Finding the optimal conditions for the production of cellulase enzyme from the fungus *Trichoderma viride*

Dr. Samaher sakkour*
Dr. Noura Jamal**

(Received 20 / 6 / 2024. Accepted 12 / 11 /2024)

□ ABSTRACT □

This research was conducted at Tishreen University during the period 2023-2024, and aimed to determine the optimal conditions for producing the cellulase enzyme from the fungus *Trichoderma viride* in terms of pH, nutrient media concentration, incubation temperature and time using the response surface technology, by taking advantage of the pods of the Ghaf plant. As a food medium, cellulase enzyme can be used in many industrial applications.

A central composite design was used to verify the effect of four independent variables: pH, concentration of ghaf pods (%), incubation temperature and time on the response factor, which is the effectiveness of cellulase enzyme production. The independent variables were tested at three levels based on the results of the preliminary experiments. Response outcomes were predicted using a second-order polynomial model.

According to this study, the optimal conditions for the production of cellulase by *Trichoderma viride* were determined, where the pH was = 6, while the concentration of pods was 5.2%, the incubation temperature = 35 °C, and its time = 142 hours, where the expected theoretical values reached (54.8 U.ml). -1), and when these conditions were applied, the enzymatic activity of cellulase reached 53.9 U.ml-1. The convergence of the experimental results with the theoretical values indicated the suitability of the model and the possibility of using the response surface methodology in determining the optimal conditions for enzyme production.

Keywords: *Trichoderma viride*, cellulase enzyme, conditions for cellulase production.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Work supervisor, Faculty of Agricultural Engineering, Tichreen University, Lattakia, SYRIA.(samahersakkour@outlook.sa)**

** **Work supervisor, Faculty of Agricultural Engineering, Tichreen University, Lattakia, SYRIA. noura.jamal@tishreen.edu.sy)**

إيجاد الشروط المثلى لإنتاج إنزيم السيللولاز من الفطر *Trichoderma viride*

د. سماهر صقور*

د. نورا جمل**

(تاريخ الإيداع 20 / 6 / 2024. قبل للنشر في 12 / 11 / 2024)

ملخّص

تمَّ إجراء هذا البحث في جامعة تشرين خلال الفترة 2023–2024م، وهدف إلى تحديد الشروط المثلى لإنتاج إنزيم السيللولاز من الفطر *Trichoderma viride* من حيث رقم ال pH، تركيز الوسط الغذائي، درجة حرارة التحضين وزمنه باستخدام تقنية سطح الاستجابة، وذلك بالاستفادة من قرون نبات الغاف كوسط غذائي، حيث يمكن استخدام إنزيم السيللولاز في العديد من التطبيقات الصناعية.

تمَّ استخدام التصميم المركب المركزي للتحقق من تأثير أربعة متغيرات مستقلة هي رقم ال pH، تركيز قرون نبات الغاف(%)، درجة حرارة التحضين وزمنه في عامل الاستجابة وهو فعالية إنتاج إنزيم السيللولاز، حيث اختبرت المتغيرات المستقلة على ثلاث مستويات بناءً على نتائج التجارب الأولية. تمَّ توقع نتائج الاستجابة من خلال استخدام نموذج كثير الحدود من الدرجة الثانية.

ووفقاً لهذه الدراسة حددت الشروط المثلى لإنتاج السيللولاز من قبل *Trichoderma viride* حيث بلغ رقم ال pH=6، بينما تركيز قرون نبات الغاف 5.2%، ودرجة حرارة التحضين= 35م°، ، وزمنه=142 ساعة، حيث بلغت القيم النظرية المتوقعة (54.8 $ml.U^{-1}$)، وعند تطبيق هذه الشروط بلغت الفعالية الإنزيمية للسيللولاز 53.9 $ml.U^{-1}$، أشار تقارب النتائج التجريبية مع القيم النظرية على ملاءمة النموذج وإمكانية استخدام منهجية سطح الاستجابة في تحديد الشروط المثلى لإنتاج الإنزيم.

الكلمات المفتاحية : *Trichoderma viride* ، إنزيم السيللولاز، شروط إنتاج السيللولاز.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين– سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY–NC–SA 04

*مشرف على الأعمال ، كلية الهندسة الزراعية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية .(samahersakkour@outlook.sa).

**مشرف على الأعمال، كلية الهندسة الزراعية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية noura.jamal@tishreen.edu.sy .

مقدمة:

إن استخدام الكائنات الحية الدقيقة في إنتاج الإنزيمات يعتبر ذي فائدة اقتصادية ولا سيما مع ارتفاع معدل استخدام الإنزيمات في الصناعات الغذائية، صناعة الورق، الوقود الحيوي وغيرها، فقد تمثلت المراحل الأولى لإنتاج الإنزيمات باستخلاص الإنزيمات من النباتات، إلا أن الكميات المنتجة بهذه الطريقة لم تعد تلبي احتياجات السوق العالمي من الإنزيمات هذا من جهة، ومن جهة أخرى يعتبر استخدام الاحياء الدقيقة في العملية الإنتاجية المتعلقة بالإنزيمات أكثر جدوى اقتصادياً؛ وذلك نظراً لارتفاع معدل النمو لدى الأحياء الدقيقة إضافة إلى إمكانية التحكم بظروف عملية الإنتاج بهدف تحديد الشروط المثلى لإنتاج الإنزيم وفق ما أورد Kirk وزملاؤه (2002).

أشار Naik وآخرون (2010) بأنّ السيللوز هو البوليمر العضوي الأكثر شيوعاً، حيث يمثل 1.5×10^{12} طن من إجمالي الكتلة الحيوية الناتجة عن عملية التركيب الضوئي وخاصة في المناطق الاستوائية، لذلك فإن السيللوز يعتبر المصدر الأكثر وفرة وهو مصدر متجدد ، كما أكدّ Chandel وزملاؤه (2007) بأن الاستفادة من السيللوز في التخمرات الصناعية تتطلب إجراء حلمأة إما من خلال استخدام الأحماض إلا أن هذا ينعكس سلباً على البادئ (الميكروب المستخدم في التخمر) نتيجة تراكم هيدروكسي متيل الفورفورال الناتج عن عملية التحلل المائي إضافة إلى الفينولات حيث أن هذه المركبات وبالاعتماد على تركيزها في وسائل التخمير يمكن أن تمنع الخلية الميكروبية من النمو كما يمكن أن تؤثر في معدل النمو والكتلة الحيوية للخلية الميكروبية، لذلك يفضل إجراء حلمأة إنزيمية للسيللوز باستخدام إنزيم السيللولاز.

أشارت العديد من الدراسات (Ghazanfar وزملاؤه، 2019؛ Singh وزملاؤه، 2019؛ Penttila وزملاؤه، 2004) أنّ الأحياء الدقيقة تنتج العديد من الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية النباتية (Singh *et al.*,2019)، وأهمها الإنزيمات المحللة للسيللوز (السيللولاز Cellulases)، ويعتبر جنس *Trichoderma* من أهم الأجناس الفطرية لإنزيم السيللولاز، حيث يمتاز السيللولاز المنتج من قبل *Trichoderma* بمقاومته للمثبطات الكيميائية، إضافة إلى ثباتيته في المخمر عند درجة حرارة 50 م° وعند قيمة 4.8 لرقم ال pH لمدة 48 ساعة، وغالباً ما يتم إنتاج السيللولاز بشكل مترافق مع الكزيليناز من قبل الأنواع التابعة لهذا الجنس وفق ما أورد Pandey وزملاؤه (2014).

كما أشار Ghazanfar وزملاؤه (2019) أنّ الاتجاه الحالي لإنتاج السيللولاز يعتمد على استخدام ركائز سيللوزية مثل تفل قصب السكر، قشر الأرز، نخالة القمح، مخلفات إنتاج الشاي وذلك بهدف خفض تكلفة إنتاج الإنزيم، حيث أنّ النفايات والمخلفات الناتجة من الزراعة والصناعات المختلفة والتي تتراكم بمعدل مرتفع ذات محتوى عالي من الكربوهيدرات والمواد المغذية الأخرى يمكن الاستفادة منها كوسط غذائي لإنتاج المواد الكيميائية والإنزيمات عن طريق التخمرات وفق ما أورد Kanakaraju1 وزملاؤه (2020) ففي هذه الدراسة تمّ اعتماد قرون شجيرة الغاف (*Prosopis juliflora*) كركيزة لإنتاج السيللولاز،أشار Gupta وزملاؤه (2009) بأن نبات الغاف هو شجيرة دائمة الخضرة شائكة ينمو في المناطق شبه القاحلة فهو نبات مقاوم للجفاف.

كما أكد Pradeep وزملاؤه (2012) أن إنتاج الغلوكوز من السيللوز باستخدام الميكروبات المختلفة (البكتيريا، فطريات العفن، الخمائر) يعتبر بمثابة إعادة تدوير للسيللوز وهذا يعتبر ذي تأثير إيجابي في البيئة.

تتعدد العوامل التي تؤثر في إنتاج إنزيم السيللولاز من قبل الأنواع التابعة لجنس *Trichoderma*، مثل درجة حرارة التحضين، تركيز الركيزة، مدة التخمير، نوع كل من مصدر الكربون والنيتروجين وتركيزه، نوع السيللوز وفق ما أورد Immanuel وزملاؤه (2006).

أشار دراسات (Bannari وزملاؤه، 2012؛ Ijaz وزملاؤه، 2011) أنّ تحسين معلمات التخمير هو مشكلة هامة في التنمية الاقتصادية للعمليات الحيوية، إن منهجية السطح التابعي (Response Surface Methodology) (RSM) يتكون من مجموعة من التقنيات التجريبية موجهة لتقييم العلاقات القائمة بين مجموعة من المعلمات التجريبية التي يتم دراستها إضافة إلى الاستجابات المقاسة وفقًا لواحد أو أكثر من المعايير التي يتم اعتمادها، أي من خلال منهجية السطح التابعي يمكن تحديد قيم لكل عامل من العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيم السيللولاز بغرض الحصول على أعلى قيمة لعامل الاستجابة المتمثل في الفعالية الإنزيمية لإنزيم السيللولاز.

فقد هدف هذا البحث إلى إنتاج السيللولاز من قبل *Trichoderma viride* باستخدامRSM، فقد تمّ تصميم التجارب من خلال استخدام التصميم المركب المركزي(CCD) (Central Composite Design) باستخدام أربعة متغيرات مستقلة مع ثلاثة مستويات لكل منها.

طرائق البحث ومواده:

1-**عزل فطر عفن *Trichoderma viride***: تمّ تحضير معلق من التربة بتركيز 10^{-1} ، تم إخضاع معلق التربة للتحريك بسرعة دوران (200 rpm) لمدة 30 دقيقة، أخذ الراشح الطافي لمعلق التربة والذي يعتبر بمثابة المحلول الأساسي، حضر منه سلسلة تخفيفات تتراوح (10^{-1}، 10^{-5})، أخذ من كل تخفيف 10 ميكروليتر تمت زراعته على سطح المستنبت الغذائي (PDA) تمّ التحضين عند 25°م لمدة أسبوع وفق ما أورد Sharfuddin وMohanka (2012)، تمّ تحديد النوع الفطري من خلال دراسة الخصائص المزرعية للمستعمرات الفطرية خلال فترة التحضين والتي استمرت سبعة أيام، وأهم الخصائص المدروسة لون المستعمرات الفطرية وشكلها والصبغات المنتجة من قبل المستعمرات، وشكل الزوائد القارورية وحجمها وأبعادها ونظام تفرعها phialides، وشكل الأبواغ الكونيدية وحجمها وأبعادها وفق ما ذكر Waksman (1927)، بعد تحديد جنس الفطر تم إعداد معلق بوغي بتركيز 10^4 بوغ/مل .

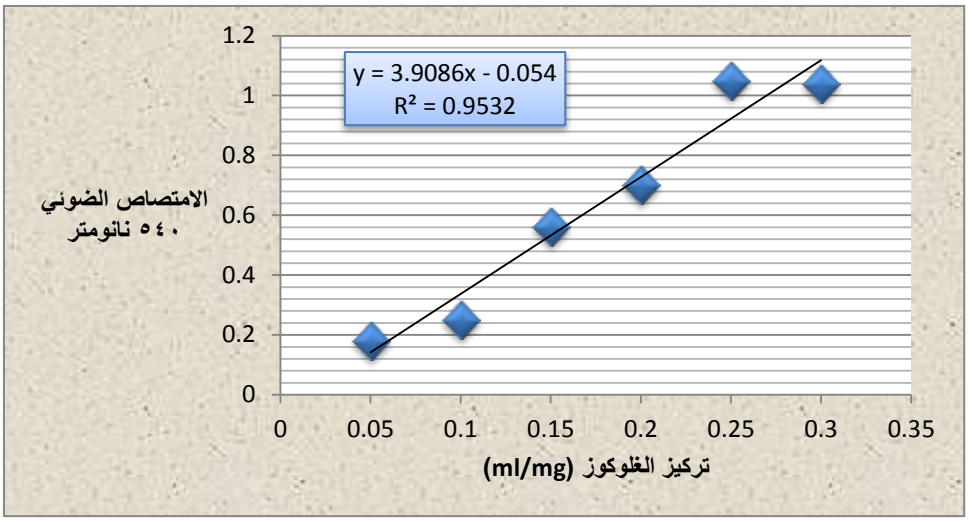
2-**الغربلة الأولية للعزلات الفطرية:** تمّ اختبار قدرة الفطر على إنتاج إنزيم السيللولاز باعتماد الطريقة الموصوفة من قبل Teatherو Wood (1982)، حيث تمت مراقبة ظهور الهالة الشفافة.

3-تحضير قرون الغاف: جمعت القرون من النباتات المزروعة في حديقة كلية الزراعة بجامعة تشرين، تمّ إخضاعها للتجفيف عند درجة حرارة 60م°، ثمّ تحويلها إلى مسحوق وفق ما أشار إليه Gupta وزملاؤه (2009).

4-إنتاج إنزيم السيللولاز: أضيف المعلق البوغي(2 مل) ذي التركيز(10^4 بوغ/مل) إلى 100 مل من محلول معقم من قرون نبات الغاف (3%)، و(0.4%) من كربونات الكالسيوم وضبط رقم ال pH عند6.5، تمّ التحضين في حاضنة هزازة بسرعة دوران(150 دورة/دقيقة) ولمدة ستة أيام عند درجة حرارة (30 م°)، ثمّ أجريت عملية ترشيح، وأخذ الراشح لإجراء عملية طرد مركزي بسرعة (10000دروة)(rpm) لمدة(10 دقائق) وفق ما أوردZahra وزملاؤه (2020).

5-قياس فعالية السيللولاز: تم اتباع الطرقة الموصوفة من قبل Irfan وزملاؤه (2011)، فقد حضرت سلسلة عيارية من سكر الغلوكوز، وتمّ التعبير عن فعالية إنزيم السيللولاز بوحدة الإنزيم (Unit) والتي تعبر عن كمية الإنزيم اللازمة

لإنتاج ميكرومول واحد من سكر الغلوكوز لكل مليليتر خلال دقيقة واحدة ضمن الشروط المثلى لعمل الإنزيم.



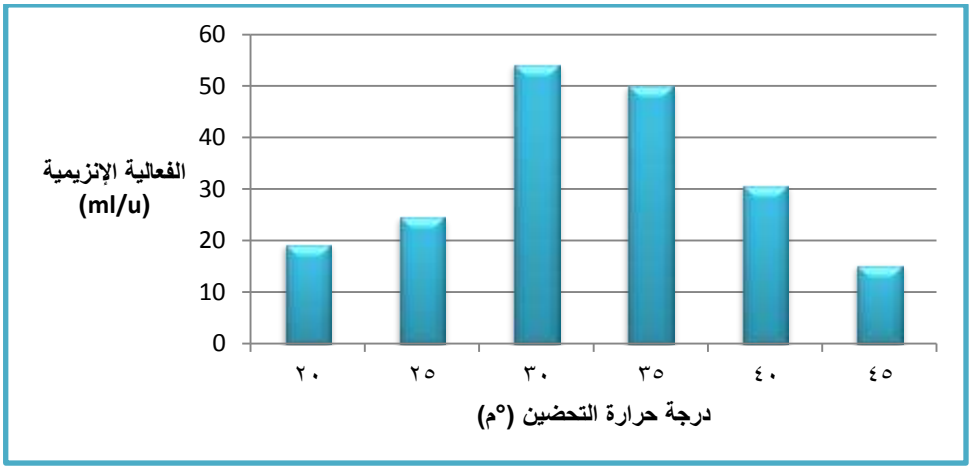
الشكل(1): المنحنى القياسي لسكر الغلوكوز.

6- تصميم التجربة لتحديد الشروط المثلى لإنتاج السيللولاز: استخدم التصميم المركب المركزي(CCD) (Central Composite Design) لتحديد الشروط المثلى لإنتاج السيللولاز، وذلك باعتماد المتغيرات التالية: درجة الحرارة(A) ضمن المجال (20، 45°م)، ورقم ال pH (B) ضمن المجال المجال (5، 8.5)، وتركيز قرون نبات الغاف (C) (1، 6%)، وزمن التحضين (D) (24، 192ساعة)، بينما عامل الاستجابة فهو فعالية إنزيم السيللولاز (ml^{-1}.U) وفق ما أورد Zahra وزملاؤه (2020).

النتائج والمناقشة:

تعريف النوع الفطري: ظهرت المستعمرات شفافة خلال الأيام الأولى من التحضين، ثمَ تغير لونها إلى الأخضر الداكن، فقد ظهرت الحوامل الكونيدية بلون أخضر وهي ذات شكل مخروطي وهذا يكون متركز في مركز المستعمرة ومن ثم يمتد إلى باقي أنحاء الطبق البتري، لون السطح السفلي للمستعمرة أبيض مخضر أما السطح العلوي فكان بلون أخضر فاتح، الحوامل الكونيدية قصيرة ورفيعة وتكون متفرعة بشكل هرمي، كما أن التفرعات القريبة من قمة الحامل الكونيدي كانت قصيرة في حين تكون التفرعات كانت أكثر طولاً في الجزء السفلي منه، وفي نهايته يتشكل 2-4 فياليدات تأخذ شكل قارورة، بدأ التبوغ في اليوم الرابع من التحضين بشكل خفيف وازداد في اليوم السادس، وقد اتخذ التبوغ شكل دوائر متداخلة ومتحدة المركز، أما الأبواغ الكونيدية فكانت كروية الشكل خضراء اللون ذات جدار خشن بقطر 3.6-4.5 µm، بلغت درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر 25 م° ، وقد ترافق تشكل مستعمرات هذا النوع بانتشار رائحة جوز الهند امن هذه المستعمرات وبناء على المراجع التصنيفية تمّ تحديد هوية الفطر (*Trichoderma viride*).

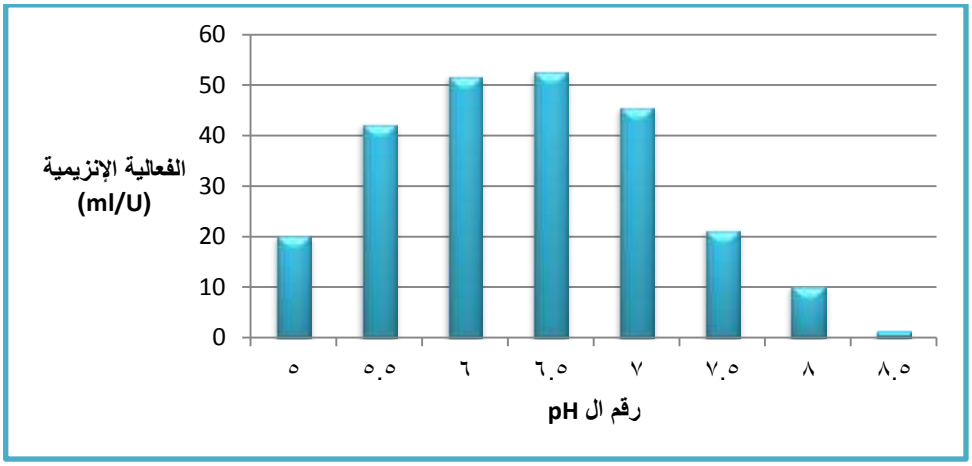
تأثير درجة حرارة التحضين في إنتاج إنزيم السيللولاز: تمت دراسة تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيم السيللولاز ضمن مجال حراري(20،45°م) وهذا موضح في الشكل (2).



الشكل(2): تأثير درجة حرارة التحضين في الفعالية الإنزيمية.

أظهرت الدراسة بأن درجة الحرارة 30م° هي المثلى لإنتاج السيللولاز بفعالية إنزيمية بلغت 54.3 $ml.U^{-1}$، لوحظ انخفاض الفعالية الإنزيمية مع ارتفاع درجة الحرارة بعد بلوغها حدها الأقصى، وتتقارب نتائج هذه الدراسة مع الدراسة المعدة من قبل Dias وزملاؤه (2018) فقد بلغت درجة حرارة التحضين المثلى لإنتاج السيللولاز 28م°.

تأثير رقم ال pH في إنتاج إنزيم السيللولاز: يبين الشكل (3) تأثير رقم ال pH في إنتاج إنزيم السيللولاز.

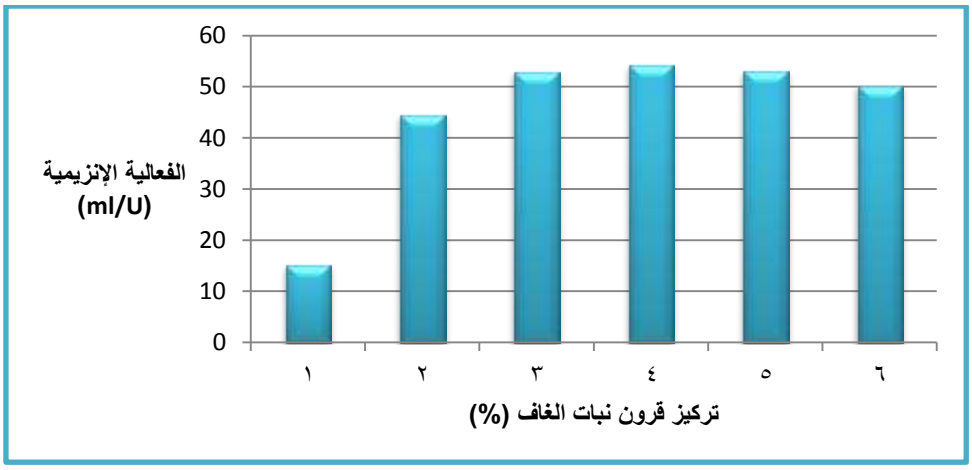


الشكل(3): تأثير درجة حرارة التحضين في الفعالية الإنزيمية.

تبين من خلال هذه الدراسة بأن رقم ال pH المثالي لإنتاج السيللولاز من قبل *Trichoderma viride* هو 6.5 بفعالية إنزيمية قدرها 52.6 $ml.U^{-1}$، وتعد درجة الحرارة ورقم ال pH من أهم العوامل التي تؤثر في عملية إفراز الإنزيم واصطناع البروتين الإنزيمي، كما أن رقم ال pH يؤثر بدرجة عالية في ثبات المنتجات المفرزة من قبل الميكروب في الوسط وفق ما أورد Tabao وزملاؤه (2010)، وتتقارب نتائج هذه الدراسة مع ما أورد Pandey وزملاؤه (2014) والذي حدد رقم ال pH المثالي لإنتاج السيللولاز 5.5، إلا أن نتائج هذه الدراسة تختلف مع الدراسة المعدة من قبل Shafique وزملاؤه (2009) والذي بين أن رقم ال pH المثالي لإنتاج السيللولاز من قبل سلالات تابعة للنوع *Trichoderma viride* هو 5.

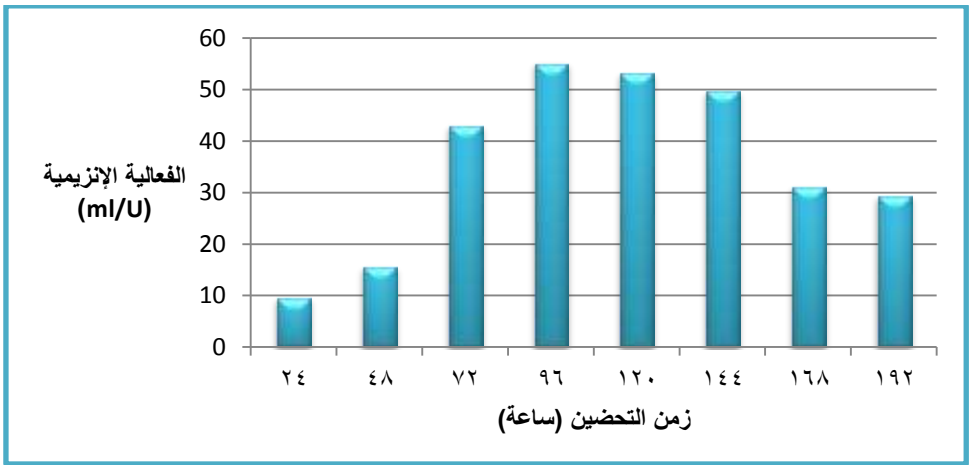
تأثير تركيز قرون نبات الغاف في إنتاج إنزيم السيللولاز: يبين الشكل (4) أنّ التركيز الأفضل لقرون نبات الغاف الذي حقق أعلى فعالية لإنتاج الإنزيم هو 4%، فقد حقق هذا التركيز فعالية إنتاجية قدرها 54.3 وحدة إنزيمية/مل،

ولوحظ انخفاض في إنتاج السيللولاز عند التراكيز المنخفضة من قرون نبات الغاف إلا أن الإنتاج يزداد بازدياد تركيز القرون.



الشكل(4): تأثير تركيز قرون نبات الغاف في الفعالية الإنزيمية.

تأثير زمن التحضين في إنتاج إنزيم السيللولاز: إن زمن التحضين له تأثير في الفعالية الإنزيمية لإنزيم السيللولاز المنتج من قبل *Trichoderma viride* وهذا مبين في الشكل (5).



الشكل(5): تأثير زمن التحضين في الفعالية الإنزيمية.

تبين النتائج أن إنتاج الإنزيم قد بدأ بعد مرور 24 ساعة على التحضين، ازداد النشاط الإنزيمي بزيادة مدة التحضين حيث بلغ حده الأقصى بالنسبة بعد مرور 96 ساعة بفعالية قدرها 55.2 $ml.U^{-1}$، إلا أن زيادة مدة التخمير أدت إلى انخفاض في فعالية السيللولاز، وهذا مرتبط بانخفاض نسبة الرطوبة في وسط التخمير وتغيرات قيمة رقم ال pH للوسط أثناء عملية التخمير وفق ما أورد Melo وزملاؤه (2007)، حيث يعتبر زمن التحضين من أهم العوامل التي تؤثر في الوظائف الفيزيولوجية للفطريات وعلى وجه الخصوص عملية إنتاج الإنزيمات، حيث تختلف نتائج هذه الدراسة مع الدراسة المعدة من قبل Ijaz1 وآخرون (2011) حيث حققت مدة التحضين 72 ساعة أعلى فعالية لإنزيم السيللولاز والتي بلغت 15.06 $ml.\mu g^{-1}$.

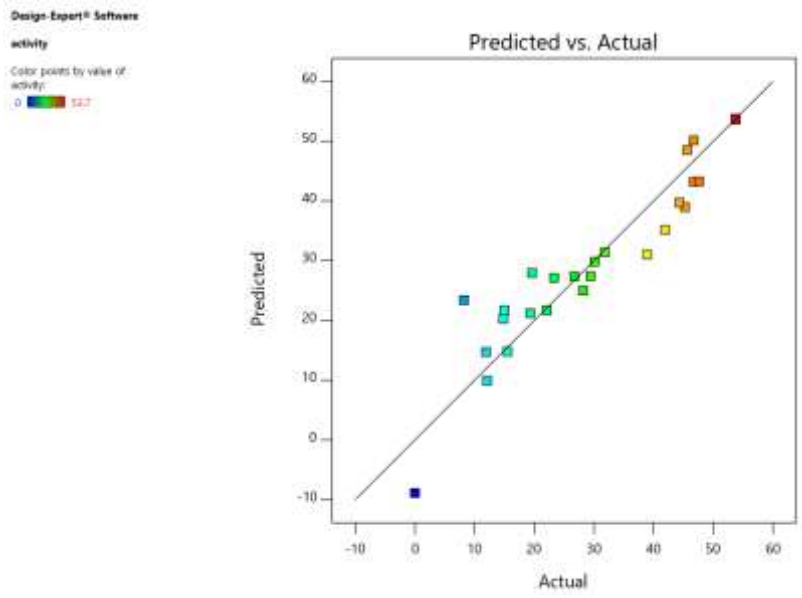
تحديد الشروط المثلى لإنتاج السيللولاز من *Trichoderma viride* باستخدام (RSM)

تمَّت معالجة النتائج المتحصل عليها باستخدام Design Expert ver. 11. (Stat Ease, USA) وهذا موضح في الجدول (1).

الجدول(1): نتائج CCD للفعالية الفعلية والفعالية المتوقعة للسيللولاز المنتج من قبل *Trichoderma viride*.

رقم التجربة	العامل(1)	العامل(2)	العامل(3)	العامل(4)	العامل المدروس	
	درجة الحرارة	رقم الpH	تركيز قرون نبات الغاف	زمن التحضين	الفعالية الإنزيمية	
	م°		%	ساعة	U/ml	
					القيمة الفعلية	القيمة المتوقعة
1	30	7.5	6	144	15.5	14.79
2	30	5.5	3	144	46.7	43.21
3	40	7.5	6	96	22.1	21.68
4	35	6.5	4.5	72	45.6	48.50
5	35	6.5	4.5	120	53.7	53.70
6	35	6.5	4.5	168	46.7	50.13
7	35	6.5	4.5	120	53.7	53.70
8	40	7.5	3	96	19.3	21.21
9	30	7.5	3	144	14.8	20.27
10	35	6.5	1.5	120	29.4	27.40
11	25	6.5	4.5	120	31.8	31.42
12	35	4.5	4.5	120	8.2	23.40
13	35	8.5	4.5	120	0	0
14	40	7.5	3	144	11.9	14.73
15	30	7.5	6	96	23.3	27.13
16	30	5.5	6	144	47.6	43.28
17	30	5.5	3	96	30.1	29.84
18	35	6.5	4.5	120	53.7	53.70
19	40	5.5	3	96	28.2	24.99
20	40	7.5	6	144	12.1	9.94
21	40	5.5	6	96	38.9	31.01
22	35	6.5	4.5	120	53.7	53.70
23	30	7.5	3	96	26.7	27.36
24	35	6.5	7.5	120	19.6	27.93
25	40	5.5	6	144	44.3	39.73
26	45	6.5	4.5	120	15	21.72
27	35	6.5	4.5	120	53.7	53.70
28	30	5.5	6	96	41.9	35.16
29	35	6.5	4.5	120	53.7	53.70
30	40	5.5	3	144	45.2	38.96

كما يبين الشكل (2) القيم المتوقعة للفعالية الإنزيمية للسيللولاز إضافة إلى القيم الفعلية التجريبية لفعالية السيللولاز، حيث تبين تقارب بين هاتين القيميتين وهذا يشير إلى ملاءمة النموذج المستخدم للتجربة المنجزة.



الشكل(6): القيم المتوقعة والقيم الفعلية لفعالية السيللولاز.

كما أظهر الجدول (2) أن هذا النموذج من الدرجة الثانية وهو ممثل للعوامل المدروسة بشكل كاف. يبين هذا الجدول تأثير العوامل المدروسة وفق مايلي:

- **تأثير العامل بشكل مستقل في الفعالية الإنزيمية للسيللولاز Linear effect:** وهي تتضمن أربعة عوامل (درجة الحرارة، رقم ال pH، تركيز قرون نبات الغاف، زمن التحضين) فقد لوحظ بأن قيمة p لكل من درجة الحرارة ورقم ال pH أقل من 0.05 أي أن هناك تأثيراً خطياً معنوياً لكل من درجة الحرارة ورقم ال pH في الفعالية الإنزيمية للسيللولاز، في حين أن قيمة p لكل تركيز قرون نبات الغاف وزمن التحضين أكبر من 0.05 أي أن التأثير الخطي لهذين العاملين غير معنوي.
- **تأثير العوامل المتداخلة في الفعالية الإنزيمية للسيللولاز Interaction effect:** وهي تتضمن ستة عوامل (التأثير المتداخل لدرجة الحرارة ورقم ال pH، التأثير المتداخل لدرجة الحرارة وتركيز قرون نبات الغاف، التأثير المتداخل لدرجة الحرارة وزمن التحضين، التأثير المتداخل لرقم ال pH وتركيز قرون نبات الغاف، التأثير المتداخل لرقم ال pH وزمن التحضين، التأثير المتداخل لتركيز قرون نبات الغاف وزمن التحضين)، حيث إن قيمة p لكل من العوامل السابقة أقل من 0.05 وهذا يدل على أن العوامل المدروسة المتداخلة لها تأثير معنوي في الفعالية الإنزيمية للسيللولاز.
- **تأثير العوامل المربعة في الفعالية الإنزيمية للسيللولاز Squares effect:** وهي تتضمن أربعة عوامل مربعة وهي (درجة الحرارة^2، رقم ال pH^2، تركيز قرون نبات الغاف^2، زمن التحضين^2) وجد أن قيمة p لكل منها أقل من 0.05 وهذا يشير إلى أن العوامل المربعة تؤثر معنوياً في الفعالية الإنزيمية للسيللولاز.

تمَّ تحديد أهمية كل معامل من خلال قيمة F، لوحظ أن رقم ال pH كان له الأثر الأكبر في إنتاج إنزيم السيللولاز.

الجدول(2): تحليل التباين لإنزيم السيللولاز المنتج من قبل *Trichoderma viride* .

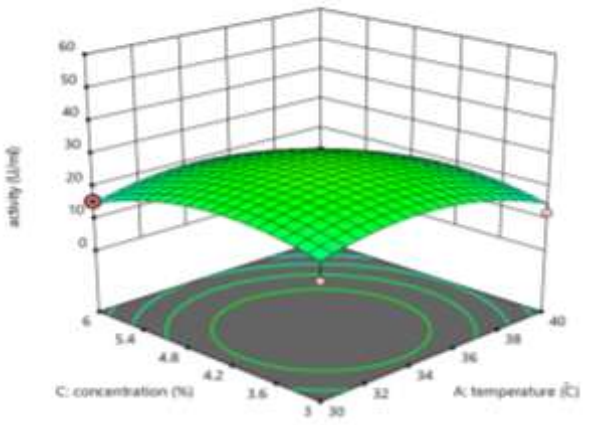
p-value	F-value	Mean Square	df	Sum of Squares	Source	
< 0.0001	10.73	514.45	14	7202.31	النموذج Model	
0.01068	2.94	141.14	1	141.14	درجة الحرارة A	الخطي
< 0.0001	32.56	1561.71	1	1561.71	رقم ال pH B	
0. 9261	0.0089	0.4267	1	0.4267	تركيز الغاف C	
0.07767	0.0834	4.00	1	4.00	زمن التحضين D	
0.008536	0.0352	1.69	1	1.69	AB	المشترك التفاعلي
0.009208	0.0102	0.4900	1	0.4900	AC	
0.009321	0.0075	0.3600	1	0.3600	AD	
0.004354	0.6422	30.80	1	30.80	BC	
0.0099	8.72	418.20	1	418.20	BD	
0.04602	0.5747	27.56	1	27.56	CD	
0.0001	26.31	1262.09	1	1262.09	A^2	التربيعي
< 0.0001	77.06	3696.09	1	3696.09	B^2	
0.0002	24.22	1161.83	1	1161.83	C^2	
0.04203	0.6867	32.94	1	32.94	D^2	

تم تقييم كفاءة النموذج بوساطة معامل تحديد R^2 وهذا مبين في الجدول (3)، يشير معامل التحديد إلى النسبة المئوية لتباين الاستجابة الذي ينسب إلى النموذج وليس إلى التأثيرات العشوائية. أي تشير قيمته إلى أن العوامل الأربعة المدروسة (درجة الحرارة، رقم ال pH، تركيز قرون نبات الغاف، زمن التحضين) مسؤولة عن 90.92% من مقدار التغير في الفعالية الإنزيمية للسيللولاز، في حين أن القيمة المتبقية 9.9% والتي تمثل التغير في عامل الاستجابة أي الفعالية الإنزيمية للسيللولاز الذي لا يمكن تفسيره من خلال هذا النموذج أي العوامل المدروسة.

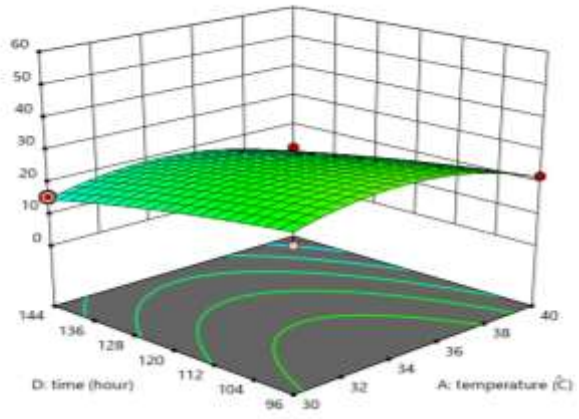
الجدول(3): تحليل التباين ANOVA لثوابت الانحدار في نموذج كثير حدود من الدرجة الثانية .

ثوابت معاملات الانحدار	فعالية إنزيم السيللولاز
المتوسط ± الانحراف المعياري	32.90±6.93
معامل التحديد R^2	0.9092
معامل الاختلاف C.V%	10.05
التذبذب Adeq precision	12.7764

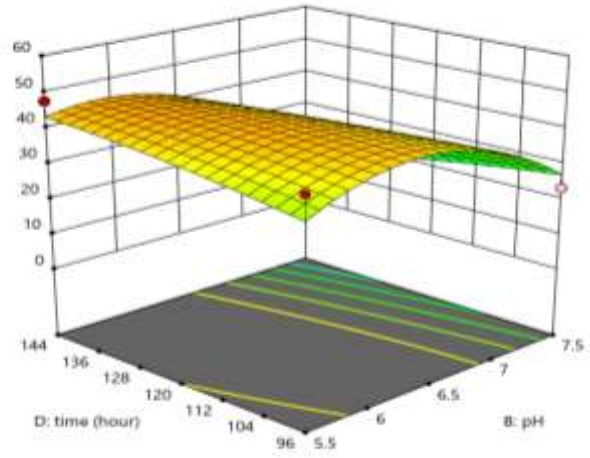
ويشير معامل الاختلاف (CV) إلى مقدار تشتت البيانات. وقد ظهر بأن معامل الاختلاف CV للفعالية الإنزيمية في الجدول (3) كان ضمن الحد المقبول والتي يجب ألا تتجاوز 20%.



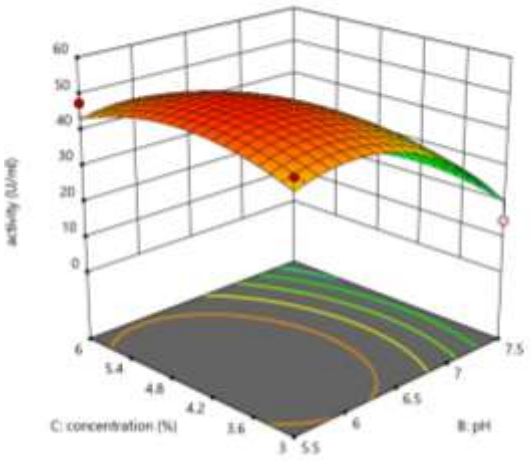
الشكل(8): تأثير الحرارة وتركيز الغاف في فعالية السيللولاز.



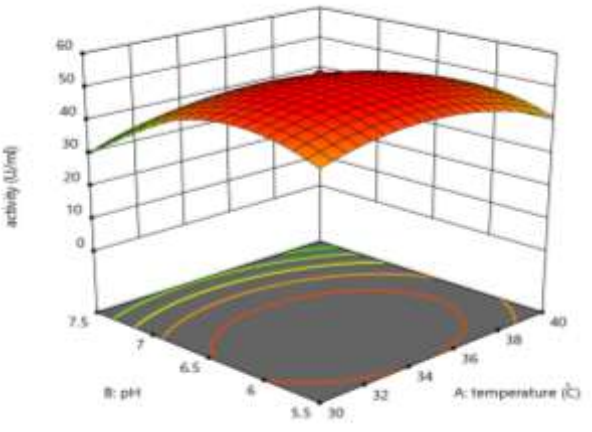
الشكل(7): تأثير الحرارة وزمن التحضين في فعالية السيللولاز.



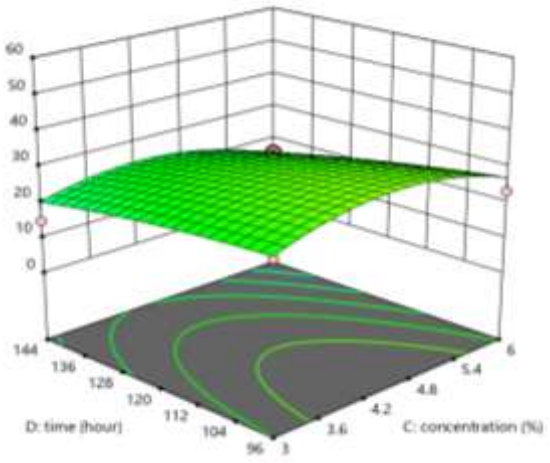
الشكل(10): تأثير رقم الpH والزمن في فعالية السيللولاز.



الشكل(9): تأثير رقم الpH وتركيز الغاف في فعالية السيللولاز.



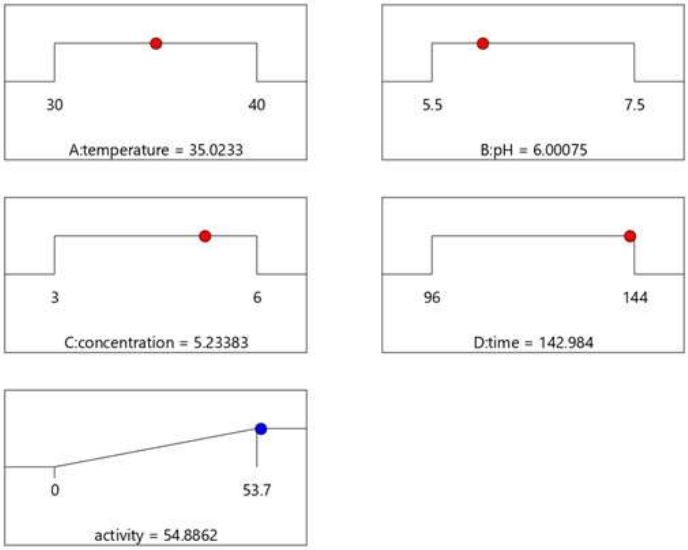
الشكل(12): تأثير الحرارة ورقم الpH في فعالية السيللولاز.



الشكل(11): تأثير الزمن وتركيز الغاف في فعالية السيللولاز.

تمّ تحديد الشروط المثلى لإنتاج السيللولاز من قبل *Trichoderma viride* من حيث درجة الحرارة التي بلغت 35م°، ورقم ال pH يساوي 6، وزمن التحضين الذي بلغ 142 ساعة، وتركيز قرون نبات الغاف 5.2%، وعند تطبيق هذه

الشروط بلغت الفعالية الإنزيمية للسيللولاز 53.9 $ml.U^{-1}$ فقد أشار تقارب النتائج التجريبية (53.9 $ml.U^{-1}$) مع القيم النظرية المتوقعة (54.8 $ml.U^{-1}$) من خلال النموذج المستخدم على ملاءمة النموذج ونجاح منهجية السطح التابعي في تحديد الشروط المثلى لإنتاج الإنزيم.



الشكل(13): الشروط المثلى المحددة لإنتاج السيللولاز من قبل *Trichoderma viride*.

الاستنتاجات والتوصيات:

1. عزل وتعريف الفطر *Trichoderma viride*. كما تمّ الكشف عن قدرة *Trichoderma viride* على إنتاج إنزيم السيللولاز، إضافة إلى تحديد قيمة مثلى لكل متغير من المتغيرات المدروسة والتي تملك تأثير على الفعالية الإنزيمية للسيللولاز وتمثلت بوسط يحوي على قرون الغاف بتركيز 5.2%، ورقم ال pH بلغ 6، وتمّ التحضين عند درجة حرارة35م°، ، ولمدة 142 ساعة.

2. يوصى بإجراء أبحاث تتعلق بتحديد القيم المثلى لمتغيرات مؤثرة (مصدر الكربون، مصدر النتروجين، تركيز المعلق البوغي، تركيز بعض الأملاح المغذية) في فعالية إنزيم السيللولاز المنتج من قبل كائنات حية دقيقة أخرى (بكتيريا، فطريات العفن، الخمائر)

References:

1. BANNARI,A.,BANNARI,A.,VERMETTE,P., AND PROULX,P. Model for cellulase production from *Trichoderma reesei* in an airlift reactor. Biotechnology And Bioengineering, (2012). 109(8):2025-2038.

2. CHANDEL, A. K., KAPOOR, R. K., SINGH, A., AND KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. Bioresour. Technol, (2007). 98:1947–1950.

3. DIAS,L.M.,DOS SANTOS, B.V., ALBUQUERQUE, C. J. B., BAETA, B. E. L., PASQUINI,D., AND BAFFI,M.A. Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by *Aspergillus niger* and A. *fumigatus*.J.Appl Microbiol, (2018). 124(3):708-718.

4. GHAZANFAR,M.,IRFAN,M.,NADEEM,M., AND SYED,Q. Role of bioprocess parameters to improve cellulase production: Part I. In: New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering, Elsevier. (2019). 63-76. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64223-3.00005-9
5. GUPTA,R.,SHARMA,K.K., AND KUHAD,R.CH. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. Bioresource Technology, (2009). 100:1214-1220.
6. IJAZ,A.,ANWAR,Z.,ZAFAR,Y.,HUSSAIN,I.,MUHAMMAD,A., IRSHAD,M., AND MEHMOOD,S. Optimization of cellulase enzyme production from corn cobs using *Alternaria alternata* by solid state fermentation. Journal of Cell and Molecular Biology, (2011). 9(2): 51-56.
7. IMMANUEL,G.,DHANUSHA,R.,PREMA,P., AND PALAVESAM,A. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. Int. J .Environ .Sci .Tech, (2006) 3:25-34.
8. IRFAN,M.,IRFAN,U.,RAZZAQ,Z.,SYED,Q., AND NADEEM,M., Utilization of agricultural wastes as a substrate for carboxymethyl cellulose production from *Aspergillus niger* in submerged fermentation. Int. J. Agro. Vet. Med. Sci, (2011). 5:464-471. https://doi.org/10.5455/ijavms.20110707123722
9. KANAKARAJU,Y.,UMA,A., AND PALETY,K. *Aspergillus niger* Based Production of Cellulase-A Study on Submerged and Solid State Fermentation. Journal of Scientific Research, (2020). 64(3):60-65.
10. KIRK,O.,BORCHERT,T.V., AND FUGLSANG,C.C. Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol, (2002). 13(4):345-351.
11. MELO,I.R.,PIMENTEL,M.F.,LOPES,C.E., AND CALAZAN,G.M.T., Application of fractional factorial design to levan production by Zymomonas mobilis. Braz J Microbiol, (2007). 38:45-51.
12. NAIK,S.N.,GOUD,V.V.,ROUT,P.K., AND DALAI, A. K. Supercritical CO2 fractionation of bio-oil produced from wheat-hemlock biomass. Bioresour Technol, (2010). 101(19):7605-7613.
13. PANDEY,S.,SHAHID,M.,SRIVASTAVA,M.,SINGH,A.,SHARMA,A.,KUMAR,V., AND SRIVASTAVA,Y.K. Effect of Various Physiological Parameters and Different Carbon Sources on Cellulase and Xylanase Induction by Different Strains of *Trichoderma* Species. Enzyme Engineering, (2014). 3(1):120-125. doi:10.4172/2329-6674.1000120
14. PENTTILA, M., LIMON, C., AND NEVALAINEN, H. Molecular biology of *Trichoderma* and biotechnological applications In: Arora D (ed.). Handbook of fungal biotechnology. Marcel Dekker, (2004).Inc. 413-427.
15. PRADEEP,N.V.,ANUPAMA,A.,VIDYASHREE,K.G., AND LAKSHMI,P. In silico characterization of industrial important cellulases using computationaltools. *Adv. Life Sci. Technol.*, (2012) 4:2224-7181.
16. SHAFIQUEM, S.H., BAJWA, R., AND SHAFIQUE,S. Cellulase Biosynthesis By Selected *Trichoderma* Species. Pak. J. Bot., (2009). 41(2): 907-916.
17. SHARFUDDIN,C., AND MOHANKA,R. In vitro antagonism of indigenous *Trichoderma* isolates against phyto pathogen causing wilt of lentil. *Int J Life Sci Pharm Res*. (2012),3:195-202

18. SINGH,N.,DEVI,A.,BISHNOI,M.B.,JARYAL,R.,DAHIYA,A.,TASHYREV,O., AND HOVORUKHA,V. *Overview of the process of enzymatic transformation of biomass*.In: Elements of Bioeconomy. Intech. (2019). Open. https://doi.org/10.5772/intechopen.85036
19. TABAO,N.C., AND MONSALUD,R.G. Screening and Optimization of Cellulase Production of *Bacillus* Strains Isolated From Philippine Mangroves. *Ph J Systematic Biol*.(2010), 4: 79-87,2010.
20. TEATHER, R.M., AND WOOD, P.J. Use of Congo Red-polysaccharide Interaction in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. Appl.Environ.Microbial.(1982),43(4):777-780.
21. WAKSMAN, S.A. Principle of soil microbiology,(1927). Wilkim & Wilkims Co. Baltimore, 1st ed.
22. ZAHRA,T.,IRFAN,M.,NADEEM,M.,GHAZANFAR,M.,AHMAD,Q.,ALI,SH.,SIDDI QUE,F., YASMEEN,Z.,FRANCO,M. Cellulase Production by *Trichoderma viride* in Submerged Fermentation using Response Surface Methodology. Punjab University Journal of Zoology (2020),35(2):223-228.