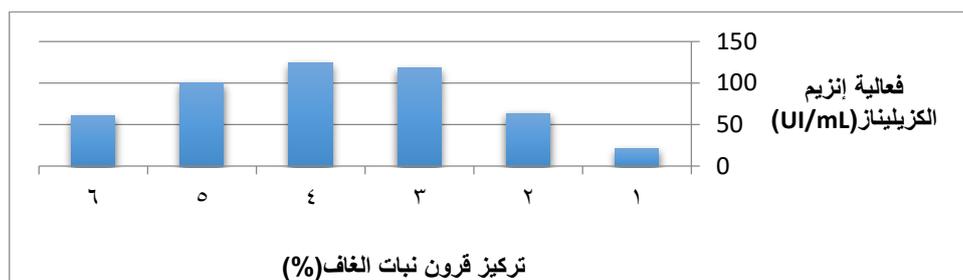
2-3- تأثير درجة ال pH: يوضح الشكل (3) أنّ رقم الحموضة pH المثالي لإنتاج الكزيليناز من الفطر *Trichoderma viride* هو 6.5 بفعالية إنزيمية قدرها 0.040 ± 113.05 (وحدة إنزيم/ملييلتر)، وهذا يتوافق مع الدراسة التي قام بها

Knob و Fortkamp (2014)، بينما يختلف مع ما توصل إليه Goyal وزملاؤه، (2008) الذي حدد رقم الحموضة المثالي ما بين 3.5-4، في حين أشارت العديد من الدراسات إلى انخفاض إنتاج الكزيليناز في الأوساط القلوية (Ninawe وزملاؤه، 2008). تشير الدراسات (Carmona وزملاؤه، 2005؛ Ahmed وزملاؤه، 2012) إلى أن فطريات العفن تفضل الأوساط الحامضية للنمو وإنتاج الكزيليناز وتخفض قدرة الفطريات عموماً على إنتاج الكزيليناز مع ارتفاع رقم الحموضة pH، ويعتبر رقم الحموضة pH 6.5 هذا مناسب في عمليات صناعة الورق (Carmona وزملاؤه، 2005؛ Ahmed وزملاؤه، 2012)، التي يتوسطها الكزيليناز والتي تتطلب أوساط حامضية،



الشكل رقم(3): تأثير رقم الحموضة pH على إنتاج إنزيم الكزيليناز

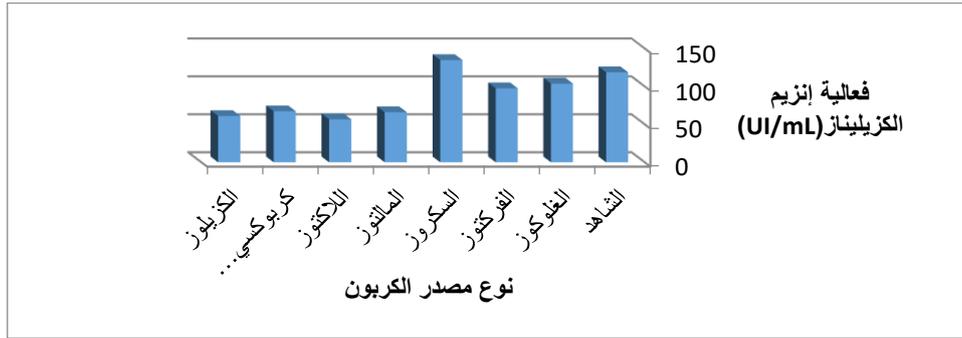
3-3- تأثير تركيز قرون نبات الغاف على إنتاج إنزيم الكزيليناز: يبين الشكل (4) أنّ التركيز الأفضل لقرون نبات الغاف التي تحقق أعلى فعالية لإنتاج الإنزيم هو 4%، فقد حقق هذا التركيز فعالية إنتاجية قدرها 0.20 ± 123.63 وحدة إنزيمية/مل، ولوحظ انخفاض في إنتاج الكزيليناز عند التراكيز المنخفضة من قرون نبات الغاف إلا أن الإنتاج يزداد بازدياد تركيز القرون، ويعود ذلك إلى تأثير نسبة الليغوسيللوز الموجودة في الوسط الغذائي والتي تعمل على تحفيز الميكروبات على إنتاج الكزيليناز كما ذكر Hoda وزملاؤه، (2012)، ولوحظ أن زيادة تركيز قرون نبات الغاف عن 4% يسبب انخفاض كبير في نسبة الرطوبة في الوسط مما يسبب انخفاض في إنتاج الكزيليناز وهذا يتفق مع ما توصل إليه Nathan وزملاؤه، (2017).



الشكل رقم (4): تأثير تركيز قرون نبات الغاف على إنتاج إنزيم الكزيليناز

3-4- تأثير مصدر الكربون: تمت دراسة تأثير المصدر الكربوني على إنتاج الكزيليناز من خلال استخدام المصادر الآتية: الغلوكوز، الفركتوز، السكروز، المالتوز، اللاكتوز، كربوكسي مثيل السيللوز، الكزيلوز، يوضح الشكل (5) أن جميع مصادر الكربون التي تمت إضافتها أدت إلى إنتاج الإنزيم بكميات منخفضة باستثناء السكروز حيث كان أعلى إنتاج للكزيليناز عند استخدام السكروز كمصدر للكربون بفعالية قدرها 0.081 ± 134.8 وحدة إنزيمية/مل، وهذا يتفق مع ذكره Gautam وزملاؤه، (2011) الذي بينت نتائجها أنّ السكروز أفضل مصدر كربوني من أجل زيادة الكتلة الحيوية، إلا أنّ هذه النتيجة تختلف مع ما أشار إليه Irfan وزملاؤه، (2014) الذي حدد الكزيلوز كأفضل مصدر كربوني، في حين حدد Goyal وزملاؤه، (2008)

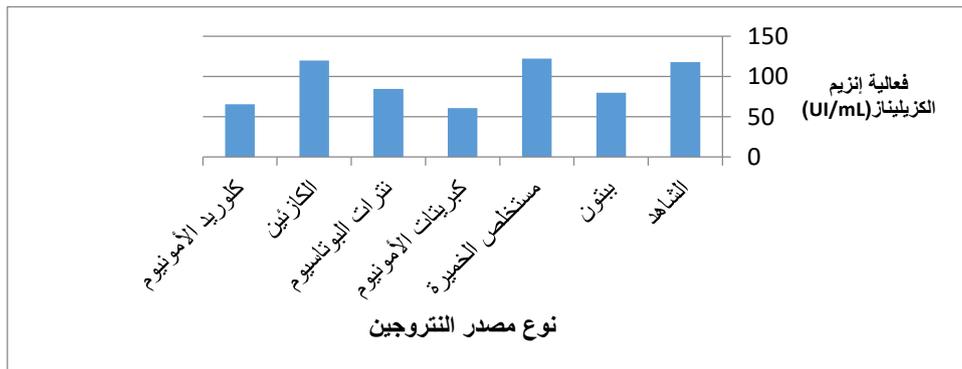
الكزِيلان التجاري كأفضل مصدر للكربون، وهنا لابدّ من الإشارة إلى أن استخدام المصادر الكربونية النقية يعتبر أمراً مكلفاً اقتصادياً بالنسبة للتطبيقات الصناعية (Jun وزملاؤه، 2011)، إن عملية إنتاج الإنزيمات من قبل الكائنات الحية الدقيقة تعتمد بشكل كبير على المصدر الكربوني المتوفر في الوسط والذي يعتبر المحرض الرئيسي لإنتاج الإنزيمات الخلوية كما أورد Kachlishvili وزملاؤه (2006)، وفي هذه الدراسة قامت قرون نبات الغاف بدور وسط غذائي لإنتاج الكزِيلانز، إلا أن الإضافة التكميلية من مصادر الكربون حفزت نمو الفطر *Trichoderma viride* وكذلك حفزت عملية إنتاج إنزيم الكزِيلانز.



الشكل رقم (5): تأثير مصدر الكربون على إنتاج إنزيم الكزِيلانز

3-5- تأثير مصدر النتروجين:

يعد مصدر النتروجين من أهم العناصر الغذائية التي تؤثر في عملية إنتاج الإنزيمات من قبل الفطريات الخيطية (Kachlishvili وزملاؤه، 2006؛ Sun وزملاؤه، 2004)، وإضافة مكملات من المصادر النتروجينية إلى الوسط الغذائي يحفز الفطريات على إنتاج الإنزيمات الخلوية (Kapich وزملاؤه، 2004)، وقد تمت دراسة تأثير مصدر النتروجين على إنتاج الكزِيلانز من خلال استخدام المصادر الآتية: بيتون، ومستخلص الخميرة، وكبريتات الأمونيوم، ونواتر البوتاسيوم، والكازئين، وكلوريد الأمونيوم الشكل (6)، وقد بينت النتائج أن أعلى إنتاج للكزِيلانز عند استخدام مستخلص الخميرة كمصدر للنتروجين بفعالية قدرها 0.081 ± 122.2 وحدة إنزيمية/مل. وهذا يختلف مع ما توصل إليه (Irfan وزملاؤه، 2014) الذي حدد التريتون كأفضل مصدر كربوني، في حين (Goyal وزملاؤه، 2008) حدد نواتر الصوديوم كأفضل مصدر للنتروجين.



الشكل رقم (6): تأثير مصدر النتروجين على إنتاج إنزيم الكزِيلانز

3-6- تصميم النموذج: يوضح الجدول (1) تصميم التجربة ونتائج البيانات التجريبية والقيم المتوقعة لفعالية إنتاج إنزيم الكزيليغاز تحت ظروف إنتاج مختلفة. وهنا لا بد من الإشارة إلى أن القيم قد تم تحديدها بوساطة البرنامج الإحصائي بناءً على قيم التجارب الأولية.

الجدول رقم (1) : تصميم التجربة ونتائج البيانات التجريبية والقيم المتوقعة لفعالية إنتاج الكزيليغاز تحت ظروف إنتاج مختلفة

Run	Factor 1 A: pH	Factor 2 B: substrate %(w/v)	Factor 3 C: sucrose %(w/v)	Factor 4 D: yeast extract %(w/v)	Response Xylanase enzyme	
					actual	predicte
1	6	3	0.2	0.25	48.04	42.95
2	7	3	0.2	0.25	63.9	59.39
3	6	3	0.2	0.75	49.9	47.23
4	7	3	0.2	0.75	37.78	45.14
5	6	3	0.6	0.25	41.57	35.33
6	7	3	0.6	0.25	51.4	52.46
7	6	3	0.6	0.75	27.25	34.01
8	7	3	0.6	0.75	10.8	9.99
9	6	5	0.2	0.25	49.7	56.92
10	7	5	0.2	0.25	101.2	93.60
11	6	5	0.2	0.75	38.6	37.75
12	7	5	0.2	0.75	43.25	55.90
13	6	5	0.6	0.25	65.7	57.49
14	7	5	0.6	0.25	60.5	72.24
15	6	5	0.6	0.75	21.8	32.72
16	7	5	0.6	0.75	24.7	28.94
17	6.5	4	0.4	0.5	115.8	103.52
18	6.5	2	0.4	0.5	63.9	59.39
19	6.5	6	0.4	0.5	112.5	118.05
20	6.5	4	0	0.5	51.6	52.46
21	6.5	4	0.8	0.5	24.3	17.88
22	6.5	4	0.4	0	55.3	64.43
23	6.5	4	0.4	1.00	40.1	25.41
24	5.5	4	0.4	0.5	8.2	11.39
25	7.5	4	0.4	0.5	32.8	24.05
26	6.5	4	0.4	0.5	123.6	118.05

أظهر تحليل التباين (ANOVA) أن النموذج المختار يمثل البيانات التي تم الحصول عليها بشكل كاف، ويظهر الجدول (2) نتائج تحليل التباين ANOVA لفعالية إنتاج إنزيم الكزيليغاز، ويلاحظ أن قيمة F تساوي 11.58 وهذا يشير إلى معنوية النموذج المستخدم، وهناك احتمال قدره 0.01% فقط لحدوث خطأ. ويُلاحظ أن قيمة $p < 0.0001$ تشير إلى

اختلاف الاستجابة المتوقعة عند اختلاف شروط الإنتاج، كما يلاحظ عدم معنوية اختبار نقص المطابقة مما يؤكد على أن النموذج المستخدم ملائم.

الجدول رقم (2): تحليل التباين ANOVA للنموذج المستخدم

p-value	F-value	متوسط مجموع مربعات (Mean Square)	درجات الحرية	مجموع المربعات	مصدر التباين
0.0001	11.58	1577.83	14	22089.62	النموذج Model
		136.21	11	1498.31	البواقي Residual
0.1722	5.18	159.63	9	1436.70	نقص المطابقة Lack of Fit
		30.80	2	61.60	خطأ النموذج Pure Error
			25	23587.92	الخطأ الكلي Cor Total
0.2251	1.65	225.00	1	225.00	A رقم ال pH
0.0068	11.06	1506.62	1	1506.62	B تركيز قرون نبات الغاف
0.0049	12.33	1678.91	1	1678.91	C تركيز السكروز
0.0022	15.69	2137.77	1	2137.77	D تركيز مستخلص الخميرة
0.1269	2.73	371.52	1	371.52	AB
0.1033	3.16	429.92	1	429.92	AC
0.1614	2.25	307.10	1	307.10	AD
0.5176	0.4470	60.88	1	60.88	BC
0.0821	3.66	498.73	1	498.73	BD
0.6585	0.2063	28.10	1	28.10	CD
< 0.0001	80.34	10942.77	1	10942.77	A ²
0.0183	7.66	1043.50	1	1043.50	B ²
< 0.0001	54.82	7467.43	1	7467.43	C ²
< 0.0001	42.68	5813.90	1	5813.90	تركيز قرون نبات الغاف D ²

تمَّ تحديد أهمية كل معامل من خلال قيمة F في الجدول (2)، ويلاحظ أن تركيز مستخلص الخميرة كان له الأثر الأكبر في إنتاج الكزلييناز. وقد أظهر تحليل التباين ANOVA لثوابت انحدار سطوح الاستجابة المتوقعة في نموذج كثير الحدود من الدرجة الثانية لفعالية إنتاج الكزلييناز أن كلا من المؤشرات الخطية والتربيعية والتأثير المشترك كانت معنوية بشكل عالي. كما تم تقييم كفاءة النموذج بواسطة معامل تحديد R^2 كما يظهر في الجدول (3) حيث نلاحظ أن قيم R^2 مرتفعة مما يشير إلى وجود ارتباط قوي. يشير معامل الاختلاف (CV) إلى مقدار تشتت البيانات. وقد ظهر بأن معامل الاختلاف CV للفعالية الإنزيمية كان ضمن الحد المقبول.

الجدول رقم (3): تحليل التباين ANOVA لثوابت انحدار سطوح الاستجابة في نموذج كثير حدود من الدرجة الثانية

توابت معاملات الانحدار	فعالية إنزيم الكزلييناز
المتوسط \pm الانحراف المعياري	11.67 \pm 52.41
معامل التحديد R^2	0.9365
معامل التحديد المعدل R^2 Adjusted	0.8556
معامل التحديد المتوقع R^2 Predicted	0.6236
التباين % C.V.	22.27
التذبذب Adeq precision	12.1897

3-7- تحليل سطوح الاستجابة Analysis of response surface:

إن العلاقة بين المتغيرات المستقلة والمرتبطة موضحة في تمثيل ثلاثي الأبعاد لسطوح الاستجابة في الأشكال (7، 8، 9، 10، 11، 12) حيث تبين أن تأثير جميع العوامل المدروسة على إنتاج الكزلييناز (رقم الحموضة pH، تركيز قرون نبات الغاف، تركيز السكر، تركيز مستخلص الخميرة) من الدرجة الثانية.

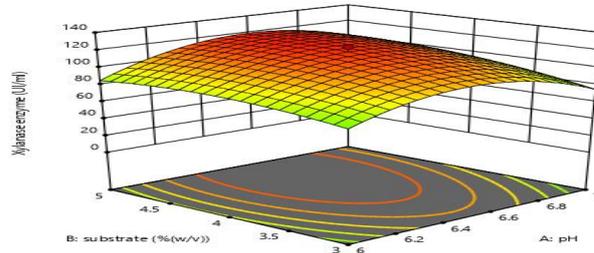
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Xylanase enzyme (U/ml)

- Design points above predicted value
 - Design points below predicted value
- 8.2 123.6

X1 = A: pH
X2 = B: substrate

Actual Factors
C: sucrose = 0.4
D: yeast extract = 0.5



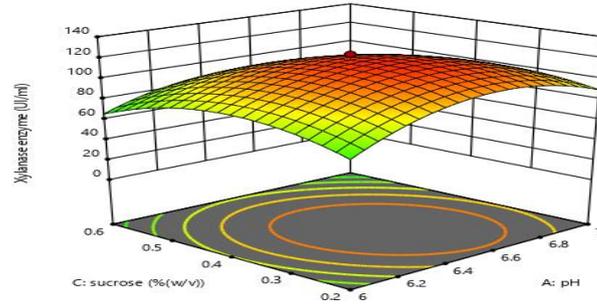
الشكل رقم (7): تأثير تركيز قرون نبات الغاف ورقم الحموضة pH على فعالية إنتاج إنزيم الكزلييناز

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Xylanase enzyme (UI/ml)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
8.2 123.6

X1 = A: pH
X2 = C: sucrose

Actual Factors
B: substrate = 4
D: yeast extract = 0.5



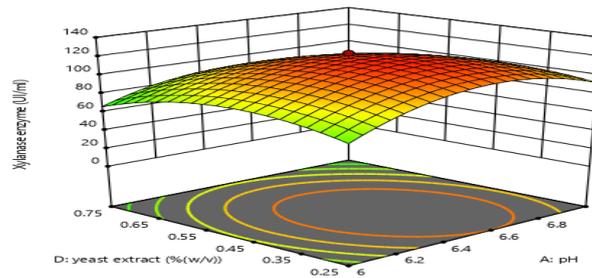
الشكل رقم(8): تأثير تركيز السكروز ورقم الحموضة pH على فعالية إنتاج إنزيم الكزيليناز

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Xylanase enzyme (UI/ml)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
8.2 123.6

X1 = A: pH
X2 = D: yeast extract

Actual Factors
B: substrate = 4
C: sucrose = 0.4



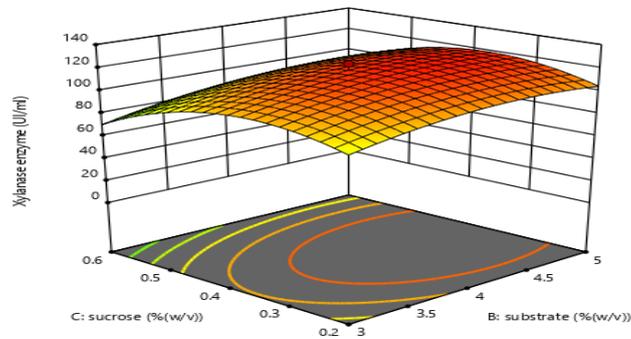
الشكل رقم(9): تأثير تركيز مستخلص الخميرة ورقم الحموضة pH على فعالية إنتاج إنزيم الكزيليناز

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Xylanase enzyme (UI/ml)
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
8.2 123.6

X1 = B: substrate
X2 = C: sucrose

Actual Factors
A: pH = 6.5
D: yeast extract = 0.5



الشكل رقم(10) : تأثير تركيز السكروز وتركيز قرون نبات الغاف على فعالية إنتاج إنزيم الكزيليناز

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Xylanase enzyme (UI/ml)

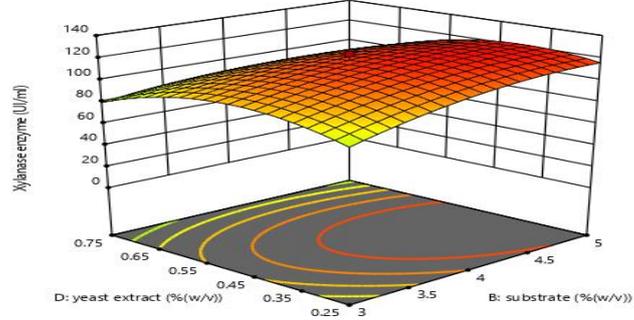
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

8.2 123.6

X1 = B: substrate
X2 = D: yeast extract

Actual Factors
A: pH = 6.5
C: sucrose = 0.4



الشكل رقم(11): تأثير تركيز مستخلص الخميرة وتركيز قرون نبات الغاف على فعالية إنتاج إنزيم الكزيليناز

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Xylanase enzyme (UI/ml)

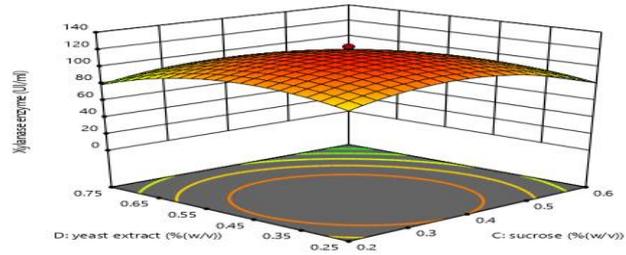
● Design points above predicted value

○ Design points below predicted value

8.2 123.6

X1 = C: sucrose
X2 = D: yeast extract

Actual Factors
A: pH = 6.5
B: substrate = 4



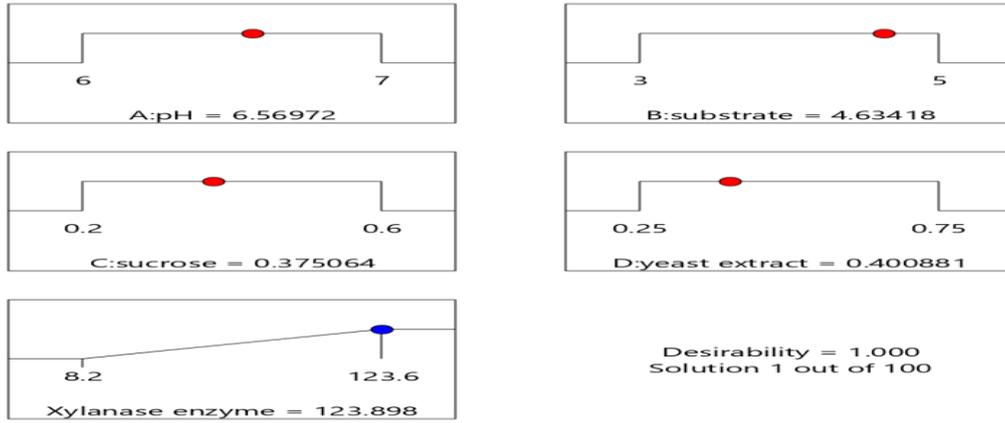
الشكل رقم(12): تأثير تركيز مستخلص الخميرة وتركيز السكروز على فعالية إنتاج إنزيم الكزيليناز

تحليل سطوح الاستجابة : Analysis of response surface

إن العلاقة بين المتغيرات المستقلة و المرتبطة موضحة في تمثيل ثلاثي الأبعاد لسطوح الاستجابة في الأشكال (7، 8، 9، 10، 11، 12) حيث يتبين بأن تأثير جميع العوامل المدروسة (رقم ال pH ، تركيز قرون نبات الغاف، تركيز السكروز، تركيز مستخلص الخميرة) على إنتاج الكزيليناز من الدرجة الثانية.

3-8 تجارب الموثوقية:

إن القيم التجريبية كانت مقبولة وقريبة من القيم المتوقعة مما يعزز صلاحية وكفاية النموذج كما ذكر سابقاً، وقد أظهرت نتائج الدراسة شروط الإنتاج المثالية لإنزيم الكزيليناز، كما هي موضحة في الشكل(13).



الشكل رقم(12): الشروط المثلى المحددة من قبل البرنامج لإنتاج إنزيم الكزيليناز

4- الاستنتاجات والتوصيات:

- 1- تم عزل وتحديد هوية النوع الفطري وتعريفه وهو *Trichoderma viride*.
- 2- تم الكشف عن قابلية الفطر لإنتاج الكزيليناز باستخدام قرون نبات الغاف كوسط غذائي.
- 3- تم تحديد رقم الحموضة pH المثالي لإنتاج الكزيليناز وهو 6.5.
- 4- تمت دراسة تأثير تركيز قرون نبات الغاف على فعالية إنتاج الكزيليناز وقد حقق التركيز 4% أعلى فعالية إنزيمية. إضافة إلى أن السكروز هو أفضل مصدر للكربون في وسط التخمير، ومستخلص الخميرة هو أفضل مصدر للنيتروجين في وسط التخمير.
- 5- أظهر الارتباط المرتفع للنموذج (response surface methodology (RSM) أن نموذج كثير الحدود من الدرجة الثانية ناجح في تحديد أفضل شروط إنتاج إنزيم الكزيليناز من الفطر *Trichoderma viride*، من حيث رقم الحموضة pH، وتركيز قرون نبات الغاف، وتركيز السكروز، وتركيز مستخلص الخميرة حيث يمكن استخدام سطوح الاستجابة في العديد من التطبيقات الكيميائية و بفعالية كبيرة. حيث إن شروط الإنتاج المثالية لإنزيم الكزيليناز هي رقم الحموضة pH يساوي 6.5، وتركيز قرون نبات الغاف 4.6%، وتركيز السكروز 0.3%، وتركيز مستخلص الخميرة 0.4%.
- 6- يوصى بإجراء دراسات مستقبلية متعلقة بدراسة الشروط المثلى لإنتاج إنزيم الكزيليناز من أحياء الدقيقة أخرى (جراثيم وفطريات)، ومن أهم هذه العوامل تركيز المعلق البوغي، ونوع الوسط الغذائي، ودرجة الحرارة، وزمن التخمير.

5- المراجع:

- 1- Ahmed, S., Imdad, S.S., and Jamel, A., (2012). COMparative study for the kinetics of extracellular xylanase from *Trichoderma harzianum* and its *Chaetomium thermophilum*. Electron journal Biotechnol, 15(3):1-8.
- 2- Anwar, Z., Gulfranz, M., and Irashad, M., (2014). Agro industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio- energy. A brief review. J. Rad. Appl, 7 (2): 163–173.
- 3- Battan, B., Sharma, J. K., and Dhiman, S. S., (2006). High level xylanase production by alkalophilic *B. pumilus* ASH under solid state fermentation. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22:1281-1287.
- 4- Buthelezi, S.P., Olaniran, A.O., Pillaay, B., (2011). Sawdust and digestive bran as cheap alternative substrates for xylanase production. African journal microbial, 5(7):742-752.

- 5- Carmona, E. C., Fialho, M. B., and Buchgnani, E. B., (2005). Production, purification & characterization of a minor form of xylanase from *A. versicolor*. Process- Biochemistry, 40: 359-364.
- 6- Collins, T., Gerday, C., and Feller, G., (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiology Reviews, 29(1):3-23.
- 7- Fortkamp, D&Knob, A., (2014). High xylanase production by *Trichoderma viride* using pineapple peel as substrate and its application in pulp biobleaching. African journal of biotechnology, 13(22):2248-2259.
- 8- Gautam, S.P., Bundela, P.S., Pandey, A.K., Khan, J., Awasthi, M.K., and Sarsaiya, S., (2011). Optimization for the production of cellulase enzyme from municipal solid waste residue by two novel cellulolytic fungi. Biotechnol Res Int, 2011:1-8. doi:10.4061/2011/810425.
- 9- Goyal, M., Kalra, K. L., and Sareen, V. K., (2008). Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *T. viride*. Brazilian Journal of Microbiology, 39: 535-541.
- 10- Hoda, M.S., Abdel-dayem, A.S., and Arafatbel, T., (2012). Production of xylanase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* using some agriculture residues. International journal of Agriculture Research, 7(1):746-757.
- 11- Holker, U., & Jurgen, A., (2005). Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages. Current Opinion in Microbiology, 8:301-306.
- 12- Irfan, M., Nadeem, M., and Syed, Q., (2014). One-factor-at-a-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 7:317-326.
- 13- Jampala, P., Tadikamalla, S., Preethi, M., Ramanujam, S., and Uppuluri, K.B., (2017). Concurrent production of cellulose and exylanase from *Trichoderma reesei* NCIM 1186:enhancement of production by desirability-based multi-objective method. Biotech, 3:7-14.
- 14- Jun, H., Kieselbach, T., and Jonsson, L.J., (2011) Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. Microbial Cell Factorm 10(1):1-10.
- 15- Juturu, V& Wu, J.C., (2012). Microbial xylanases:Engineering ,production and industrial applications. Biotechnol Adv, 30:1219-1227.
- 16- Kachlishvili, E., Penninckx, M.J., Tsiklauri, N., and Elisashvili, V., (2006). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. World Journal Microbiol Biotechnol, 22(4):391–397.
- 17- Kanaga, K., Pandey, A., and Kumar, S., (2016). Multi-objective optimization of media nutrients for enhanced production of algae biomass and fatty acid biosynthesis from *Chlorella pyrenoidosa* NCIM 2738. Bioresour Technol, 200:940–950.
- 18- Kapich, A., Prior, B., Botha, A., Galkin, S., Lundell, T., and Hatakka, A., (2004). Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. Enzyme Microb Technol, 34(2):187–195.
- 19- Latif, F., Asgher, M., Saleem, R., Akram, A., and Legge, R., (2006). Purification and characterization of xylanase produced by *C. thermophile* NIBGE. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 22:45-50.
- 20- Lo, C-M., Zhang, Q., Callow, N.V., and Ju, L-K., (2010). Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction. Bioresour Technol, 101(2):717–723.

- 21- Longo, M.A., & Sanromán, M.N., (2006). Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol Biotechnol*, 44:335–353.
- 22- Manivannan, A., & Narendhirakannan, R., (2014). Response surface optimization for co-production of cellulase and xylanase enzymes by *Trichoderma reesei* NRRL–3652. *Int. J. ChemTech Res*, 6(7):3883.
- 23- Millar, G.L., (1959). use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31:426-428.
- 24- Nathan, V.K., Rani, M.E., Rathinasamy, G., and Dhiraviam, K.N., (2017). Low molecular weight xylanase from *Trichoderma viride* VKF3 for Bio-bleaching of newspaper pulp. *Bio Resources*, 12(3):5264-5278.
- 25- Pandey, A., (2003). Solid-state fermentation. *BioChemical Engineering Journal*, 13: 81-84.
- 26- Pirola, R.D.P.B.; Delabona, P.S., Farinas, C.S., (2014). Simplification of the biomass to ethanol conversion process by using the whole medium of filamentous fungi cultivated under solid-state fermentation. *Bioenergy Res*, 7:744-752.
- 27- Ramasamy, S., Balakrishna, H.S., Selvaraj, U., and Uppuluri, K.B., (2014). Production and statistical optimization of oxytetracycline from *Streptomyces rimosus* NCIM 2213 using a new cellulosic substrate, *Prosopis juliflora*. *BioResources*, 9(4):7209–7221.
- 28- Srikanth, R., Siddartha, G., Reddy, C.H.S., Harish, B., Ramaiah, M.J., and Uppuluri, K.B., (2015). Antioxidant and anti-inflammatory levan produced from *Acetobacter xylinum* NCIM2526 and its statistical optimization. *Carbohydr Polym*, 123:8–16.
- 29- Sun, X., Zhang, R., and Zhang, Y., (2004). Production of lignocellulolytic enzymes by *Trametes gallica* and detection of polysaccharide hydrolase and laccase activities in polyacrylamide gels. *J. Basic Microbiol*, 44(3):220–231.
- 30- Taibi, Z., Saoudi, B., Boudelaa, M., Trigui, H., Belghith, H., Gargouri, A., and Ladjama, A., (2012). Purification and biochemical characterization of a highly thermostable xylanase from *Actinomadura* sp. Strain Cpt20 isolated from poultry compost. *Appl Biochem Biotechnol*, 166(3):663–679.
- 31- Venkatesh, M., & Girija, D., (2009). Microbial pectinase from tropical fruit Wastes. *Journal of Tropical Agriculture*, 47(1):67-69.
- 32- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., and Prakash, J., (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *Biotech*, 7(11):1-12.
- 33- Walter, M., Jaklitsc, G.J., Sarah, L.M., and Bing, S.L., (2006). *Hypocrearufa/Trichoderma viride*: a reassessment and description of five closely related species with and without warted conidia. *Stud Mycol USA*, 56(1):135-177.
- 34- Zhang, L., Wang, X., Ruan, Z., Liu, Y., Niu, X., Yue, Z., Li, Z., Liao, W., and Liu, Y., (2014). Fungal cellulase/xylanase production and corresponding hydrolysis using pretreated corn stover as substrates. *Appl Biochem Biotechnol*, 172(2):1045–1054.