

# إنتاج وتوصيف إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *Trichoderma fertile* المعزول محلياً

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم – جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة

من قبل

**حوراء عباس حيدر**

بكالوريوس علوم الحياة – جامعة كربلاء

2008

إشراف

**أ.م.د. علي عبد الكاظم جاسم**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَعِنْدَهُ مَفَاتِحُ الْغَيْبِ لَا يُعْلَمُهَا إِلَّا هُوَ وَيَعْلَمُ مَا فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ وَمَا تَسْقُطُ مِنَ وَرَقَةٍ إِلَّا يَعْلَمُهَا وَلَا حَبَّةٍ فِي ظِلْمَةٍ إِلَّا فِي الْأَرْضِ وَلَا رَطْبٍ وَلَا يَابِسٍ إِلَّا فِي

كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة الأنعام

الآية 59

اللَّهُ قَدِيرٌ  
عَلَىٰ مَا تَعْمَلُونَ

إلى ...

من هي نوراً في حياتي ... أمي

إلى ...

من هو نبأً وعوناً لي ... أبي

إلى ...

من هم رمز الوفاء وسندي في الحياة ... إخوتي وأخواتي

إلى ...

من يسعدهم نجاحي ...

أهدي لهم ثمرة جهدي

# شكراً وتقديراً

الحمد لله رب العالمين على ما أنعم وله الشكر على ما ألهم والصلاة والسلام على سيد الخلق أجمعين  
محمد المصطفى الحبيب الأمين وعلى اله الأطهار الميامين...

وبعد ....

يشرفني بعد إتمام رسالتي هذه أن أتقدم بخالص شكري وامتناني للأب والأستاذ الفاضل الدكتور علي  
عبد الكاظم الغانمي لاقتراحه موضوع الرسالة ولما قدمه لي من عون وتشجيع وتوجيهات علمية كان  
لها الأثر البالغ في انجاز هذه الدراسة .

وأتوجه بالشكر الجزيل إلى عمادة كلية العلوم و رئاسة ومنتسبي قسم علوم الحياة لتوفيرهم كل  
المساعدة الممكنة لإتمام هذه الدراسة .

كما أتقدم بشكري وتقديري إلى الأستاذ الدكتور زيدان خليف المعموري لما قدمه لي من يد العون  
والمساعدة .

ولا يفوتني أن أتقدم بالشكر الخالص إلى الأستاذ الدكتور زهير والأستاذة الدكتورة بان لتوجيهاتهما  
العلمية السديدة .

ويطيب لي أن أتقدم بالشكر الوافر إلى زميلاتي في الدراسات العليا لمساندتهن لي خلال فترة البحث  
متمنية لهن الخير والموفقية .

واختتم كلامي بأرق وأسمى كلمات الحب والعرفان إلى جميع أفراد عائلتي على ما بذلوه من اجلي  
ومساندتهن لي طيلة دراستي ، وإلى كل من مد لي يد العون والمساعدة ولو بكلمة طيبة ومن الله  
التوفيق .

## الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لتحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *Trichoderma fertile* المعزول محلياً كونهما من الإنزيمات الأساسية المسؤولة عن تحليل الجدران الخلوية للفطريات الممرضة (التي تتكون بصورة رئيسة من الكايتين وبيتا-1-3 كلوكان). كما شملت الدراسة تنقية جزئية للإنزيمين ودراسة بعض صفاتهما المهمة ، وأظهرت النتائج ما يأتي :

1- بعد إجراء غربلة لـ 25 عزلة فطرية تعود لأجناس مختلفة تم اختيار العزلة الأعلى إنتاجاً للإنزيمين والتي شخّصت فيما بعد على أنها *Trichoderma fertile* وأعطيت الرمز AH1 لتصبح *T. fertile* AH1 ، واستخدمت في مراحل الدراسة اللاحقة .

2- كانت الظروف المثلى لإنتاج الإنزيمين من العزلة المختارة في هذه الدراسة هي استخدام وسط مكوّن من خميرة الخبز بنسبة 1.5 % المدعم بـ 0.1 % من كل من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين وكبريتات المغنيسيوم المائية برقم هيدروجيني ابتدائي 4.0 وحجم لقاح مقداره قرص واحد ( $10^6 \times 2.5$  سبور/مليلتر) والحضن في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 30 م° بسرعة رج 125 دورة /دقيقة ولمدة 96 ساعة .

3- تم تنقية الإنزيمين من الفطر *T. fertile* AH1 جزئياً وشملت خطوات التنقية الديلزة فالترسيب بالايثانول (20-70%) ثم التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose ، حيث أسفرت الخطوة الأخيرة عن ظهور صورتين إنزيميتين (A و B) لإنزيم الكايتينيز فضلاً عن صورة إنزيمية واحدة لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز ، وبلغ عدد مرات التنقية (2.22 و 0.27 و 2.55) مرة بحصيلة إنزيمية (31.49 و 3.18 و 35.96%) لصورتين إنزيميتين (A و B) وإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز على التوالي .

4- بعد توصيف صورتي إنزيم الكايتينيز (A و B) وإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز ، أظهرت النتائج ما يأتي :

أ- بلغت قيمة ثابت ميكالس ( $K_m$ ) والسرعة القصوى ( $V_{max}$ ) (0.37 و 0.4) ملي مولر و (1.4 و 1.5) مايكرومول/مليلتر/دقيقة لصورتي إنزيم الكايتينيز (A و B) على التوالي حيال مادة النفاةل  $p$ -Nitrophenyl N-acetyl  $\beta$ -D-glucosaminide (pNP-GlcNAc) ، بينما بلغت قيمة  $K_m$  و  $V_{max}$  لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز (111) مايكروغرام/مليلتر و (0.09) مايكرومول/مليلتر/دقيقة على التوالي حيال اللامينارين كمادة تفاعل .

ب- كانت الأرقام الهيدروجينية (5.0 و 5.5 و 4.5) هي المثلى لفعالية صورتي إنزيم الكايتينيز (A و B) وإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز على التوالي ، في حين تراوح الرقم الهيدروجيني للثبات بين (3.5-7.5) و (4.5-7.5) و (3.5-7.0) للصورتين (A و B) لإنزيم الكايتينيز وإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز على التوالي .

ج- أظهرت الصورتان (A و B) لإنزيم الكايتينيز ثباتاً حرارياً بين (20-40) م° و (20-55) م° لمدة 30 دقيقة على التوالي ، بينما كان الثبات الحراري لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز بين (20-45) م° ولمدة نفسها .

د- أدى استخدام بعض الأيونات المعدنية والمواد الكيميائية بالتركيزين (1 و 5) ملي مولر إلى تثبيط فعالية صورتي إنزيم الكايتينيز وإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز ولكن بدرجات متفاوتة ، بينما كان لكلوريد المنغنيز ( $MnCl_2$ ) تأثيراً حاشاً لفعالية الإنزيمين فضلاً عن كلوريد الحديد ( $FeCl_2$ ) الذي كان له تأثيراً حاشاً أيضاً ولكن لفعالية صورتي إنزيم الكايتينيز فقط .

5- تضمنت هذه الدراسة أيضاً بيان دور الآلية الإنزيمية في تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات المتمثلة بـ *Fusarium solani* و *Fusarium oxysporum* و *Rhizoctonia solani* و الفطر *Aspergillus flavus* المنتج للسم افلاتوكسين (Aflatoxin) وذلك باستعمال الراشح الخام للإنزيمين بتراكيز مختلفة ، وبيّنت النتائج أن للإنزيمين فعالية مثبطة واضحة ضد الفطريات المذكورة بنسبة 100 % عند التركيز (1 : 1) من ( الإنزيم : الوسط ) .

## قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	التسلسل
أ-ج	الخلاصة	
1	المقدمة	
4	استعراض المراجع	1
4	الجنس <i>Trichoderma</i>	1-1
5	الفطر <i>Trichoderma fertile</i>	1-1-1
6	الكائتين	2-1
8	الكلوكان	3-1
9	الإنزيمات المحللة للجدران الخلوية للفطريات	4-1
11	إنزيم الكايتينيز	1-4-1
12	مصادر إنتاج إنزيم الكايتينيز	2-4-1
12	دور إنزيم الكايتينيز في الطبيعة	3-4-1
14	إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز	4-4-1
14	مصادر إنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز	5-4-1
15	دور إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز في الطبيعة	6-4-1
16	إنزيم البروتيز	7-4-1
17	اختيار سلالات الأحياء المجهرية لإنتاج الإنزيمات	5-1
18	تأثير الظروف المزروعية في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز	6-1
18	1- تأثير المصدر الكربوني	
19	2- تأثير المصدر النيتروجيني	
20	3- تأثير مدة الحضان	
20	4- تأثير سرعة الرج	
21	5- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي	
22	6- تأثير حجم اللقاح	
23	7- تأثير درجة الحرارة	



الصفحة	الموضوع	التسلسل
24	8- تأثير الأملاح المعدنية	
24	تتقية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز	7-1
26	توصيف إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز	8-1
26	1- تعيين قيم ثابت ميكالس ( $K_m$ ) و السرعة القصوى ( $V_{max}$ )	
28	2- تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز	
29	3- تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز	
29	4- تأثير درجة الحرارة في ثبات إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز	
30	5- تأثير بعض الأيونات في فعالية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز	
32	السيطرة الحيوية	9-1
35	<b>المواد وطرائق العمل</b>	2
35	المواد والأجهزة المستخدمة	1-2
35	المواد الكيميائية المستخدمة والشركات المصنعة لها	1-1-2
36	الأجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها	2-1-2
37	طرائق العمل	2-2
37	اختيار العزلة الفطرية المناسبة	1-2-2
37	تنشيط العزلات الفطرية	2-2-2
38	تحضير وسط الإنتاج	3-2-2
38	تلقيح وسط الإنتاج	4-2-2
39	تشخيص العزلة الفطرية المنتخبة	5-2-2
39	تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>Trichoderma fertile</i> AH1	6-2-2
39	1- تأثير مدة الحضان	
40	2- تأثير سرعة الرج	
40	3- تأثير تركيز المصدر الكربوني	
40	4- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه	
40	5- تأثير درجة الحرارة	

الصفحة	الموضوع	التسلسل
41	6- تأثير نوع الأملاح المعدنية و تركيزها	
41	7- تأثير حجم اللقاح	
41	8- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي	
42	تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز	7-2-2
42	أ- تقدير الفعالية الإنزيمية باستخدام الكايتين الغروي كمادة تفاعل	
42	1- عمل المنحنى القياسي لسكر N-اسيتل كلوكوز أمين	
45	2- تقدير الفعالية	
46	ب- تقدير الفعالية الإنزيمية باستخدام مادة التفاعل (p-Nitrophenyl N-acetyl β-D-glucosaminide, pNP-GlcNAc)	
47	1- عمل المنحنى القياسي لمادة البارانيتروفينول (pNP)	
48	2- تقدير الفعالية	
49	تقدير فعالية إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز	8-2-2
49	1- عمل المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز	
52	2- تقدير الفعالية	
53	تقدير فعالية إنزيم البروتيز	9-2-2
54	تقدير البروتين	10-2-2
55	تنقية إنزيمي الكايتينيز و بيتا 1-3 كلوكانيز	11-2-2
56	1- الديلزة	
57	2- الترسيب بالايثانول بنسبة (20-70) %	
57	3- التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose	
59	توصيف إنزيمي الكايتينيز وبيتا 1-3 كلوكانيز	12-2-2
59	1- تقدير الثوابت الحركية	
60	أ- تقدير الثوابت الحركية لصورتين إنزيم الكايتينيز (A و B)	
61	ب- تقدير الثوابت الحركية لإنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز	
62	2- تقدير الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية الإنزيمية	

الصفحة	الموضوع	التسلسل
62	أ- تقدير الـ pH الأمثل لفعالية صورتي إنزيم الكايتينيز (A و B)	
63	ب- تقدير الـ pH الأمثل لفعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز	
63	3- تقدير الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز	
67	4- تقدير الثبات الحراري لإنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز	
67	5- تأثير بعض الأيونات المعدنية والمواد الكيميائية في إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز	
69	السيطرة الحيوية	13-2-2
71	<b>النتائج و المناقشة</b>	3
71	اختيار العزلة الفطرية المناسبة	1-3
75	تشخيص العزلة المنتخبة	2-3
75	تحديد الظروف المثلى لإنتاج أنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>Trichoderma fertile</i> AH1	3-3
75	1- تأثير مدة الحضان	
79	2- تأثير سرعة الرج	
82	3- تأثير تركيز المصدر الكربوني	
84	4- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه	
87	5- تأثير درجة الحرارة	
89	6- تأثير نوع الأملاح المعدنية و تركيزها	
92	7- تأثير حجم اللقاح	
94	8- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي	
97	التنقية الجزئية لإنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز	4-3
97	1- الديليزة	
100	2- الترسيب بالكحول الأثيلي	
101	3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني	
106	توصيف إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز	5-3
106	1- الثوابت الحركية [ ثابت ميكالس ( $K_m$ ) و السرعة القصوى ( $V_{max}$ ) ]	

الصفحة	الموضوع	التسلسل
106	أ- الثوابت الحركية لإنزيم الكايتينيز	
108	ب- الثوابت الحركية لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز	
110	2- الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية الإنزيمية	
110	أ- الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتينيز	
112	ب- الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز	
114	3- الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم	
114	أ- الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيم الكايتينيز	
116	ب- الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز	
117	4- الثبات الحراري للإنزيم	
117	أ- الثبات الحراري لإنزيم الكايتينيز	
119	ب- الثبات الحراري لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز	
121	5- تأثير بعض أيونات المعادن و المواد الكيميائية في فعالية الإنزيم	
121	أ- تأثير بعض أيونات المعادن و المواد الكيميائية في فعالية إنزيم الكايتينيز	
124	ب- تأثير بعض أيونات المعادن و المواد الكيميائية في فعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز	
125	السيطرة الحيوية	6-3
129	الاستنتاجات والتوصيات	
130	المصادر	
A-C	الخلاصة باللغة الانكليزية	

## قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
13	الكائنات المنتجة لإنزيم الكايتينيز	1
15	الكائنات المنتجة لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز	2
72	غربلة الفطريات لإختبار قابليتها على إنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز	3
99	خطوات تنقية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	4
123	تأثير بعض الأيونات المعدنية و المواد الكيميائية في فعالية صورتي إنزيم الكايتينيز (A و B) وإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	5
127	تأثير الراشح الإنزيمي الخام المنتج من الفطر <i>T. fertile AH1</i> في تثبيط نمو الفطريات الممرضة	6

## قائمة المخططات

الصفحة	العنوان	رقم المخطط
8	طرق تحليل الكايتين	1
98	تنقية إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	2

## قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
7	التركيب الكيميائي لكل من (أ) الكايتين ، (ب) السليلوز ، (ج) الكايتوزان	1
10	التركيب الكيميائي لكل من (أ) بيتا-1-3 كلوكان (ب) بيتا-1-3، 4-1 كلوكان (ج) بيتا-1-3، 6-1 كلوكان	2
44	المنحنى القياسي لسكر N-اسيتل كلوكوز أمين (GlcNAc)	3
48	المنحنى القياسي للبارانيتروفينول (pNP)	4
51	المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز	5
56	المنحنى القياسي للبروتين بطريقة برادفورد	6
73	غربة العزلات الفطرية لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز	7
76	تأثير مدة الحضانة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	8
78	تأثير مدة الحضانة في إنتاج إنزيم البروتيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	9
80	تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	10
83	تأثير تركيز المصدر الكربوني في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	11
85	تأثير تركيز كبريتات الامونيوم في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	12
86	تأثير تركيز كلوريد الامونيوم في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	13
88	تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	14
90	تأثير نوع الأملاح المعدنية في إنتاج : (A) إنزيم الكايتينيز / من الفطر <i>T. fertile AH1</i> (B) إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز	15
91	تأثير تركيز فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile AH1</i>	16

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
17	تأثير تركيز كبريتات المغنيسيوم المائية في إنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	92
18	تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	94
19	تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	96
20	كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم الكايتينيز من الفطر <i>T. fertile</i> AH1 باستخدام عمود DEAE-Cellulose (21×1.8) سم الذي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات (0.005 مولر ، برقم هيدروجيني 6.5) بسرعة جريان 1 مل / دقيقة وبواقع 3 مل / جزء (خطوة الغسل)	103
21	كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر <i>T. fertile</i> AH1 باستخدام عمود DEAE-Cellulose (21×1.8) سم الذي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات (0.005 مولر ، برقم هيدروجيني 6.5) بسرعة جريان 1 مل / دقيقة وبواقع 3 مل / جزء (خطوة الغسل)	104
22	كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم الكايتينيز من الفطر <i>T. fertile</i> AH1 باستخدام عمود DEAE-Cellulose (21×1.8) سم الذي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات (0.005 مولر ، برقم هيدروجيني 6.5) تم الاسترداد بمحلول تدرج ملحي من كلوريد الصوديوم (0.3-0.0) مولر بسرعة جريان 1 مل / دقيقة وبواقع 3 مل / جزء	105
23	منحنى لاينويفر-بورك لتقدير $K_m$ و $V_{max}$ للصورة (A) من إنزيم الكايتينيز المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1 باستخدام مادة التفاعل pNP-GlcNAc	107
24	منحنى لاينويفر-بورك لتقدير $K_m$ و $V_{max}$ للصورة (B) من إنزيم الكايتينيز المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1 باستخدام مادة التفاعل pNP-GlcNAc	108
25	منحنى لاينويفر-بورك لتقدير $K_m$ و $V_{max}$ لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1 باستخدام اللامينارين مادة تفاعل	109

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
111	الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتينيز (الصورة A) المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	26
112	الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتينيز (الصورة B) المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	27
113	الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	28
114	الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم الكايتينيز (الصورة A) المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	29
115	الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم الكايتينيز (الصورة B) المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	30
117	الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	31
118	الثبات الحراري لإنزيم الكايتينيز (الصورة A) المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	32
119	الثبات الحراري لإنزيم الكايتينيز (الصورة B) المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	33
120	الثبات الحراري لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى جزئياً من الفطر <i>T. fertile</i> AH1	34



## المختصرات الواردة في الرسالة

BSA	Bovine Serum Albumin
DEAE-Cellulose	Diethyl Amino Ethyl-Cellulose
DMAB	Dimethyl Amino Benzaldehyde
DNSA	3,5 Dinitro Salycilic acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic acid
GlcNAc	N-acetylglucosamine
$K_m$	Michaelis Constant
4-MU	4-methylumbelliferyl
4-MU-GlcNAc	4-methylumbelliferyl- N-acetyl $\beta$ -D-glucosaminide
PDA	Potato Dextrose Agar
pNP	p-Nitrophenol
pNP-GlcNAc	p-Nitrophenyl N-acetyl $\beta$ -D-glucosaminide
TCA	Tri Chloro Acetic acid
$V_{max}$	Maximum Velocity

المقدمة

*Introduction*

## المقدمة (Introduction)

تشير الإحصائيات العالمية إلى أن ما يقرب من 30 % من النباتات تتعرض للتلف بفعل الممرضات النباتية (Kucuk & Kivanc, 2003) وتحتل الفطريات و الحشرات الصدارة من بين الممرضات المذكورة نظراً لشدة ضراوتها في إحداث الخسائر المشار إليها و خاصة في المحاصيل الاقتصادية المهمة .

وعلى الرغم من استخدام المبيدات الكيميائية في الحد من تلك الممرضات إلا أن استخدام هذا النوع من مكافحة بدأ يقترن بظهور العديد من المشاكل مثل صعوبة تكسير هذه المبيدات مما يؤدي إلى تركيزها و / أو تجمعها في السلاسل الغذائية إلى الحد الذي يتسبب بظهورها بمستويات عالية السمية في الحيوانات ، و تقليل الفلورا الطبيعية في التربة ، وتلوث المياه الجوفية وتقليل التنوع الإحيائي فضلاً عن ظهور سلالات من المسببات المرضية مقاومة لتأثير بعض المبيدات الكيميائية (Kucuk & Kivanc, 2003 ; Sharma *et al.*, 2011) لذا فقد انصبت الدراسات حول إيجاد البديل المناسب للمكافحة الكيميائية وتكالت الجهود بظهور السيطرة الحيوية (Biological control) التي تعد التقنية الواعدة بالمحافظة على الإنتاج الزراعي ، كما تتميز بكونها عوامل صديقة للبيئة أولاً و غير ضارة بصحة الإنسان ثانياً فضلاً عن كفاءة استخدامها ثالثاً. تتضمن السيطرة الحيوية استخدام كائنات حية غير ضارة أو جيناتها أو منتجاتها الايضية التي لها القابلية على تقليل التأثير السلبي للممرضات النباتية فضلاً عن تحفيز الاستجابة الموجبة للنبات (Vinale *et al.*, 2008) .

تتكون جدران الفطريات من تركيب معقد من الكايتين (chitin) و (1-3 و 1-6) بيتا- كلوكان ( $\beta$  1-6 , 1-3) و المانان (mannan) و البروتين (protein) ، ويتباين هذا التركيب المعقد باختلاف الأنواع المختلفة للفطريات (Adams, 2004) .

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

ويتم الحصول على هذين الإنزيمين من مصادر مختلفة ، إلا أن إنتاجهما من الأحياء المجهرية يكتسب أهمية خاصة لأسباب عديدة لعل أهمها إبتعاده عن التأثيرات الموسمية و الفصلية. وتميزت بعض الأجناس الفطرية بإنتاجها الوفير للإنزيمين المشار إليهما لذا فقد استخدمت هذه الأجناس كعوامل سيطرة حيوية كفوءة ، ولعل جنس الـ *Trichoderma* واحداً من ابرز عوامل السيطرة الحيوية المستخدمة على المستوى التجاري و ذلك من خلال الآليات المتنوعة التي يمتلكها هذا الجنس و المتمثلة بإفرازه للإنزيمات المحللة (lytic enzymes) و المضادات الفطرية وكونه منافساً (competitor) للممرضات الفطرية (fungal pathogens) و تحفيزه لنمو النبات (Kucuk & Kivanc, 2003) . وفضلاً عما سبق يتميز هذا الجنس بسهولة عزله و تكاثره و عدم احتياجه إلى متطلبات غذائية خاصة .

وتختلف السلالات الميكروبية فيما بينها من حيث إنتاجها للإنزيمات لذا فأن عملية الغربلة (Screening) لازالت تحظى باهتمام كبير كونها التقنية الكفيلة بانتخاب الكائن المجهري الأغزر إنتاجاً بالإنزيم المطلوب ، كما أن التحكم بظروف التخمر سواءً باستخدام انسب كائن مجهري و بيئة و تهوية و تحريك و مضادات الرغاوي و رقم هيدروجيني و حرارة ... الخ يؤدي إلى زيادة في ناتج التخمر ، ويجب أن لا يغفل ما تمتلكه الأحياء المجهرية من قابليات منقطة النظير في التكيف مع الظروف المشار إليها مقارنة بالخلايا الحية الأخرى .

ونظراً لصعوبة فصل الإنزيمات الداخلية (Intracellular enzymes) من الخلايا و ضيق أسواقها بسبب زيادة كلفة إنتاجها فضلاً عن محدودية كمياتها لذا فقد استقطبت الإنزيمات الخارجية (Extracellular enzymes) اهتمام الباحثين و اتسعت عمليات إنتاجها .

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

- 1- غربلة العزلات الفطرية المحلية و تحديد الأكفأ منها في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز .
- 2- تحديد الظروف المثلى لإنتاج الإنزيمين من العزلة المنتخبة .
- 3- محاولة تنقية الإنزيمين بالطرق المتاحة .
- 4- توصيف الإنزيمين .
- 5- بيان دور هذين الإنزيمين في تنشيط نمو بعض الفطريات الممرضة للنبات .

# الفصل الأول

استعراض المراجع

*Literature Review*

## 1 - استعراض المراجع

### 1-1 الجنس *Trichoderma* :

وصف الجنس *Trichoderma* لأول مرة عام 1794 من قبل Person بالاعتماد على الطور اللاجنسي الذي عزله من التربة والمواد العضوية المتحللة (Monte & Llobell, 2003) . يوجد الفطر في التربة وعلى الأخشاب المتحللة والمواد النباتية (Gams & Bissett, 1998). كما يوجد أيضاً على سطوح جذور النبات (Jayalakshmi et al., 2009) . وبصورة عامة تكون الأنواع العائدة للجنس *Trichoderma* أكثر انتشاراً في التربة الحامضية (Klein & Eveleigh, 1998) ، حيث أشار Kredics et al. (2003) إلى أن سلالات الفطر *Trichoderma spp.* تتمكن من النمو في مدى واسع من الرقم الهيدروجيني يتراوح ما بين (2-6) في حين كان الرقم الهيدروجيني 4 هو الأمثل للنمو . وذكرت دراسة أخرى أن نمو سلالات الفطر يتوقف عند رقم هيدروجيني 7 و 8 على الوسطين Soil extract agar و Yeast extract agar على التوالي (Kredics et al., 2004) . تعد الأنواع التابعة للجنس *Trichoderma* متحملة نسبياً لمستويات الرطوبة المنخفضة ، أما درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر فتتراوح بين (25-30) م° (Klein & Eveleigh, 1998) . وهناك حوالي 89 نوعاً تابع لهذا الجنس (Samuels, 2006) ولهذه الأنواع القابلية على استخدام مجموعة واسعة من المركبات كمصادر كاربونية و نيتروجينية فضلاً عن إفراز الإنزيمات المختلفة لتحطيم البوليمرات النباتية إلى سكريات بسيطة تستخدمها للطاقة و النمو (Jayalakshmi et al., 2009) .

يعود الجنس *Trichoderma* إلى تحت قسم الفطريات الناقصة (Deuteromycotina) وصف Hyphomycetes ورتبته Hyphales وعائلته Dematiaceae (Shalini & Kotasthane, 2007) . أما طوره الجنسي فيعود إلى تحت قسم الفطريات الكيسية

(Ascomycotina) ورتبة Hypocreales وعائلة Hypocreaceae وجنس *Hypocrea spp.* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

وقام Bissett (1991) بتقسيم الجنس *Trichoderma* إلى خمس قطاعات (five sections) هي: *Trichoderma* و *Pachybasium* و *longibrachiatum* و *Saturnisporum* و *Hypocreanum*.

ويعد الجنس *Trichoderma* من أكثر الفطريات استخداماً في مجال السيطرة الحيوية، حيث استخدم كعامل سيطرة حيوية ضد الفطريات الممرضة منذ عشرينيات القرن الماضي (1920s) (Harman, 2006) فضلاً عن تحفيز النمو النباتي (Verma *et al.*, 2007).

### 1-1-1 الفطر *Trichoderma fertile* : (Gams & Bissett, 1998)

ينتمي الفطر *T. fertile* إلى القطاع *Pachybasium*، تكون مستعمرات هذا الفطر ذات نمو معتدل (4-6) سم، وتكون الثمار الكونيدية مسطحة أو ذات شكل يشبه الوسادة (cushion-shaped) سرعان ما تحاط بهالة خضراء - صفراء مع حزمة ضيقة من الغزل الفطري الأبيض وللمستعمرة رائحة ضعيفة تشبه رائحة العفن.

أما الحوامل الكونيدية فتكون ذات تفرعات غزيرة لكنها قصيرة جداً مما يعطي المظهر الخيطي للحامل الكونيدي، وتتميز هذه التفرعات بكونها ثنائية أو ثلاثية التفرع والتي بدورها تتفرع بهذا النوع من التفرع أيضاً، ويكون الجزء العلوي من الحامل الكونيدي صلباً ومستقيماً نسبياً وغير خصب (non fertile) وغير متفرع بمسافة (60-120) مايكروميتر فوق الجزء الخصب (fertile part)، في حين تكون قمة الحامل الكونيدي خصبة عند النضوج وتنتهي بفياليدة قمية واحدة أو أكثر من (2-3) فياليدة.

تكون الفياليدات ذات شكل ampulliform بأبعاد (3.2-7.0 × 2.4-3.8) مايكروميتر وتنشأ عادة كمجموعة من (2-5) وقليلاً ما تكون مفردة.



أما بالنسبة للكونيدات فتكون ذات شكل بيضوي إلى مستطيل بأبعاد (2.5-1.9 × 4.5-3.0) مايكروميتر ، بجدران ملساء و لون اخضر .

## 2-1 الكايتين (Chitin) :

يعد الكايتين ثاني أهم بوليمر طبيعي شيوياً في العالم بعد السليلوز (Duo-Chuan ,2006 ; Rinaudo ,2006) .

وهو عبارة عن بوليمر خطي متجانس لوحدات سكر N-اسيتيل كلوكوز أمين (N-acetylglucosamine ,GlcNAc) مرتبطة مع بعضها بأواصر كلايكوسيدية من نوع  $\beta$  (1-4) (Donderski & Trzebiatowska ,1999) وبذا فإن التركيب الكيميائي للكايتين يشابه التركيب الكيميائي للسليلوز مع استبدال إحدى مجاميع الهيدروكسيل في ذرة الكربون الثانية للسليلوز بمجموعة acetamide (-NHCOCH<sub>3</sub>) (Dutta *et al.* ,2004) . وقد يتواجد الكايتين بشكل كائتوزان عندما تسحب منه مجاميع الاسيتيل (Aranaz *et al.* ,2009) (الشكل 1 أ،ب،ج) (Kumar ,2000) .

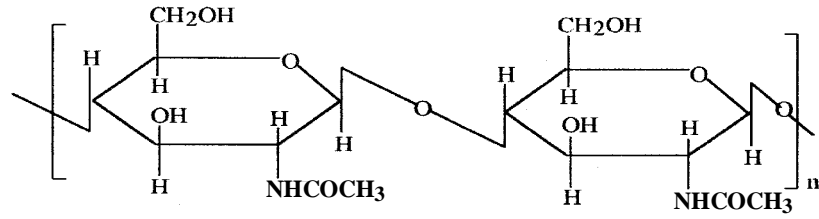
يوجد الكايتين في الطبيعة بأشكال ثلاث وهي (Palpandi *et al.* ,2009) :

1-  $\alpha$ -chitin : وهو الأكثر شيوياً في الطبيعة ويتكون من سلاسل غير متوازية .

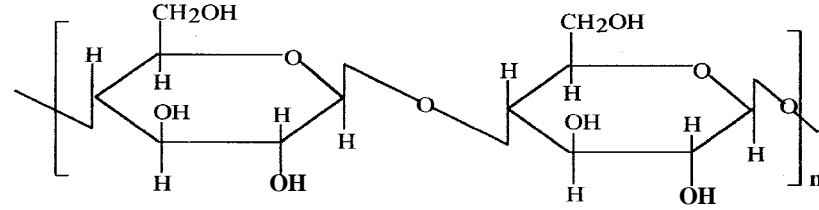
2-  $\beta$ -chitin : يتكون من سلاسل متوازية مرتبطة بأواصر هيدروجينية .

3-  $\gamma$ -chitin : يتكون من اتحاد سلاسل غير متوازية ( $\alpha$ -chitin) مع سلاسل متوازية ( $\beta$ -chitin) .

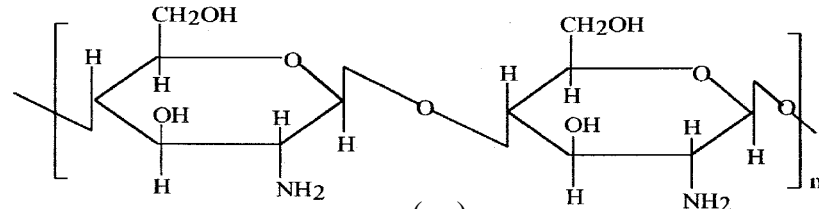
ويمتاز الكايتين بأنه عديم الذوبان في الماء و اغلب المذيبات العضوية (Dutta *et al.* ,2004) كما يمتاز بكونه عديم السمية (non-toxicity) و قابل للتحلل (biodegradability) و متوافق حيوياً (biocompatibility) لذا يدخل في العديد من التطبيقات الطبية و الصيدلانية (Aranaz *et al.* ,2009) . ويحتوي الكايتين على نيتروجين بنسبة (5-8)% (Dutta *et al.* ,2004 ; Kumar ,2000) .



(أ)



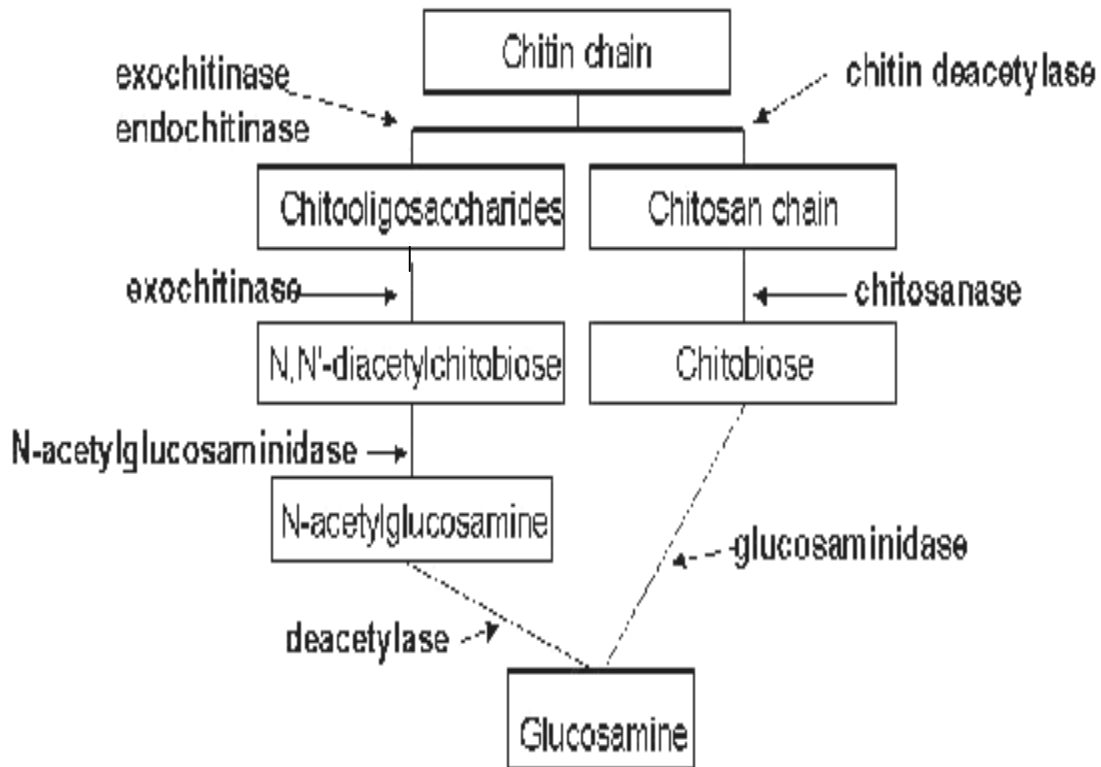
(ب)



(ج)

الشكل (1) : التركيب الكيميائي لكل من (أ) الكايتين ، (ب) السليلوز ، (ج) الكايتوزان .

يوجد الكايتين في الجدار الخلوي للعديد من الفطريات مثل الفطريات البازيدية حيث يشكل نسبة (8.5-19.6)% من الوزن الجاف (Mario *et al.*, 2008) فضلاً عن تواجده في الهيكل الخارجي للقشريات مثل الروبيان (Shrimp) و سرطان البحر (Crab) (Wanjun *et al.*, 2005) و كيوكل الحشرات (Merzendorfer & Zimoch, 2003) . ويتحلل الكايتين بفعل إنزيمات الكايتينيز محرراً سكر كلوكوز أمين (glucosamine) بالإضافة إلى سكر N-اسيتل كلوكوز أمين (N-acetylglucosamine) الذي يعد مهماً في تجهيز الكاربون و النيتروجين لمعظم الأحياء المجهرية (مخطط 1) (Berahim, 2007 ; Kopency & Hodrova, 1998 ; Goodrich & Morita, 1977) .



مخطط (1) : طرق تحلل الكايتين .

### 3-1 الكلوكان (glucan) :

الكلوكان عبارة عن سكر متعدد متجانس (homopolysaccharides) يتكون من وحدات سكر الكلوكوز (D-glucose) المرتبطة مع بعضها بأواصر كلايكوسيدية من نوع ألفا أو بيتا بشكل خطي أو متفرع (Laroche & Michaud ,2007) . أما بيتا 1-3 كلوكان فهو عبارة عن بوليمر لثمالات سكر الكلوكوز (D-glucose) المرتبطة على شكل  $\beta$  1-3 (Ramada *et al.* , 2010).

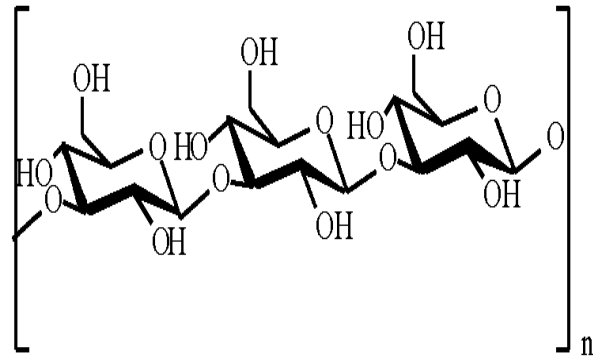
ينتج بيتا 1-3 كلوكان من الأحياء بدائية وحقيقية النواة ، واعتماداً على الصفات التركيبية (structural features) يقسم إلى بيتا 1-3 كلوكان و بيتا 1-3 ، 4-1 كلوكان (بشكل خطي) (الشكل 2 أ ، ب) و بيتا 1-3 ، 6-1 كلوكان (بشكل متفرع ويكون التفرع إما بانتظام أو بشكل عشوائي) (الشكل 2 ج) ، ويوجد كل من بيتا 1-3 وبيتا 1-3 ، 6-1 كلوكان في الجدار الخلوي للفطريات أو يفرزان على شكل سكر متعدد خارجي (exopolysaccharides) بوساطة البكتريا (Laroche & Michaud, 2007) .

ويوجد بيتا 1-3 كلوكان في الجدار الخلوي للخمائر حيث يشكل نسبة (55-65)% من الجدار الخلوي للخميرة *Saccharomyces cerevisiae* (Klis et al., 2002) . أما بيتا 1-3 ، 4-1 كلوكان فيوجد في النبات مثل الشعير والشوفان (Johansson, 2006) . و يدخل بيتا 1-3 كلوكان في العديد من التطبيقات الصناعية و الطبية اعتماداً على خصائصه الفيزيائية و الحيوية (Laroche & Michaud, 2007) .

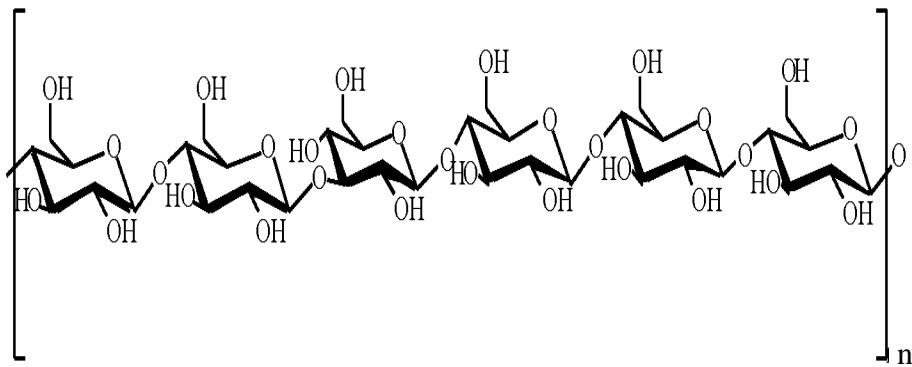
قد يرتبط الكلوكان بالكيتين بوساطة أو اصر تساهمية في بعض الجدران الخلوية للفطريات ، و هذا المعقد (كيتين - كلوكان) يكون عديم الذوبان في الماء و اغلب المذيبات العضوية والحوامض و القواعد الضعيفة ، لكنه قابل للذوبان في كلوريد الهيدروجين المركز بعكس الكيتين و السليلوز (Gamayurova et al., 1999) .

#### 4-1 الإنزيمات المحللة للجدران الخلوية للفطريات :

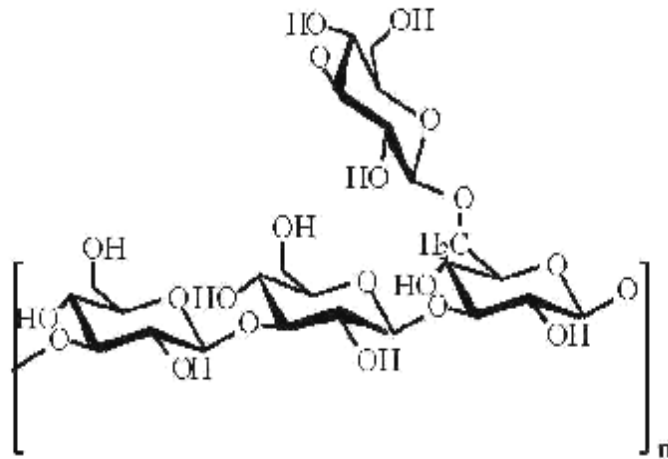
تتكون الجدران الخلوية للفطريات بصورة رئيسة من الكيتين (chitin) و بيتا 1-3 كلوكان ( $\beta$  1-3 glucan) وبيتا 1-6 كلوكان ( $\beta$  1-6 glucan) و المانان (Mannan) و البروتين (Protein) ، كما يوجد بيتا 1-3 ، 6-1 كلوكان ( $\beta$  1-3 , 1-6 glucan) المتفرع فضلاً عن ذلك توجد روابط بين الكيتين و الكلوكان (Matsumoto, 2006) .



(أ)



(ب)



(ج)

الشكل (2) : التركيب الكيميائي لكل من (أ) بيتا-1-3 كلوكان (ب) بيتا-1-3، 4-1 كلوكان

(ج) بيتا-1-3، 6-1 كلوكان .

يستثنى من التركيب الموصوف أعلاه ، الفطريات البيضية (Oomycetes) التي تحتوي على السليلوز (cellulose) في تركيب جدرانها الخلوية (Bhargava, 2008). ويتغير تركيب الجدار الخلوي للفطريات خلال انقسام الخلية (cell division) و النمو (growth) و التغيرات الشكلية (morphogenesis) (Adams, 2004).

كما تعد إنزيمات الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز المنتجة من بعض أنواع الفطر *Trichoderma spp.* من الإنزيمات الأساسية المسؤولة عن تحليل الجدران الخلوية للفطريات الممرضة خلال عملية التطفل (mycoparasitic action) (De La Cruz *et al.*, 1993, 1995b ; Sivan & Chet, 1989).

#### 1-4-1 إنزيم الكايتينيز (Chitinase) :

يعد إنزيم الكايتينيز من إنزيمات التحلل المائي حيث يعمل على تحليل الأصرة الكلايكوسيدية (β 1-4) للكايتين (Koga, 1995).

ويتم تصنيف الإنزيم إلى صنفين رئيسيين هما الكايتينيز الداخلي و الكايتينيز الخارجي (Graham & Sticklen, 1994). كما أوضح Cannon *et al.* (1994) إمكانية تصنيف هذين النوعين إلى الآتي :

أ- Endochitinase (EC 3.2.1.14) : يعمل هذا الإنزيم على شطر الأواصر الكلايكوسيدية بصورة عشوائية و في مواقع داخلية في سلسلة الكايتين مؤدياً إلى ظهور وحدات متعددة من سكر GlcNAc واطئة الوزن الجزيئي مثل chitotriose و chitotetroase مع وحدات من السكر الثنائي diacetylchitobiose التي تعد الناتج النهائي الأساسي .

ب- Exochitinase : يقسم الكايتينيز الخارجي بدوره إلى قسمين هما :

1- β-chitobiosidases (EC 3.2.1.29) أو chitin 1,4 chitobiosidases :

تحفز هذه الإنزيمات الإزالة المتكررة لسكر diacetylchitobiose من النهاية غير

المختزلة لسلاسل الكايتين منتجةً سكر diacetylchitobiose بشكل منفرد دون ظهور أي من السكريات الأحادية أو قليلة الوحدات .

2- (EC 3.2.1.30) Chitobiases أو  $\beta$ -(1,4)-N-acetylglucosaminidases):

تقوم بشطر سكر diacetylchitobiose وبوليمرات الكايتين العالية (higher chitin polymer) التي تتضمن chitotriose و chitotetraose إلى وحدات GlcNAc وتكون عملية الشطر خارجية (exo-type fashion) كما يقوم هذا الإنزيم بشطر مواد التفاعل الملونة مثل pNP-GlcNAc و p-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-galactosaminide محررةً بارانيتروفينول (pNP) ومادة التفاعل 4-MU-GlcNAc محررةً 4-MU ، ونظراً لامتلاك الإنزيم تخصصاً واسعاً حيال مواد التفاعل لذا يدعى بـ  $\beta$  N-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) .

#### 1-4-2 مصادر إنتاج إنزيم الكايتينيز :

يمكن أن نستعرض أهم مصادر إنزيم الكايتينيز في الجدول (1) .

#### 1-4-3 دور إنزيم الكايتينيز في الطبيعة :

لإنزيم الكايتينيز دور مهم و متنوع في الطبيعة نظراً لتنوع مصادر إنتاجه ، ففي الفطريات يلعب دوراً في التغذية (nutrition) و التغيرات الشكلية (morphogenesis) (Gooday ,1995) ، والتحلل الذاتي (autolysis) (Shin *et al.* ,2009) ، فضلاً عن دوره في الأمراض (pathogenesis) ، كما يلعب دوراً مهماً في تغذية البكتريا (Gooday ,1995) .

أما في النبات فيعد وجوده وسيلة دفاعية ضد الفطريات و الحشرات الممرضة (Sharma *et al.* ,2011) .

جدول (1) : الكائنات المنتجة لإنزيم الكايتينيز.

المراجع		الكائن المنتج
Nampoothiri <i>et al.</i> ,2004	الأعفان	<i>Trichoderma harzianum</i>
Omumasaba <i>et al.</i> ,2001		<i>Trichoderma viride</i>
Wasli <i>et al.</i> ,2006		<i>Trichoderma virens</i>
Lee <i>et al.</i> ,2009		<i>Penicillium sp.</i>
Yanai <i>et al.</i> ,1992		<i>Rhizopus oligosporus</i>
Mellor <i>et al.</i> ,1994	الخمائر	<i>Candida albicans</i>
Qing <i>et al.</i> ,2002		<i>Pichia membranefaciens</i> & <i>Candida guilliermondii</i>
Mahadevan & Crawford ,1997	البكتريا	<i>Streptomyces lydicus</i>
Liu <i>et al.</i> ,2010		<i>Bacillus thuringiensis</i>
Zhang <i>et al.</i> ,2001		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Konagaya <i>et al.</i> ,2006		<i>Clostridium sp.</i>
Verburg & Huynh ,1991	النبات	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Lopez & Gomez-Gomez ,2009		Saffran ( <i>Crocus sativus</i> ) crom
Taira <i>et al.</i> ,2005		Pineapple( <i>Ananas comosus</i> )leaf
Kabir <i>et al.</i> ,2006	الحشرات	<i>Bombyx mori</i>



#### 1-4-4 إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز ( $\beta$ 1-3 glucanase) :

يعد إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من إنزيمات التحلل المائي حيث يعمل على تحليل الأصرة الكلايكوسيدية بيتا-1-3 للمركب بيتا-1-3 كلوكان ( $\beta$  1-3 glucan) (Hong *et al.*, 2002) .  
ويمكن تصنيف الإنزيم إلى الأنواع الآتية :

أ- Exo  $\beta$  1-3 glucanase (EC 3.2.1.58) : يقوم بتحليل بيتا-كلوكان بالإزالة المتعاقبة للكلوكوز من النهاية غير المختزلة منتجاً وحدات من الكلوكوز ناتجاً رئيسياً  
( Ramada *et al.*, 2010) .

ب- Endo  $\beta$ -glucanase : يعمل هذا الإنزيم على شطر الأواصر الكلايكوسيدية بصورة عشوائية على طول سلسلة بيتا-كلوكان محرراً جزيئات كلوكان ثنائية (glucanobiose) وثلاثية (glucanotriose) .

ويتضمن النوعين الآتين (Boeckmann *et al.*, 2003 ; Terra & Ferreira , 1994) :

1- endo  $\beta$  1-3(4) glucanase (EC 3.2.1.6) : الذي يتمكن من تحليل كلا نوعي الأصرة الكلايكوسيدية (بيتا-1-3 و بيتا-1-4) .

2- endo  $\beta$  1-3 glucanase (EC 3.2.1.39) : الذي يتمكن من تحليل الأصرة الكلايكوسيدية بيتا-1-3 فقط .

#### 1-4-5 مصادر إنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز :

يمكن استعراض المصادر المهمة لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز في الجدول (2) .

جدول (2) : الكائنات المنتجة لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز .

المراجع		الكائن المنتج
El-Katatny <i>et al.</i> ,2001	الأعفان	<i>Trichoderma harzianum</i>
Yi <i>et al.</i> ,2008		<i>Trichoderma viride</i>
Bamforth ,1980		<i>Trichoderma reesei</i>
Marcello <i>et al.</i> ,2010		<i>Trichoderma asperellum</i>
Sanchez <i>et al.</i> ,1982		<i>Penicillium italicum</i>
Stahmann <i>et al.</i> ,1993		<i>Botrytis cinerea</i>
Molina <i>et al.</i> ,1989	الخمائر	<i>Candida albicans</i>
Jijakli & Lepoivre ,1998		<i>Pichia anomala</i>
Pang <i>et al.</i> ,2004	البكتريا	<i>Arthrobacter sp.</i>
Leelasuphakul <i>et al.</i> ,2006		<i>Bacillus subtilis</i>
Aono <i>et al.</i> ,1992		<i>Bacillus circulans</i>
Park <i>et al.</i> ,1992	النبات	Soybean ( <i>Glycine max</i> ) leaves
Jwanny <i>et al.</i> ,2001		Sugar beet ( <i>Beta vulgaris</i> ) leaves
Mauch <i>et al.</i> ,1988		Pea ( <i>Pisum sativum</i> ) pods

#### 1-4-6 دور إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز في الطبيعة :

تعتمد الوظائف الفسيولوجية لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز على مصدر إنتاجه ، ففي النبات له وظيفة دفاعية ضد الممرضات الفطرية (Fungal Pathogens) (Grenier *et al.* ,1993) ، وله دور أيضاً في تمايز الخلية (cell differentiation) (Neale *et al.* ,1990) . كما يعد عاملاً مهماً في تغذية البكتريا (Watanabe *et al.* ,1992) .

أما في الفطريات فلاإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز وظائف مختلفة حيث يشارك في التغيرات الشكلية (Adams ,2004) و التحلل الذاتي (Stahmann *et al.* ,1992 ; Szilagyi *et al.* ,2010) إضافةً إلى دوره الأساسي في التغذية (Lorito *et al.* ,1994 ; Sivan & Chet ,1989) .

## 1-4-7 إنزيم البروتياز (Protease) :

يعمل إنزيم البروتياز على شطر الأواصر الببتيدية في جزيئة البروتين محرراً ببتيدات صغيرة و أحماض أمينية (Haggag *et al.*, 2006 ; Qadar *et al.*, 2009) .  
ويعد إنزيم البروتياز من أهم الإنزيمات المنتجة صناعياً إذ يشكل نسبة 60 % من مجموع الإنزيمات المنتجة عالمياً (Romsomsa *et al.*, 2010) . وينتج الإنزيم من مصادر متعددة مثل النباتات و الحيوانات و الأحياء المجهرية ، غير أن البكتريا و الفطريات تعد المصادر الرئيسة لإنتاجه (Haq *et al.*, 2006) .

يتم تصنيف الإنزيمات المحللة للبروتين على أساس آلية العمل إلى (Whitaker, 1972) :

- 1- Serine Proteases : الإنزيمات التي تقع ضمن هذه المجموعة هي من نوع (endopeptidases) وتشمل (Chymotrypsin و Trypsin و Elastase و Thrombin و Subtilisin ) ، و تثبط هذه الإنزيمات بواسطة diisopropylphosphorofluoridate نتيجة ارتباطها بمجموعة الهيدروكسيل لثالمة حامض السيرين في الموقع الفعال للإنزيم .
- 2- Sulfhydryl Proteases : تشمل هذه المجموعة إنزيمات النباتات الراقية مثل (Papain و Ficin و Bromelain) و تثبط هذه الإنزيمات بواسطة Sulfhydryl Reagents .
- 3- Metal-Containing Proteases : الإنزيمات التي تقع ضمن هذه المجموعة هي من نوع (exopeptidases) مثل (Carboxypeptidase و Prolidase و Carnosinase و Iminodipeptidase ... الخ ) ، و تثبط هذه الإنزيمات بواسطة metal-chelating agents .

كما يتم تصنيف إنزيمات البروتياز على أساس مدى الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم إلى حامضي (acid) و متعادل (neutral) و قاعدي (alkaline) (Moriyara, 1974) .

## 5-1 اختيار سلالات الأحياء المجهرية لإنتاج الإنزيمات :

إن قيام عملية إنتاج الإنزيمات يرتكز أساساً على اختيار الأحياء الملائمة التي تنتج كميات كبيرة من الإنزيمات ويجب أن تتصف الأحياء المجهرية المنتجة بالآتي (Vyas & Dixit, 2009):

1- يفضل انتخاب الأحياء المجهرية التي تقوم بإفراز إنزيماتها إلى الخارج وذلك لسهولة فصل هذه الإنزيمات .

2- يفضل انتخاب الأحياء المجهرية التي تنتج كميات كبيرة من الإنزيمات .

3- أن يكون وقت التخمر (fermentation time) لإنتاج الإنزيمات قصيراً .

4- أن لا تقوم السلالات المستخدمة بإنتاج مواد ايضية تثبط نمو الأحياء المجهرية الأخرى .

5- أن تكون الأحياء المنتخبة غير ممرضة (non-pathogenic) .

6- يفضل أن تستخدم الأحياء التي تتمكن من النمو على مواد رخيصة .

توجد عدة سلالات فطرية معروفة بإنتاجها لإنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز . فهناك

أنواع من الجنس *Trichoderma* المتمثلة بـ *T. viride* و *T. auroviride* و

*T. pseudokoningii* و *T. harzianum* والتي استخدمت لإنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3

كلوكانيز في الدراسة التي أجراها Bruce et al. (1995) . وأوضح Ulhoa & Peberdy

(1991) أن السلالة 39.1 *T. harzianum* هي أكفأ العزلات في إنتاج إنزيم الكايتينيز بعد غربلة

14 عزلة فطرية . كما تميزت أربع عزلات للفطر *T. harzianum* في إنتاج إنزيم الكايتينيز من

بين 12 عزلة فطرية (Saad & Nawar, 2001) . وذكر Sharaf (2005) أن العزلة

*Alternaria alternate* هي الأكثر إنتاجاً لإنزيم الكايتينيز من بين 8 عزلات فطرية عائدة

لأجناس مختلفة .

أما في البكتيريا فتميزت السلالة *Paenibacillus chitinolyticus* JK2 و السلالة

*Aeromonas sp.* JK1 من بين 50 سلالة بكتيرية لإنتاج إنزيم الكايتينيز

(Al Ahmadi et al., 2008 a , b) . وأوضح Shanmugaiah et al. (2008) أن العزلة

*Bacillus laterosporous* MML2270 هي أفضل العزلات المحللة للكايتين بعد عملية غربلة

شملت 39 عزلة محللة للكابتين . وتميزت 57 سلالة من بين 102 سلالة لبكتريا *Serratia marscens* واختيرت منها السلالة *S. marscens* WF لإنتاج إنزيم الكايتينيز في الدراسة التي أجراها (Mejia-Saules et al. (2006).

## 1-6 تأثير الظروف المزروعية في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز :

إن إنتاج الإنزيمات المحللة لجدار الخلية يتحدد بعوامل عدة تتضمن نوع السلالة المستخدمة والظروف المزروعية و نوع المادة الأساس (Howell, 2003; Harman et al., 2004).

### 1- تأثير المصدر الكربوني :

يعد المصدر الكربوني ضرورياً لتزويد الخلية بالطاقة بالإضافة لأهميته في بناء الخلايا (الكتلة الحيوية) و تأثيره على إنتاج المنتجات الايضية الأولية و الثانوية حيث تصل نسبته إلى 50% من الوزن الجاف للخلايا (Harvey & McNeil, 2008).

استخدمت مصادر كربونية مختلفة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من أحياء مجهرية مختلفة ، ففي دراسة شملت ثمانية مصادر كربونية لمعرفة تأثيرها في إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Trichoderma harzianum* أشار (Ulhoa & Peberdy (1991 إلى تفوق الكابتين في إنتاج الإنزيم .

و باستخدام تخمرات الحالة الصلبة وجد (Nampoothiri et al. (2004 أن الكابتين الغروي بتركيز 1% هو أفضل المصادر الكربونية المستخدمة في إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. harzianum* . و كان أعلى إنتاج لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الخارجي (exo  $\beta$  1-3 glucanase) من الفطر *Trichoderma asperellum* باستخدام الجدار الخلوي للفطر *Rhizoctonia solani* (Bara et al., 2003) ، في حين استخدم الكابتين بتركيز 0.5% لإنتاج إنزيم بيتا-كلوكانيز من الفطر *Rhizopus microsporus var microsporus* (Celestino et al., 2006).

وأجرى Al Ahmadi *et al.* (2008 b) مقارنة بين مصادر كاربونية مختلفة و بتركيز 5 غم/لتر لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Aeromonas sp.* JK1 حيث اشتملت هذه المصادر على (الكايتين و سكريات أحادية و ثنائية و متعددة) إضافة إلى المعاملة الخالية من المصدر الكاربوني ، فلو حظ أن الكايتين هو أفضل مصدر كاربوني لإنتاج الإنزيم ، بعدها استخدم تراكيز متدرجة من الكايتين وأوضحت دراسته أن تركيز 7.5 غم /لتر هو التركيز الأمثل لإنتاج الإنزيم .

## 2- تأثير المصدر النيتروجيني :

يعد النيتروجين من العناصر الأساسية لبناء و نمو الخلايا الحية و يدخل في تركيب البروتينات و الحوامض النووية و يشكل حوالي (8-14)% من الوزن الجاف للخلايا . تكون مصادر النيتروجين في الطبيعة على نوعين : أما لا عضوية مثل النيتروجين الجوي وأملاح الامونيوم والنترات أو تكون مصادر عضوية مثل الحوامض الأمينية والبروتينات ومشتقاتها (الخفاجي ، 1990) .

أوضحت العديد من الدراسات أن هنالك تبايناً في تأثير نوع المصدر النيتروجيني في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الأحياء المجهرية ، ففي دراسة أجراها El-Katatny *et al.* (2000) لإنتاج الإنزيمين المذكورين من الفطر *T. harzianum* كان المصدران النيتروجينيان (نقيع الذرة الصلب و الببتون-كازئين) الأفضلان في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز على التوالي من بين عدة مصادر نيتروجينية عضوية و لاعضوية . ووجد Nampoothiri *et al.* (2004) باستخدام تخمرات الحالة الصلبة أن إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. harzianum* يزداد عند استخدام مستخلص الخميرة مصدراً نيتروجينياً و بتركيز 2 % .

أوضحت دراسة أخرى لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Serratia marcescens* تميز الببتون في إنتاج الإنزيم من بين عدة مصادر شملت الجيلاتين و الكازئين و مستخلص الخميرة و حليب منزوع الدهن بالإضافة إلى الببتون (محمود ، 2007) ، بينما كانت اليوريا 0.33 غم / لتر

أفضل مصدر نيتروجيني لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Paenibacillus sp.* (Singh et al., 2009b).

### 3- تأثير مدة الحضانة :

تباينت أوقات الحضانة اللازمة للوصول إلى أقصى إنتاج من إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الأحياء المجهرية المختلفة ، فقد وجدت عبيد (2006) أن مدة حضانة مقدارها 24 ساعة هي الأفضل لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. harzianum* Rifai النامي في وسط حاوي على الغزل الفطري الجاف للفطر *Rhizoctonia solani* ، بينما أوضح Tikhonov et al. (2002) أن إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطرين *Verticillium chlamyosporium* و *V. suchlasporium* يصل إلى أقصاه بعد مدة حضانة مقدارها (18-20) يوم . وذكر (2007) de Marco & Felix و (2009) Fleuri et al. أن 72 ساعة هي المدة اللازمة للحصول على إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* و إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Cellulosimicrobium cellulans* 191 على التوالي . وأشار Jijakli & Lepoivre (1998) إلى أن إنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الخارجي من الخميرة *Pichia anomala* strain K النامية في وسط حاوي على الجدار الخلوي للفطر *Botrytis cinerea* يصل أقصاه بعد 5 أيام من بدء الحضانة .

### 4- تأثير سرعة الرج :

يختلف التركيز الأمثل للأوكسجين اللازم لإنتاج المنتجات المختلفة ، و يعد انتقال الأوكسجين خلال الوسط الزراعي و وصوله إلى الخلايا النامية عاملاً حاسماً في عملية التخمر ، و تؤثر في سرعة الانتقال عوامل عدة منها سرعة جريان الهواء و سرعة المزج عن طريق الرج (Agitation) حيث يزيد الرج من المساحة السطحية المتاحة لانتقال الأوكسجين و يبطئ سرعة

صعود الفقاعات الغازية و تحررها من الوسط الزرعي السائل و يمنع اندماج الفقاعات الهوائية (الحيدري ، 1991) .

وللتحريك وظائف أخرى في عملية التخمر غير المساعدة على التهوية منها نشر و منع تكتل خلايا الأحياء المجهرية و نشر المواد الغذائية بصورة متساوية في جميع أرجاء المخمر (الحيدري و المصلح ، 1989) .

استخدمت سرع رج مختلفة لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الأحياء المجهرية ، فقد تم إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Talaromyces flavus* و إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الداخلي من الفطر *Trichoderma longibrachiatum* باستخدام سرعة رج مقدارها 200 دورة /دقيقة (Duo-Chuan et al. ,2005) و (Tangarone et al. ,1989) على التوالي ، بينما استخدم (Ulhoa & peberdy 1991) و (Mustafa et al. 2005) سرعة رج مقدارها 180 دورة /دقيقة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز على التوالي من سلالتين مختلفتين للفطر *T. harzianum* .

وأشار (Liu et al. 2003) إلى أن أفضل سرعة رج لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Verticillium lecanii* بلغت 150 دورة /دقيقة .

##### 5- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي :

إن للرقم الهيدروجيني تأثيراً في عملية التخمر حيث أن الفعالية الإنزيمية التي تشترك في المساعدة على تكوّن المنتج مدى مفضل محدود من الأرقام الهيدروجينية (الحيدري ، 1991) .  
وجد (Saad & Nawar 2001) أن الرقم الهيدروجيني الابتدائي للنمو و إنتاج إنزيم الكايتينيز من أربع عزلات للفطر *T. harzianum* كان 6.5 . و أشار (Tweddell et al. 1994) إلى أن إنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Stachybotrys elegans* وصل إلى أعلى مستوى له عند رقم هيدروجيني 5.0 ، بينما وصل إنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز إلى المستوى ذاته عند رقم



هيدروجيني 4.0 . و أوضح (Vaidya et al. 2001) أن أفضل إنتاج لإنزيم الكايتينيز من البكتريا *Alcaligenes xylosoxydans* كان عند رقم هيدروجيني 8.0 .  
و استخدم (de Marco & Felix 2007) وسط الإنتاج لإنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* برقم هيدروجيني 5.5 . و في دراسة أخرى عدّل الرقم الهيدروجيني لوسط النمو و إنتاج إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز من البكتريا *Bacillus subtilis* NSRS89-24 إلى 7.0 (Leelasuphakul et al. ,2006) .

## 6- تأثير حجم اللقاح :

تعد نوعية اللقاح و تكاثره من العوامل المهمة في زيادة الإنتاج و في الحصول على نتائج تجريبية جيدة في الأحواض الصغيرة المستخدمة في الدراسات البحثية و هناك بعض الشروط الواجب توفرها في اللقاحات لغرض استعمالها بشكل ناجح :

أ- يجب أن تكون خلايا اللقاح صحية و في حالة فعالة لكي تقلل فترة طور التطبع في التخمرات اللاحقة .

ب- أن تحضر بحجوم ملائمة .

ج- يجب أن تكون خلايا اللقاح بشكل مناسب لعملية التخمر .

د- يجب أن تكون خالية من الملوثات .

هـ- يجب أن تكون حاملة للصفة الإنتاجية التي تستعمل من أجلها .

إن أهم العوامل التي تجعل اللقاح مستوفياً للمتطلبات المذكورة آنفاً هي طبيعة الوسط الزراعي المستخدم في تحضير اللقاح (الحيدري و المصلح ، 1989) .

لقد استخدمت حجوم لقاح مختلفة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا 1-3 كلوكانيز من الأحياء المجهرية ، فقد استخدم (Wasli et al. 2006) حجم لقاح مقداره 10 % لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Trichoderma virens* . وأشار (Ulhoa & peberdy 1991) و (Maj et al. 2002)

إلى استخدام حجم لقاح مقداره  $10^7 \times 1$  سبور/ مل لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. harzianum* و إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *Trichoderma hamatum* على التوالي . وفي دراستين منفصلتين استخدمت فيهما تخمرات الحالة الصلبة ، وجد Nampoothiri et al. (2004) أن أفضل إنتاج لإنزيم الكايتينيز من الفطر *T. harzianum* كان باستخدام حجم لقاح مقداره 2 مل من العالق السبوري الحاوي على  $10^7 \times 4$  سبور/ مل ، بينما أشارت الدراسة الثانية إلى أن أفضل حجم لقاح لإنتاج إنزيم بيتا-3 كلوكانيز من الفطر *Aspergillus terreus* هو 1 مل من العالق السبوري ( $10^7$  سبور/ مل) لكل 10 غم من الوسط الإنتاجي (Prajanban et al., 2008).

و ذكر Noronha et al. (2000) في دراسة قام بها لإنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* أن حجم اللقاح المستخدم هو  $10^6 \times 4$  سبور/ مل .

#### 7- تأثير درجة الحرارة :

أشارت دراسات عدة إلى اختلاف درجة الحرارة المستخدمة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الأحياء المجهرية المختلفة ، فقد ذكر Nampoothiri et al. (2004) أن أفضل درجة حرارة لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. harzianum* هي 30 م° باستخدام تخمرات الحالة الصلبة ، بينما كانت درجة الحرارة 35 م° هي الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Bacillus laterosporous* MML2270 من بين درجات حرارية مختلفة تراوحت بين (20-45) م° (Shanmugaiah et al., 2008).

و في دراسة أجراها Fleuri et al. (2009) لإنتاج إنزيم الكايتينيز الخارج خلوي من البكتريا 191 *Cellulosimicrobium cellulans* كانت درجة الحرارة المثلى 25 م° . و أشار Vazquez-Garciduenas et al. (1998) و Saravanan et al. (2007) إلى أن درجة الحرارة المستخدمة لإنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* والفطر *Trichoderma reesei* (3929) على التوالي هي 28 م° .

## 8- تأثير الأملاح المعدنية :

على الرغم من توفر مصادر الطاقة و الكربون و النيتروجين للخلية الميكروبية فإنها لا تستطيع النمو في حالة الغياب الكلي للعناصر المعدنية ، و يرجع ذلك إلى ضرورة وجود العناصر المعدنية لتنشيط الكثير من التفاعلات الايضية و إلى وظيفة المركبات الفوسفاتية في توليد و تخزين الطاقة و إلى دخول المعادن في التركيب البنائي لعدد من المكونات البنائية في الخلية (ساجدي و علي ، 1987) .

ومن الضروري تحديد نسب و أنواع الأملاح المعدنية التي تضاف إلى الوسط الزراعي من خلال دراسة المسارات الايضية لإنتاج المنتجات المرغوبة (الحيدري و المصلح ، 1989) .  
استخدم Kucuk & Kivanc (2004) فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و كبريتات المغنيسيوم المائية بتركيز (0.9 و 0.2) غم /لتر على التوالي لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-3-كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* . و في دراسة أخرى استخدمت فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين بتركيز 0.07 % و كبريتات المغنيسيوم المائية بتركيز 0.05 % لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Bacillus sp. WY22* (Woo et al. ,1996) .

وباستخدام تخمرات الحالة الصلبة قام Prajanban et al. (2008) بدراسة تأثير فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $KH_2PO_4$ ) في إنتاج إنزيم بيتا- كلوكانيز من الفطر *Aspergillus terreus* ، لوحظ أن أفضل تركيز لهذا الملح هو 0.825 غم لكل 10 غم من وسط الإنتاج . و كان تركيز فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و كبريتات المغنيسيوم المائية المضافة إلى وسط إنتاج إنزيم بيتا-3-كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* هو (0.2 و 0.03) % على التوالي (Noronha et al. ,2000) .

## 1-7 تنقية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-3-كلوكانيز :

تعتمد عملية التنقية لبروتين معين من مجموعة من البروتينات على الخواص الفيزيائية والكيميائية للبروتين ومنها الاختلاف في الوزن الجزيئي و كثافة الشحنة و توزيعها و ذائبية

البروتين و تخصصه للارتباط بمجموعة معينة والاختلاف في الثبات تجاه درجة الحرارة ، و تتم عملية التنقية باستخدام وسائل مختلفة منها الترسيب بالأملح اللاعضوية مثل كبريتات الامونيوم والمذيبات العضوية مثل الأسيتون و كذلك استخدام الطرائق الكروماتوغرافية مثل التبادل الأيوني والترشيح الهلامي (Burgess ,2008) .

تمكن Yanai *et al.* (1992) من تنقية الصورتين (I و II) لإنزيم الكايتينيز من الفطر *Rhizopus oligosporus* و ذلك بالترسيب بكبريتات الامونيوم فكروماتوغرافيا الألفة باستخدام الكايتين ثم الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G-75 و أخيراً كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Toyopearl و تم الحصول من خطوة التنقية الأخيرة على عدد مرات تنقية (6.0 و 13.3) مرة بحصيلة إنزيمية مقدارها (1.8 و 1.7)% للصورتين المذكورتين على التوالي . ونجح Omumasaba *et al.* (2001) من تنقية إنزيم الكايتينيز من الفطر *Trichoderma viride* و ذلك بثلاث خطوات تنقية شملت كروماتوغرافيا التبادل الأيوني مرتين باستخدام المبادل DEAE Sepharose CL-6B أولاً وباستخدام المبادل Q-Sepharose ثانياً ومن ثم الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephacryl S-100 HR بحصيلة إنزيمية مقدارها 11.7 % وعدد مرات تنقية 14.3 مرة .

وقام Park *et al.* (2000) بتنقية إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Vibrio sp.* 98CJ11027 باستخدام الترسيب بكبريتات الامونيوم 30 % فكروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل Q-Sepharose ومن ثم الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G-200 وقد حصلوا من خطوة التنقية الأخيرة على حصيلة إنزيمية مقدارها 27 % وعدد مرات تنقية 33.1 مرة . كما تمكن Narayana & Vijayalakshmi (2009) من تنقية إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Streptomyces sp.* بخطوتين : الأولى بالترسيب بكبريتات الامونيوم بتركيز 80 % والثانية بالترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G-100 بعدد مرات تنقية 5 مرة وحصيلة إنزيمية 46.2 % .

و تناولت العديد من الدراسات تنقية إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز ، فقد تمكن Jian-Yi *et al.* (2002) من تنقية الإنزيم من الفطر *Trichoderma reesei* GXC و الحصول على عدد مرات تنقية مقدارها 14.60 مرة بحصيلة إنزيمية 6.62 % وذلك باستخدام الترسيب بكبريتات الامونيوم و الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G-100 ثم كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Sephadex A-50 . وتم الحصول على حصيلة إنزيمية مقدارها 9.5% و عدد مرات تنقية 35.7 مرة من تنقية إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز الخارجي من الفطر *T. asperellum* وذلك بخطوتي تنقية شملت الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephacryl S-100 و كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل Q-Sepharose (Bara *et al.*, 2003) .

وفي دراسة أخرى لتنقية إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز من البكتريا *Bacillus subtilis* NSRS89-24 باستخدام الترسيب بكبريتات الامونيوم 80 % ثم كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Sephacel و أخيراً الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G-100 ، تم الحصول على عدد مرات تنقية 38.9 مرة بحصيلة إنزيمية 27.6 % (Leelasuphakul *et al.*, 2006) .

## 8-1 توصيف إنزيمي الكايتينيز و بيتا 1-3 كلوكانيز :

### 1- تعيين قيم ثابت ميكالس ( $K_m$ ) و السرعة القصوى ( $V_{max}$ ) :

إن لتعيين قيمة ثابت ميكالس أهمية كبيرة بالنسبة للتفاعلات الإنزيمية و ذلك للأسباب الآتية (الداودي ، 1991) :

- أ- يمكن التعرف من قيمة  $K_m$  على القيمة التقريبية لمستوى مادة الأساس داخل الخلية .
- ب- يكون  $K_m$  مقدار ثابت لإنزيم معين لذا فإن القيمة الرقمية له تعد وسيلة للمقارنة بين الإنزيمات من مختلف الكائنات الحية ، أو بين الإنزيمات من أنسجة مختلفة للكائن الحي نفسه أو بين الإنزيمات في نسيج معين في مختلف مراحل النمو .

- ج- يعد التغيير في قيم  $K_m$  بسبب المواد العضية طريقة لتنظيم فعالية الإنزيم .
- د- عند معرفة قيمة  $K_m$  فانه بالاستطاعة السيطرة على ظروف التجربة إذ يمكن تعيين قيمة السرعة القصوى للتفاعل الإنزيمي و التي تعد مقياس لتركيز الإنزيم و ذلك عندما تكون  $[S]$  اكبر بكثير من  $K_m$  .
- هـ - يعبر ثابت ميكالس عن الملائمة النسبية لمواد بديلة لتكون مواد أساس للإنزيم .
- قَدَر (Dahiya et al. (2005) الثوابت الحركية لإنزيم الكايتينيز من البكتريا *Enterobacter sp. NRG4* فكانت قيمة  $K_m$  تساوي (1.43 و 1.41 و 1.8 و 2.0) ملغم/ مل أما الـ  $V_{max}$  فتساوي (83.33 و 74.07 و 40.0 و 33.33) مايكرومول/ مايكروغرام/ ساعة باستخدام الكايتين المنتفخ (Swollen Chitin) و الكايتين الغروي (Colloidal Chitin) و الكايتين المعاد تكوينه (Regenerated Chitin) و الكايتين الكلايكولي (Glycol Chitin) كمواد تفاعل على التوالي . وفي دراسة أخرى قام بها (Yong et al. (2005 لتقدير الثوابت الحركية لإنزيم الكايتينيز من البكتريا *Sanguibacter strain C4* كانت قيمة  $K_m$  (6.95) ملغم/ مل و الـ  $V_{max}$  (10.53) وحدة (دقيقة.ملغم)<sup>-1</sup> باستخدام الكايتين الغروي كمادة تفاعل . وكانت قيمة  $K_m$  و  $V_{max}$  باستخدام اللامينارين كمادة تفاعل هي 0.087 ملغم/ مل و 0.246 وحدة/ دقيقة على التوالي وذلك في دراسة أجراها (Bara et al. (2003 لتقدير الثوابت الحركية لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الخارجي (exo  $\beta$  1-3 glucanase) المنقى من الفطر *T. asperellum* .
- أما إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى من الفطر *T. harzianum* فيملك قيمة  $K_m$  و  $V_{max}$  هي 0.099 ملغم/ مل و 0.3 ملغم/ دقيقة.مل على التوالي باستخدام اللامينارين كمادة تفاعل (de Marco & Felix, 2007) . كما أوضح (Jijakli & Lepoivre (1998 أن إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الخارجي المنقى من الخميرة *Pichia anomala strain K* قيمة  $K_m$  و  $V_{max}$  مقدارها 22.41 ملغم/ مل و 48.54 مايكروغرام/ مل/ ساعة على التوالي وذلك باستخدام اللامينارين كمادة تفاعل أيضاً .

## 2- تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية إنزيمي الكايتينيز و بيتا 1-3 كلوكانيز :

بما أن الإنزيمات عبارة عن مواد بروتينية فإن أي تغيير في الـ pH سوف يؤثر تأثيراً كبيراً على الصفات الأيونية للمجاميع الأمينية و الكربوكسيلية الموجودة في جزيئة البروتين وبالتالي سوف تؤثر على الموقع أو المواقع الفعالة للإنزيم وكذلك على هيئة وشكل البروتين إضافة إلى أن القيم العالية أو الواطئة نوعاً ما من الـ pH سوف تؤدي إلى تغيير الحالة الطبيعية للبروتين (denaturation) ومن ثم الإقلال من فعالية الإنزيم ، ومن المعلوم أن لكل إنزيم قيمة معينة من الـ pH التي يعمل عليها بطاقته القصوى وتسمى بدرجة الـ pH المثلى (Optimum pH) (دلالي ، 1986) .

ذكر Souza et al. (2003) أن (pH 7.0) هو الرقم الهيدروجيني المثالي لفعالية إنزيم الكايتينيز الداخلي (endochitinase) المنقى من الفطر *Colletotrichum gloeosporioides* . وفي دراسة قام بها Kawachi et al. (2001) أوضح أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية صورتى الكايتينيز الخارج خلوي (P-1 و P-2) المنقيتين من الفطر *Isaria japonica* ينحصر بين (3.5-4.0) و (4.0-4.5) للصورتين المذكورتين على التوالي . وكان الرقم الهيدروجيني 9.0 هو الأمثل لفعالية إنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (Tsujiro et al. ,1993) .

وتناولت دراسات أخرى الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز فقد وجد Rana et al. (2003) أن (pH 3.6) هو الأمثل لفعالية الإنزيم المنقى من الفطر *T. harzianum* . وكانت أعلى فعالية لإنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز الخارجى المنقى من الخميرة *Candida albicans* عند الرقم الهيدروجيني (5.5-6.0) ويفقد 70 % من فعاليته عند الرقمين الهيدروجينيين (5.0 و 7.0) (Molina et al. ,1989) .

وأوضح Pang et al. (2004) في دراسة عن إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز الداخلى (endo  $\beta$  1-3 glucanase) المنقى من البكتريا *Arthrobacter sp.* أن الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية الإنزيمية هو 6.5 .

### 3- تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز :

يعتمد تأثير الرقم الهيدروجيني في ثبات الإنزيم على العوامل الآتية (الداودي ، 1991) :

أ- درجة الحرارة ب- القوة الأيونية ج- الطبيعة الكيميائية للمحلول المنظم

د- تركيز مادة التفاعل ه- تركيز الإنزيم

و- تراكيز المواد الحافظة مثل (الكليسيرين ومركبات السلفهايدريل)

ز- تراكيز الايونات المعدنية التي تلوث مزيج التفاعل .

ذكر Lee et al. (2009) أن إنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *Penicillium sp.*

LYG0704 يكون ثابتاً تجاه رقم هيدروجيني يتراوح بين (4.0-6.0) . و وجد Wang et al.

(2006) أن إنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا *Bacillus subtilis* W-118 يكون ثابتاً عند رقم

هيدروجيني يتراوح بين (5.0-7.0) لمدة 30 دقيقة . وفي دراسة أخرى لإنزيم الكايتينيز من

البكتريا *Ralstonia sp.* A-471 لوحظ أن الإنزيم المنقى يمتلك مدى واسعاً من pH الثبات

يتراوح بين (5.0-10.0) (Ueda et al. ,2005) .

وأوضح Maj et al. (2002) أن الرقم الهيدروجيني المثالي لثبات إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز

المنقى من الفطر *T. hamatum* هو 5.0 ، فيما ذكر Tangarone et al. (1989) أن ثباتية إنزيم

بيتا-1-3 كلوكانيز الداخلي المنقى من الفطر *T. longibrachiatum* تكون عند رقم هيدروجيني

يتراوح بين (4.9-9.3) . أما إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى من البكتريا *Euphausia superba*

فيكون ثابتاً تجاه رقم هيدروجيني يتراوح بين (4.5-7.0) لمدة 18 ساعة عند درجة حرارة 5 م°

(Suzuki et al. ,1987) .

### 4- تأثير درجة الحرارة في ثبات إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز :

تتأثر التفاعلات الكيميائية بصورة عامة بدرجات الحرارة ، وبالنظر للطبيعة البروتينية

للإنزيمات فأنها سوف تتأثر أيضاً بتغير درجات الحرارة ، إذ أن تغيرها يؤدي إلى تغيير الحالة

الطبيعية للإنزيم (denaturation) وبالتالي تقليل سرعة التفاعل (دلالي ، 1986) .



عند دراسة الثبات الحراري لإنزيم الكايتينيز الداخلي المنقى من الفطر *Colletotrechum gloeosporioides* لوحظ أن هذا الإنزيم يحتفظ بـ 95 % من فعاليته لغاية درجة الحرارة 50 م° بينما يفقدها تماماً عند درجة الحرارة 60 م° (Souza et al., 2003). كما أوضح (Dahiya et al., 2005) أن إنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا *Enterobacter sp.* NRG4 يكون ثابتاً حرارياً عند درجة حرارة 40 م° لمدة ثلاث ساعات .

وذكر (Tangarone et al., 1989) في دراسة عن إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الداخلي المنقى من الفطر *T. longibrachiatum* أن الإنزيم يكون ثابتاً حرارياً لغاية درجة الحرارة 50 م° . أما إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى من البكتريا *Euphausia superba* فيكون ثابتاً حرارياً لغاية درجة الحرارة 45 م° لمدة 10 دقائق عند رقم هيدروجيني 5.0 (Suzuki et al., 1987).

#### 5- تأثير بعض الأيونات في فعالية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز :

تبدي بعض الإنزيمات احتياجاً مطلقاً لأيون لاعضوي معين وذلك لنشاطها التحفيزي ، بينما تبدي إنزيمات أخرى نشاطاً متزايداً عند إضافة كاتيونات معينة إلى وسط التفاعل ، و تستطيع بعض الكاتيونات ثنائية التكافؤ أن تحل بعضها محل البعض الآخر ولكن أحياناً تتنافس إحداها مع الأخرى ، بينما تقوم المثبطات بخفض النشاط التحفيزي للإنزيمات (ساجدي و علي ، 1983) .

وجد (Lee et al., 2009) أن إنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *Penicillium sp.* LYG0704 يثبط بنسبة (79 و 81) % بوجود أيوني الحديد ( $Fe^{+2}$ ) و الزئبق ( $Hg^{+2}$ ) على التوالي ، بينما كان لأيونات المغنيسيوم ( $Mg^{+2}$ ) و الموليبيدوم ( $Mo^{+2}$ ) تأثيراً حاثاً في فعالية الإنزيم بمقدار (26 و 22) % على التوالي بتركيز 1 ملي مولر عند درجة حرارة 37 م° لمدة ساعة. و أشار (Govindsamy et al., 1998) إلى أن إنزيم الكايتينيز الخارج خلوي المنقى من الفطر *Myrothecium verrucaria* يثبط بوجود أيونات الخارصين ( $Zn^{+2}$ ) و الكوبلت ( $Co^{+2}$ ) و المنغنيز ( $Mn^{+2}$ ) و المغنيسيوم ( $Mg^{+2}$ ) و الـ  $Na_2EDTA$  بنسب (85 و 63 و 42 و 35 و 54) % على التوالي بتركيز 0.05 مولر .

و أشارت دراسات أخرى إلى تأثير الأيونات في فعالية إنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا ، فقد أوضح (Wang et al. 2010) أن إنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا *Pseudomonas sp.* TKU008 يثبط كلياً بوجود أيونات النحاس ( $\text{Cu}^{+2}$ ) و المنغنيز ( $\text{Mn}^{+2}$ ) بتركيز 5 ملي مولر لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 37 م° . أما إنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا *Stenotrophomonas maltophilia C3* فيثبط كلياً بتركيز 5 ملي مولر من أيونات الحديد ( $\text{Fe}^{+3}$ ) و الزئبق ( $\text{Hg}^{+}$ ) ، وبنسبة 57 % عند حضنه مع أيون الزئبق بتركيز 1 ملي مولر ، في حين تتراوح نسبة التثبيط بين (15-25) % بوجود أيونات المنغنيز ( $\text{Mn}^{+2}$ ) و الفضة ( $\text{Ag}^{+}$ ) و النحاس ( $\text{Cu}^{+2}$ ) و المركابتوايثانول بتركيز 5 ملي مولر (Zhang et al. ,2001) .

و ذكر (Yi et al. 2008) أن لأيونات الحديد ( $\text{Fe}^{+3}$ ) و المغنيسيوم ( $\text{Mg}^{+2}$ ) و المنغنيز ( $\text{Mn}^{+2}$ ) و النحاس ( $\text{Cu}^{+2}$ ) تأثيراً تثبيطياً على فعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى من الفطر *T. viride* TP09 حيث كانت الفعالية المتبقية بوجود الأيونات المذكورة (45.3 و 83.7 و 71.8 و 90.9 و 25.3 و 70.0 و 63.7 و 81.9) % عند التركيزين (5 و 10) ملي مولر على التوالي ، بينما كان لأيونات الخارصين ( $\text{Zn}^{+2}$ ) و الكالسيوم ( $\text{Ca}^{+2}$ ) و الحديد ( $\text{Fe}^{+2}$ ) تأثيراً حاثاً في فعالية الإنزيم . كما لوحظ أن إنزيم بيتا- كلوكانيز المنقى من الفطر *T. reesei* تزداد فعاليته بوجود أيونات الخارصين ( $\text{Zn}^{+2}$ ) و الكوبلت ( $\text{Co}^{+2}$ ) و الكالسيوم ( $\text{Ca}^{+2}$ ) و الحديد ( $\text{Fe}^{+2}$ ) بتركيز (1 و 5) ملي مولر بينما تثبط بوجود أيونات الحديد ( $\text{Fe}^{+3}$ ) و النحاس ( $\text{Cu}^{+2}$ ) و المنغنيز ( $\text{Mn}^{+2}$ ) و المغنيسيوم ( $\text{Mg}^{+2}$ ) عند التركيز 10 ملي مولر حيث بلغت الفعالية المتبقية (31.40 و 54.65 و 84.88 و 86.51) % لأيونات المذكورة على التوالي (Jian-Yi et al. ,2002) .

كما أوضح (Erfle & Teather 1991) أن إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى من البكتريا *Ruminococcus flavefaciens* يثبط تثبيطاً كاملاً بوجود أيونات الزئبق ( $\text{Hg}^{+2}$ ) و النحاس ( $\text{Cu}^{+2}$ ) وبنسبة 75 % بوجود أيونات الفضة ( $\text{Ag}^{+2}$ ) و النيكل ( $\text{Ni}^{+2}$ ) و بنسبة 50 % بوجود أيونات المنغنيز ( $\text{Mn}^{+2}$ ) و الحديد ( $\text{Fe}^{+3}$ ) بتركيز 1 ملي مولر .

## 9-1 السيطرة الحيوية (Biological Control) :

تعد السيطرة الحيوية أداة واعدة للمساعدة في الحفاظ على مستويات الإنتاج الزراعي و التقليل من استخدام المبيدات الكيميائية الملوثة للبيئة (Cortes *et al.*,1998) ، حيث أدى الاستخدام المفرط للمبيدات الكيميائية في الزراعة إلى العديد من المشاكل المتعلقة بفقدان خصوبة التربة و التدهور البيئي (Singh *et al.* ,2009a) ، لذا تعد السيطرة الحيوية أفضل بديل لاستخدام المبيدات الكيميائية الضارة للبيئة (Berahim ,2007) .

استخدم مصطلح السيطرة الحيوية في حقول مختلفة من علوم الحياة غير انه يشير في كل حقل من هذه الحقول إلى مدلول معين لذا فهو يشير في علم أمراض النبات إلى استخدام التضاد الميكروبي (microbial antagonism) لكبح الأمراض إضافة إلى استخدام الممرضات المتخصصة للسيطرة على الأدغال ، كما يتضمن بشكل أوسع الإشارة إلى استخدام النواتج الطبيعية المستخلصة أو المتخمرة من مصادر مختلفة للحد من تأثيرات الكائنات غير المرغوبة (Pal & Gardener ,2006) .

و تعد الأنواع التابعة لجنس الـ *Trichoderma* ذات أهمية في مهاجمة مجموعة واسعة من الفطريات المسببة للأمراض النباتية ، لذا استخدمت كعوامل سيطرة حيوية (Howell ,2003) لما تمتلكه هذه الأنواع من آليات متنوعة تؤثر من خلالها على الفطريات الممرضة ، ومن أهمها التطفل (Mycoparasitism) و إنتاج المضادات الحياتية (Antibiotics) و الإنزيمات المحللة للجدران الخلوية مثل الكايتينيز و بيتا 1-3 كلوكانيز و البروتينيز و التنافس (Competition) فضلاً عن تحفيز المقاومة للنبات (Stimulation of Plant Defense Mechanisms) (Jayalakshmi *et al.* ,2009 ; Pal & Gardener ,2006) .

استخدم الفطر *Trichoderma* في مكافحة العديد من الفطريات الممرضة للنبات ، إذ أشارت الدراسات إلى قابلية عزلات الفطر *T. harzianum* على اختزال النمو للعديد من الفطريات الممرضة مثل *Rhizoctonia solani* و *Sclerotium rolfsii* و *Fusarium culmorum* و *Fusarium oxysporum* و *Gaeumannomyces graminis var tritici* تحت ظروف الحقل

و البيت الزجاجي (Kucuk & Kivance ,2003 ; Elad et al. ,1980) . و وجد (2007) Sahi & Khalid أن الفطر *T. viride* تفوق في تثبيط نمو الفطر *F. oxysporum* المسبب لمرض الذبول لنبات الفلفل الحلو تبعه الفطر *T. harzianum* و *T. auroviride* و *T. koningii* و *T. pseudokoningii* بنسب تثبيط (62 و 36 و 24 و 18 و 6) % على التوالي . و أظهرت نتائج الدراسة التي قام بها Barakat et al. (2007) بأن المثبطات المنتجة من العزلتين *T. hamatum* و *T. harzianum* عند مزجها بنسبة 10 % مع وسط أكار ديكستروز البطاطا (PDA) قد قللت معدل نمو الفطر الممرض *R. solani* المسبب لمرض الذبول لنبات الفاصوليا بنسبة (42 و 78) % على التوالي عند درجة حرارة 25 م° .

كما أوضح كمال الدين (2008) أن معاملة بادرات الطماطة يرشح الفطر *T. harzianum* في التربة الرملية قد وفرت حماية للبادرات من الإصابة بالفطر الممرض *F. oxysporum* و زادت من إنتاج المحصول بنسبة 86.85 % عن معاملة المقارنة ، بينما أظهرت العزلة *T. koningii* Oudem كفاءة عالية بلغت 100 % في مكافحة مرض سقوط بادرات الطماطة المتسبب عن الفطر *R. solani* عند معاملة البذور قبل الزراعة في تجارب البيت الزجاجي (الشعبي وجماعته ، 2007) .

و في دراسة أخرى أجريت لبيان تأثير المركبات الايضية المتطايرة و غير المتطايرة المنتجة من الفطريات *T. viride* و *T. hamatum* و *T. harzianum* و *T. auroviride* و ذكر *T. longibrachiatum* في تثبيط نمو الفطر الممرض *Aspergillus flavus* ، ذكر (2000) Desai et al. أن المركبات الايضية غير المتطايرة أظهرت كفاءة عالية في التثبيط على العكس من المركبات الايضية المتطايرة . و وجد (2007) Abeysinghe أن المعاملة بالفطر *T. harzianum* RU01 أدت إلى تثبيط نمو الفطر *Fusarium solani f. sp. Phaseoli* المسبب لتعفن الجذور لنبات الفاصوليا .

بالإضافة إلى استخدام الفطريات كعوامل سيطرة حيوية ، استخدمت كذلك منتجاتها الايضية مثل إنزيمات الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز و البروتينيز ، وذلك لقابليتها على تثبيط نمو الفطريات

المرضة بواسطة تحطيم المكونات الأساسية لجدرانها الخلوية (الكيتين و بيتا-1-3 كلوكان) (Vieira et al., 2006 ; Cortes et al., 1998) ، حيث يمكن أن تعد منتجات عوامل السيطرة الحيوية بديلاً لبعض المبيدات الكيميائية (خاصة عند فشل هذه المبيدات) لأنها تقدم مستويات مقبولة من السيطرة على الأمراض (Elad, 2000) ، فقد أشار Grosch et al. (2007) إلى أن الإنزيمات المحللة للجدار الخلوي مثل الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز و البروتيز المنتجة من الفطر *Trichoderma* تلعب دوراً في تثبيط نمو الفطر *R. solani* . كما أوضح Tweddell et al. (1994) أن لإنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز المنتجين من الفطر *Stachybotrys elegans* القابلية على تحطيم الغزل الفطري للفطر *R. solani* . ولتقليل نسبة الإصابة بمرض تعفن الجذور و التعفن الأبيض لنبات الفاصوليا المتسبب عن الفطرين *Sclerotinia* و *Sclerotia rolfsii* و *T. viride* على التوالي قام Mohamed et al. (2010) باستخدام الفطر المعرض للأشعة فوق البنفسجية لزيادة قابليته على إنتاج الإنزيمات المحللة مثل الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز .

و وجد Li et al. (2004) أن إنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *Trichothecium roseum* له القابلية على تثبيط نمو الفطريات المتمثلة بـ *Alternaria alternate* و *Fusarium moniliforme* و *Magnaporthe grisea* . كما كان لإنزيم الكايتينيز المنتج من البكتريا *Alcaligenes xylosoxydans* تأثير تثبيطي على نمو الفطرين *Fusarium sp.* و *Rhizoctonia bataticola* بنسبة (74 و 81) % على التوالي (Vaidya et al., 2001) .

# الفصل الثاني

المواد و طرق اثن العمل

*Materials and Methods*

## 2 - المواد و طرائق العمل

### 1-2 المواد والأجهزة المستخدمة :

#### 1-1-2 المواد الكيميائية المستخدمة والشركات المصنعة لها :

الشركة المصنعة	اسم المادة
AFCO / India	الكلوكوز ( $C_6H_{12}O_6$ )
Aldanamaya ,China	خميرة الخبز (Baker's yeast)
BDH	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $NaH_2PO_4$ ) وـ dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) و المركابتوايثانول و كاربونات الصوديوم ( $Na_2CO_3$ ) و هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH)
CARLO ERBA	كبريتات المغنيسيوم المائية ( $MgSO_4.7H_2O$ ) و كلوريد الامونيوم ( $NH_4Cl$ ) و حامض البوريك ( $H_3BO_3$ ) وكبريتات الامونيوم ( $(NH_4)_2SO_4$ ) و كلوريد الفضة (AgCl) و كلوريد الحديد ( $FeCl_2$ ) و كلوريد الزئبق ( $HgCl_2$ ) و كلوريد الكالسيوم ( $CaCl_2$ ) و كلوريد المنغنيز ( $MnCl_2$ ) وـ EDTA ( $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$ )
Fluka-UK	الكابتين ( $C_8H_{13}NO_5$ ) <sub>n</sub> و اللامينارين ( $C_6H_{10}O_5$ ) <sub>n</sub> و سكر -N-اسيتل كلوكوز أمين و مادة بارانيتروفينول (pNP)
Fluka-Switzerland	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $KH_2PO_4$ ) والترس القاعدي (Tris-base)
GFS-chemicals-Germany	حامض الهيدروكلوريك (HCl)
HAZARD-UK	حامض الخليك الثلجي ( $CH_3COOH$ ) و حامض الفسفوريك ( $H_3PO_4$ ) و الايثانول المطلق ( $C_2H_5OH$ ) و الأستون ( $C_3H_6O$ ) و ترترات الصوديوم البوتاسيوم ( $C_4H_4KNaO_6.4H_2O$ )
HIMEDIA / India	أكار ديكستروز البطاطا (PDA) وأكار-أكار (Agar-Agar) وألبومين المصل البقري و مادة p-Nitrophenyl N-acetyl β-D-glucosaminide ( $C_{14}H_{18}N_2O_8$ )
Pharmacia / Sweden	المبادل DEAE-Cellulose
Sd fine-Chem limited / Mumbai	Trichloroacetic acid ( $C_2HC_3O_2$ )
SIGMA-ALDRICH	صبغة الكوماسي الزرقاء (Coomasie Brilliant Blue G-250) وـ 3,5 Dinitrosalicylic acid ( $C_7H_4N_2O_7$ )
THOMAS BAKER	هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) و كلوريد الصوديوم (NaCl)
WINLAB-LIMITED-UK	الكازئين

2-1-2 الأجهزة المستخدمة و الشركات المصنعة لها :

الشركة المصنعة	اسم الجهاز
Sartorius-Germany	ميزان حساس (Sensitive Balance)
Memmert-Germany	فرن كهربائي (Oven)
YX-280B-China	موصدة (Autoclave)
GFL-Germany	جهاز تقطير (Distillater)
Mauritius-Germany	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني (pH-meter)
Fisher Scientific-Germany	حاضنة (Incubator)
Labtech-Korea	حاضنة هزاة (Shaker Incubator)
Tudor-Korea	جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer)
Chromtech- Taiwan	جهاز المطياف الضوئي ذو الأشعة فوق البنفسجية (UV-Visible Spectrophotometer)
Tafesa-Germany	حمام مائي (Water Bath)
Julabo SW23-Germany	حمام مائي هزاز (Reciprocal Shaker Water Bath)
HAAKE -Germany	حمام مائي مبرد بالماء الدائر (Cooling Circulating Water Bath)
Hettich-Germany	جهاز طرد مركزي [6000 دورة/دقيقة] (Centrifuge)
Hettich-Germany	جهاز طرد مركزي مبرد (Cooling Centrifuge)
Labtech-Korea	جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة (Hot-Plate Magnetic Stirrer)
Human-Germany	ماصات دقيقة (Micropipettes)
Motic-Germany	مجهر ضوئي (Microscope)
Marienfeld-Germany	شريحة العد المجهرية (Haemocytometer)
LG-Korea	ثلاجة (Refrigerator)
Jeio-Tech-Korea	هود بايولوجي (Laminar flow cabinet)
Japan	مضخة تفريغ (Vacuum pump)



## 2-2 طرائق العمل :

### 1-2-2 اختيار العزلة الفطرية المناسبة :

تم الحصول على خمس وعشرين عزلة فطرية تعود لأجناس مختلفة من قسم علوم الحياة /كلية العلوم /جامعة كربلاء . واستخدمت هذه العزلات لتحديد أكفأها في إنتاج إنزيمي الكايتينيز (Chitinase) وبيتا 1-3-كلوكانيز ( $\beta$  1-3 glucanase) و هذه العزلات هي :

<i>Rhizopus sp.1</i>	<i>Penicillium sp.5</i>
<i>Rhizopus sp.2</i>	<i>Penicillium restrictum</i>
<i>Rhizopus sp.3</i>	<i>Aspergillus niger 1</i>
<i>Rhizopus sp.4</i>	<i>Aspergillus niger 2</i>
<i>Rhizopus sp.5</i>	<i>Aspergillus ustus</i>
<i>Rhizopus sp.6</i>	<i>Aspergillus sp.1</i>
<i>Rhizopus sp.7</i>	<i>Aspergillus sp.2</i>
<i>Rhizopus sp.8</i>	<i>Aspergillus sp.3</i>
<i>Rhizopus sp.9</i>	<i>Aspergillus sp.4</i>
<i>Penicillium sp.1</i>	<i>Cuninngamella sp.</i>
<i>Penicillium sp.2</i>	<i>Rhizoctonia sp.</i>
<i>Penicillium sp.3</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
<i>Penicillium sp.4</i>	

### 2-2-2 تنشيط العزلات الفطرية :

نشطت العزلات الفطرية على طبق بتري يحتوي على أكار ديكستروز البطاطا (PDA) بدرجة حرارة 28 م° و لمدة (7-10) أيام .

## 3-2-2 تحضير وسط الإنتاج :

استخدم وسط الإنتاج الموصوف من قبل (De La Cruz *et al.* (1995a) مع بعض التحوير لغرلة العزلات الفطرية المستخدمة في هذه الدراسة لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز .

تمثلت عملية تحوير الوسط بإضافة كبريتات المغنيسيوم المائية ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( $KH_2PO_4$ ) إذ تم تحضير الوسط الإنتاجي على النحو الآتي :

استخدمت خميرة الخبز (Bakers' Yeast) بنسبة 1 % كمصدر كربوني وحيد للوسط و أضيف إليها 0.1 % (وزن / حجم) من كل من كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و بعد إتمام عملية الإذابة لهذه المواد عُدّل الرقم الهيدروجيني إلى 5 أعقبه عملية غليان للوسط لمدة ثلاث دقائق و من ثم ترشيحه بوساطة أوراق ترشيح ، وزع بعدها الوسط في دوارق زجاجية سعة 250 مليلتر بواقع 50 مليلتر /دورق وعقم بجهاز الموصدة على درجة حرارة 121 م° لمدة 15 دقيقة ، وبعد انتهاء عملية التعقيم أخرجت الدوارق و بردت إلى درجة حرارة الغرفة لتتهيئتها لعملية التلقيح .

## 4-2-2 تلقيح وسط الإنتاج :

لغرض اختيار العزلة الفطرية الأكفأ في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز تم نقل قرص واحد من كل عزلة فطرية نامية على وسط PDA إلى دورق الوسط الإنتاجي الموصوف سابقاً كلاً على انفراد ( بواقع دورقين لكل عزلة ) وتم الحضانة بالحاظنة الهزازة بسرعة رج 150 دورة /دقيقة و بدرجة حرارة 30 م° لمدة 96 ساعة ، وبعد انتهاء مدة الحضانة تم ترشيح الوسط لفصل الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الفطرية الذي استخدم في تقدير فعالية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز فضلاً عن تقدير البروتين لحساب الفعالية النوعية التي اعتمدت مقياساً لتحديد أفضل إنتاج من الإنزيمين في مراحل الدراسة كلها .

## 5-2-2 تشخيص العزلة الفطرية المنتخبة :

لغرض تشخيص العزلة التي تميزت بأعلى إنتاج من إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز أرسلت العزلة المعنية إلى الأستاذ الدكتور زيدان خليف المعموري كلية العلوم للبنات /جامعة بابل .

## 6-2-2 تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *Trichoderma fertile* AH1 :

تمت دراسة عدد من العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile* AH1 اشتملت هذه العوامل على مدة الحضان و سرعة الرج وتركيز المصدر الكربوني و نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه ودرجة الحرارة و نوع الأملاح المعدنية و تركيزها و حجم اللقاح و الرقم الهيدروجيني الابتدائي لوسط الإنتاج .

### 1- تأثير مدة الحضان :

لحق وسط الإنتاج بقرص واحد من أقراص الفطر *T. fertile* AH1 [ يحتوي القرص الواحد على  $10^6 \times 2.5$  سبور/مل من الوسط ، إذ تم حساب عدد السبورات باستخدام شريحة العد المجهرى (Haemocytometer) ] وتمت متابعة إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر قيد الدراسة لمدة 168 ساعة وذلك بسحب مكررين كل 24 ساعة لتقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين و قياس الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج فضلاً عن تقدير الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتياز حيث حضن الوسط في الحاضنة الهزازة بنفس ظروف غربرة العزلات الفطرية المستخدمة في هذه الدراسة .

## 2- تأثير سرعة الرج :

حضن وسط إنتاج الإنزيمين الموصوف سابقاً و الملقح بسبورات الفطر *T. fertile AH1* لمدة 96 ساعة في حاضنة ساكنة و أخرى هزازة باستخدام سرع رج مختلفة هي (50 و 100 و 125 و 150 و 200) دورة /دقيقة .

## 3- تأثير تركيز المصدر الكربوني :

استخدمت خميرة الخبز كمصدر كربوني لوسط الإنتاج إذ أضيفت بتركيز متدرجة (0.5 و 1 و 1.5 و 2 و 2.5 و 3 و 4)% إلى وسط إنتاج الإنزيمين لمدة 96 ساعة و بسرعة رج 125 دورة /دقيقة .

## 4- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه :

استخدم مصدران نيتروجينيان هما كبريتات و كلوريد الامونيوم و بتركيز متدرجة (0.1 و 0.3 و 0.5)% و تركت إحدى المعاملات بدون إضافة مصدر نيتروجيني لغرض المقارنة ، حيث أذيت هذه المواد في وسط الإنتاج الحاوي على خميرة الخبز بتركيز 1.5 % و حضن الوسط تحت الظروف السابق وصفها .

## 5- تأثير درجة الحرارة :

درس تأثير درجة الحرارة بحضن وسط الإنتاج الملقح بسبورات الفطر *T. fertile AH1* على درجات حرارة (25 و 30 و 35) م° .

## 6- تأثير نوع الأملاح المعدنية و تركيزها :

### أ- نوع الأملاح المعدنية :

درس تأثير كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( الموجودة أصلاً في وسط الإنتاج )، حيث حضر الوسط بوجود كبريتات المغنيسيوم المائية و بعدم وجودها و بوجود فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و بعدم وجودها إضافةً إلى المعاملة الحاوية على كلا الملحيتين و تركت إحدى المعاملات بدون إضافة أملاح معدنية لغرض المقارنة ، و حضن الوسط الإنتاجي الحاوي على خميرة الخبز 1.5 % لمدة 96 ساعة و بدرجة حرارة 30 م° .

### ب- تركيز الأملاح المعدنية :

استخدمت تراكيز متدرجة من كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (0.05 و 0.1 و 0.3 و 0.5) % و ذلك بثنيت تركيز إحدى الأملاح المعدنية و استخدام تراكيز متدرجة للأخرى و تمت إذابتها في وسط الإنتاج الموصوف سابقاً .

## 7- تأثير حجم اللقاح :

لقح وسط إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز بحجوم لقاح مقدارها (0.5 و 1 و 2 و 3 و 4) قرص مأخوذة من مستعمرة الفطر *T. fertile* AH1 والتي تحوي أعداد سبورات ( $10^6 \times 1.25$  و  $10^6 \times 2.5$  و  $10^6 \times 5$  و  $10^6 \times 7.5$  و  $10^7 \times 1$ ) سبور/مل من الوسط على التوالي وذلك لتحديد حجم اللقاح الأمثل لإنتاج الإنزيم .

## 8- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي :

عُدّل الرقم الهيدروجيني لوسط إنتاج الإنزيم إلى (3.5 و 4 و 4.2 و 4.5 و 4.8 و 5 و 5.5) باستخدام 1 مولر هيدروكسيد الصوديوم (NaOH) و حامض الهيدروكلوريك (HCl) و لُقح

الوسط بحجم لقاح مقداره قرص واحد وحضن بدرجة حرارة 30 م° لمدة 96 ساعة و بسرعة رج 125 دورة /دقيقة .

## 7-2-2 تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز :

قدرت فعالية إنزيم الكايتينيز بطريقتين هما :

### أ- تقدير الفعالية الإنزيمية باستخدام الكايتين الغروي كمادة تفاعل :

تم تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. fertile* AH1 تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Yanai et al. (1992) مع بعض التحوير بالاعتماد على كمية سكر N- اسيتل كلوكوز أمين (N-acetylglucosamine ,GlcNAc) المتحررة من تحلل الكايتين الغروي . وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكايتينيز بأنها (كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من سكر N- اسيتل كلوكوز أمين في الدقيقة الواحدة و تحت ظروف التقدير) .

### 1- عمل المنحنى القياسي لسكر N-اسيتل كلوكوز أمين :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - محلول سكر N- اسيتل كلوكوز أمين القياسي (100 مايكروغرام /مل)

حضر بإذابة 0.02 غم من سكر GlcNAc في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 200 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - (0.1) مولر منظم البورات (pH 9.8)

حضر بإذابة 0.62 غم من حامض البوريك في كمية من الماء المقطر و بعد تعديل الـ pH إلى 9.8 باستخدام هيدروكسيد البوتاسيوم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

### محلول رقم (3) - كاشف DMAB

حضر الكاشف بإذابة 8 غم من مادة dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) في المحلول المتكون من (70 مل من حامض الخليك الثلجي و 10 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز) ، يحفظ بدرجة 2 م° باعتباره محلول خزين (stock solution) و عند الاستعمال يخفف بنسبة (10:1) ، حيث يمزج حجم واحد من المحلول الخزين مع تسعة حجوم من حامض الخليك الثلجي .

وتتلخص طريقة عمل المنحنى القياسي على النحو الآتي :

1- أضيفت الحجوم المبينة في الجدول الآتي في أنابيب اختبار و بواقع أنبوبتين لكل حجم  
(duplicate) :

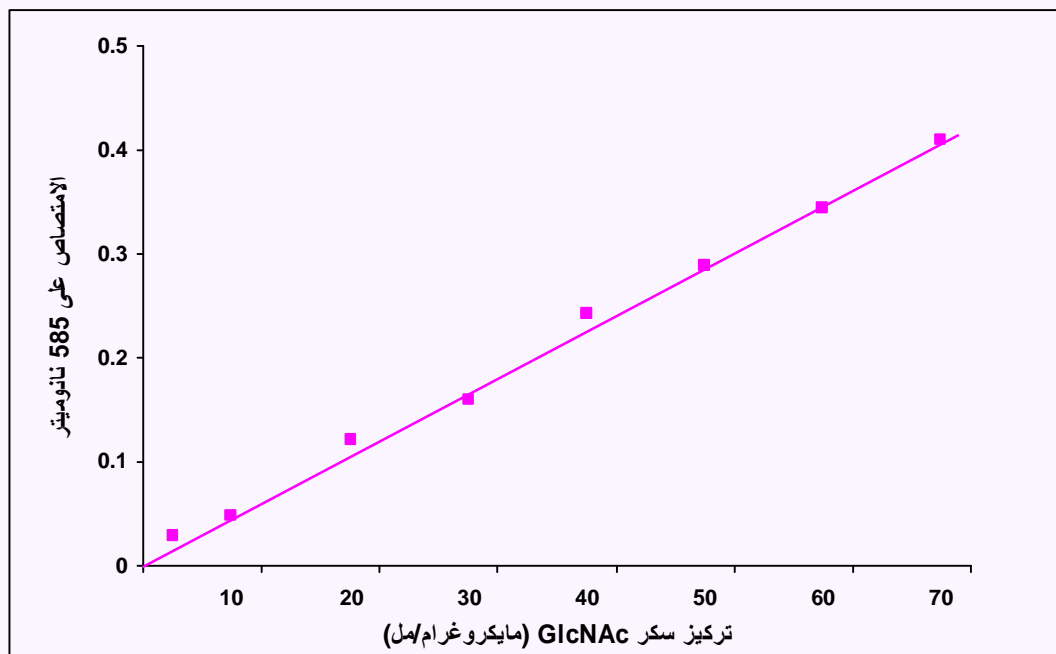
التركيز النهائي (مايكروغرام/مل)	مل من الماء المقطر	مل من محلول رقم (1)	رقم الأنبوب
5	9.5	0.5	1
10	9	1	2
20	8	2	3
30	7	3	4
40	6	4	5
50	5	5	6
60	4	6	7
70	3	7	8

2- أضيف 0.7 مل من محلول رقم (2) إلى 0.3 مل من التراكيز أعلاه و وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة ثلاث دقائق بالضبط ثم بردت في حمام مائي ثلجي .

3- أضيف 2 مل من محلول رقم (3) مع الرج جيداً و وضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 37 م° لمدة عشرين دقيقة .

4- عمل محلول صفري (Blank) باستخدام الماء المقطر الذي أجريت عليه المعاملات السابقة و تمت قراءة الامتصاص على طول موجي 585 نانوميتر بجهاز المطياف الضوئي .

5- رسمت العلاقة بين الامتصاص و تراكيز سكر N- اسيتل كلوكوز أمين ( الشكل 3 ) .



الشكل (3) : المنحنى القياسي لسكر N-اسيتل كلوكوز أمين (GlcNAc) .



## 2- تقدير الفعالية :

### - المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (0.1) مولر منظم فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين (pH 7.0)

حضر بإذابة 1.2 غم من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 7.0 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - (0.1) مولر منظم الخلات (pH 5.0)

حضر بتخفيف 0.58 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر و بعد تعديل الـ pH إلى 5.0 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (3) - محلول مادة التفاعل 1 % كاييتين غروي

حضر الكاييتين الغروي باستخدام الكاييتين النقي (Chitin from Crab Shell) بحسب الطريقة الموصوفة من قبل Li *et al.* (2002) مع بعض التحوير بإضافة 2 غم من الكاييتين إلى 36 مل من حامض الهيدروكلوريك ببطيء شديد عند درجة حرارة الغرفة مع الرج الشديد بوساطة المحرك المغناطيسي لمدة ساعتين ، وضع بعدها المعلق في 200 مل من الكحول الأيثيلي المبرد 95 % مع الرج الشديد لمدة 30 دقيقة وحفظ بالتجميد لحين استعماله .

وعند الاستعمال يؤخذ 10 مل من المعلق السابق و تجرى له عملية طرد مركزي بسرعة 5000 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق ، بعدها يغسل الراسب بـ 10 مل من محلول رقم (1) و يطرد مركزياً لمدة 15 دقيقة و لثلاث مرات إذ يذاب الراسب الناتج من عملية الغسل في 18 مل من محلول رقم (2) ليصبح الكاييتين الغروي جاهزاً لعملية تقدير الفعالية لإنزيم الكاييتينيز .

محلول رقم (4) - (0.1) مولر منظم البورات (pH 9.8)

حضر بالطريقة نفسها الواردة في عمل المنحنى القياسي لسكر GlcNAc .

## محلول رقم (5) - كاشف DMAB

حضر بالطريقة نفسها الواردة في عمل المنحنى القياسي لسكر GlcNAc .

وتم تقدير الفعالية الإنزيمية على درجة حرارة 37 م° كما يأتي :

1- أضيف 0.75 مل من المستخلص الإنزيمي إلى 0.75 مل من محلول رقم (3) في أنابيب

اختبار و حُضِنَت الأنابيب في حمام مائي هزاز لمدة ساعتين .

2- فُصِل محلول المادة الأساس - الإنزيم بالطرد المركزي بسرعة 5000 دورة /دقيقة لمدة

5 دقائق لإيقاف التفاعل .

3- أضيف 0.1 مل من محلول رقم (4) إلى 0.5 مل من الراشح الإنزيمي و وضعت أنابيب

الاختبار في حمام مائي مغلي لمدة ثلاث دقائق بالضبط ثم بردت في حمام مائي ثلجي .

4- أضيفت 3 مل من محلول رقم (5) إلى كل أنبوبة مع الرج جيداً و حُضِنَ المزيج في حمام

مائي هزاز لمدة عشرين دقيقة .

5- عمل محلول صفري (Blank) باستخدام الإنزيم المعامل حرارياً و الذي أجريت له

المعاملات السابقة .

6- تمت قراءة الامتصاص على 585 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي .

ب- تقدير الفعالية الإنزيمية باستخدام مادة التفاعل

:(p-Nitrophenyl N-acetyl  $\beta$ -D-glucosaminide , pNP-GlcNAc)

تم تقدير فعالية إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. fertile* AH1 تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل

Park *et al.* (2000) مع بعض التحوير بالاعتماد على كمية البارانيتروفينول

(p-Nitrophenol, pNP) المتحررة من تحلل مادة pNP-GlcNAc .

وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم الكايتيناز بأنها (كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من مادة pNP في الدقيقة الواحدة تحت ظروف التقدير) .

### 1- عمل المنحنى القياسي لمادة البارانيتروفينول (pNP) :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) -  $(10^{-4} \times 2.5)$  مولر بارانيتروفينول

حضر بإذابة 0.0348 غم من مادة pNP في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر .

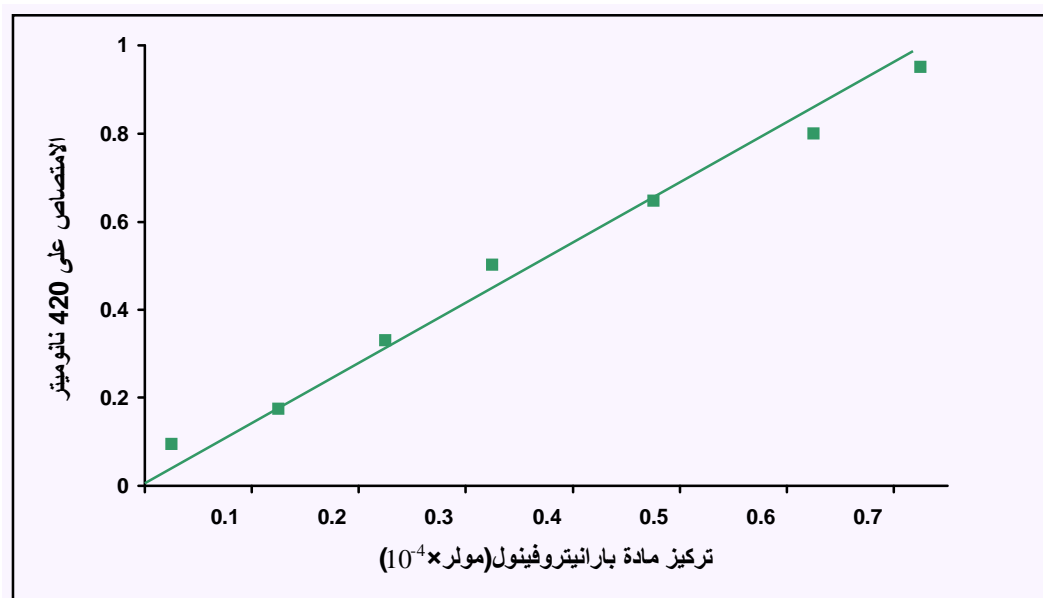
محلول رقم (2) - (0.5) مولر كاربونات الصوديوم

حضر بإذابة 5.299 غم من كاربونات الصوديوم ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

أضيفت الحجوم المبينة في الجدول التالي في أنابيب اختبار و بواقع مكررين لكل حجم (duplicate)

التركيز النهائي للبارانيتروفينول (مولر)	مل من محلول رقم (2)	مل من الماء المقطر	مل من محلول رقم (1)	رقم الأنبوب
0.00 (Blank)	1	4.00	0.00	1
$10^{-4} \times 0.0625$	1	3.875	0.125	2
$10^{-4} \times 0.125$	1	3.75	0.25	3
$10^{-4} \times 0.25$	1	3.50	0.50	4
$10^{-4} \times 0.375$	1	3.25	0.75	5
$10^{-4} \times 0.50$	1	3.00	1.00	6
$10^{-4} \times 0.625$	1	2.75	1.25	7
$10^{-4} \times 0.75$	1	2.50	1.50	8

وتمت قراءة الامتصاص على 420 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي و استحصل المنحنى القياسي للبارانيتروفينول برسم العلاقة بين الامتصاص و تركيز الـ pNP ( الشكل 4 ) .



الشكل (4) : المنحنى القياسي للبارانيتروفينول (pNP) .

2- تقدير الفعالية :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (0.1) مولر منظم الخلات (pH 5.0)

حضر بتخفيف 0.58 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر و بعد تعديل

الـ pH إلى 5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - محلول مادة التفاعل pNP-GlcNAc بتركيز 4 ملي مولر

حضر بإذابة 0.136 غم من مادة pNP-GlcNAc في كمية من محلول رقم (1) وبعد إتمام

الإذابة أكمل الحجم إلى 100 مل بمحلول رقم (1) ذاته .

### محلول رقم (3) - (1) مولر كاربونات الصوديوم

حضر بإذابة 10.59 غم من كاربونات الصوديوم في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

وتم تقدير الفعالية الإنزيمية على درجة حرارة 37 م° كما يلي :

1- أضيف 0.2 مل من المستخلص الإنزيمي إلى 0.2 مل من محلول رقم (2) مع 0.6 مل

من محلول رقم (1) و اجري التفاعل لمدة 30 دقيقة .

2- أوقف التفاعل بإضافة 1 مل من محلول رقم (3) .

3- عمل محلول صفري (Blank) بإضافة 1 مل من محلول رقم (3) إلى 0.2 مل من

محلول رقم (2) مع 0.6 مل من محلول رقم (1) ثم أضيف 0.2 مل من المستخلص

الإنزيمي إلى مزيج التفاعل .

4- تمت قراءة الامتصاص على 420 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي .

### 2-2-8 تقدير فعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز :

تم تقدير فعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile AH1* تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل (Tangarone et al. (1989 مع بعض التحوير وبالاعتماد على كمية سكر الكلوكوز المتحررة من تحلل مادة اللامينارين (Laminarin) .

وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز بأنها (كمية الإنزيم اللازمة لتحرير مايكرومول واحد من سكر الكلوكوز في الدقيقة الواحدة و تحت ظروف التقدير) .

### 1- عمل المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - محلول سكر الكلوكوز القياسي (1 ملغم /مل)

حضر بإذابة 100 ملغم من سكر الكلوكوز في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

### محلول رقم (2) - كاشف (DNSA) 3,5 Dinitrosalicylic acid

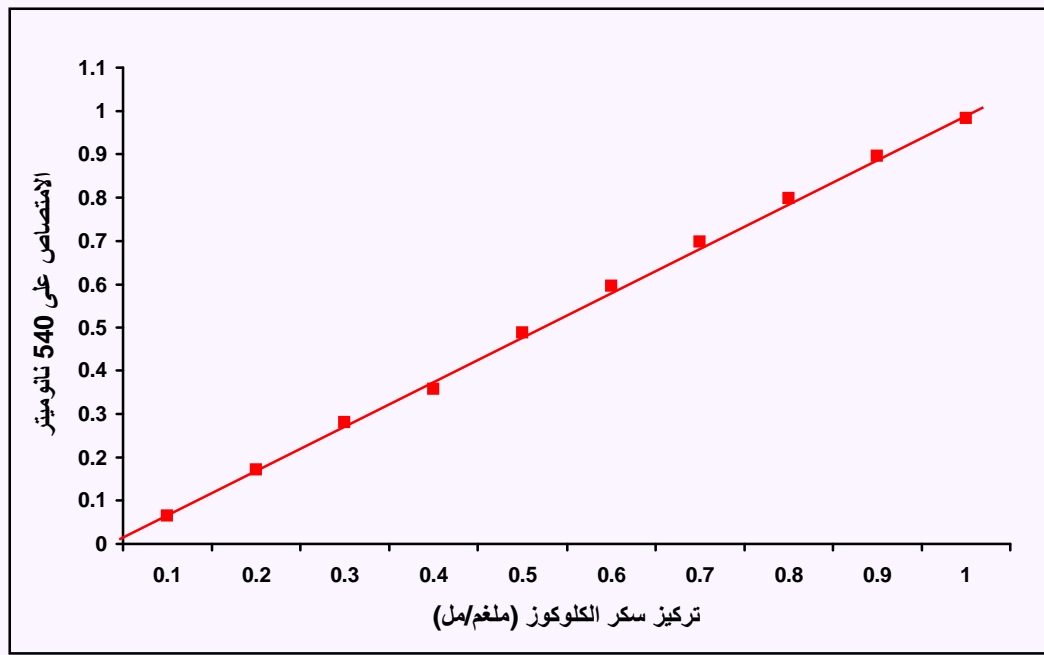
حضر الكاشف بإذابة 1 غم من مادة 3,5 Dinitrosalicylic acid في 50 مل ماء مقطر و بعد الإذابة أضيف 20 مل هيدروكسيد الصوديوم (2 مولر) كما أضيف أيضاً 30 غم من مادة ترترات الصوديوم البوتاسيوم وبعد الإذابة أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

و تتلخص طريقة عمل المنحنى القياسي على النحو الآتي :

1- أضيفت الحجوم المبينة في الجدول التالي في أنابيب اختبار و بواقع مكررين لكل حجم (duplicate)

رقم الأنبوب	مل من محلول رقم (1)	مل من الماء المقطر	التركيز النهائي (ملغم/مل)
1	-	1.0	0.0 (Blank)
2	0.1	0.9	0.1
3	0.2	0.8	0.2
4	0.3	0.7	0.3
5	0.4	0.6	0.4
6	0.5	0.5	0.5
7	0.6	0.4	0.6
8	0.7	0.3	0.7
9	0.8	0.2	0.8
10	0.9	0.1	0.9
11	1.0	-	1.0

- 2- أضيف 1 مل من محلول رقم (2) و وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة خمس دقائق بالضبط ثم بردت في حمام مائي ثلجي .
- 3- أضيفت 5 مل ماء مقطر لكل أنبوبة .
- 4- تمت قراءة الامتصاص على طول موجي 540 نانومتر بجهاز المطياف الضوئي .
- 5- رسمت العلاقة بين الامتصاص و تركيز سكر الكلوكوز ( الشكل 5 ) .



الشكل (5) : المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز

2- تقدير الفعالية :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (0.1) مولر منظم الخلات (pH 4.5)

حضر بتخفيف 0.58 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل

الـ pH إلى 4.5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - محلول مادة التفاعل لامينارين (250 مايكروغرام /مل)

حضر بإذابة 25 ملغم من مادة اللامينارين في كمية من محلول رقم (1) وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 100 مل بمحلول رقم (1) ذاته .

محلول رقم (3) - كاشف 3,5 DNSA

حضر بالطريقة نفسها الواردة في عمل المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز .

وتم تقدير الفعالية الإنزيمية على درجة حرارة 37 م° كما يأتي :

1- أضيف 0.1 مل من المستخلص الإنزيمي إلى 0.9 مل من محلول رقم (2) في أنابيب اختبار و اجري التفاعل لمدة 30 دقيقة .

2- أوقف التفاعل بإضافة 1 مل من محلول رقم (3) .

3- وضعت الأنابيب في حمام مائي مغلي لمدة خمس دقائق بالضبط ثم بردت في حمام مائي ثلجي.

4- أضيفت 5 مل ماء مقطر لكل أنبوبة .

5- عمل محلول صفري (Blank) بإضافة 1 مل من محلول رقم (3) إلى 0.9 مل من محلول رقم (2) ثم أضيف 0.1 مل من المستخلص الإنزيمي إلى مزيج التفاعل .

6- تمت قراءة الامتصاص على 540 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي .

2-2-9 تقدير فعالية إنزيم البروتيز :

تم تقدير فعالية إنزيم البروتيز من الفطر *T. fertile AH1* تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل Joo et al. (2002) مع بعض التحوير .

وتعرف وحدة الفعالية الإنزيمية لإنزيم البروتيز بأنها (كمية الإنزيم التي تسبب زيادة في الامتصاص مقدارها (0.001) على طول موجي 280 نانوميتر وتحت ظروف التقدير) .



- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (0.5) مولر هيدروكسيد الصوديوم

حضر بإذابة 0.2 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد الإذابة أكمل الحجم إلى 10 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - محلول الكازئين الخزين

حضر بإذابة 3 غم من الكازئين في 90 مل من الماء المقطر مع التسخين إلى 90 م° و إضافة 5 مل من محلول رقم (1) ثم أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (3) - (1) مولر منظم الترس (pH 8.5)

حضر بإذابة 12.11 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 8.5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (4) - محلول مادة التفاعل

حضر بمزج حجم واحد من محلول رقم (2) و أربع حجوم من الماء المقطر و حجم واحد من محلول رقم (3) .

محلول رقم (5) - محلول (10%) Trichloroacetic acid (TCA)

حضر بتخفيف 10 مل من TCA في 90 مل من الماء المقطر .

وتم تقدير الفعالية الإنزيمية على درجة حرارة 37 م° كما يأتي :

1- أضيف 0.2 مل من المستخلص الإنزيمي إلى (2) مل من محلول رقم (4) في أنابيب

اختبار و اجري التفاعل لمدة 20 دقيقة .

2- أوقف التفاعل بإضافة 3 مل من محلول رقم (5) بعدها طردت الأنابيب مركزياً بسرعة 5000 دورة /دقيقة لمدة 20 دقيقة .

3- عمل محلول صفري (Blank) بإضافة 3 مل من محلول رقم (5) إلى 2 مل من محلول رقم (4) ثم أضيف 0.2 مل من المستخلص الإنزيمي إلى مزيج التفاعل .

4- تمت قراءة الامتصاص على 280 نانوميتر باستخدام جهاز المطياف الضوئي (UV-visible spectrophotometer) .

## 2-2-10 تقدير البروتين :

تم تقدير البروتين حسب طريقة (Bradford ,1976) باستخدام ألبومين المصل البقري (BSA) كبروتين قياسي .

### - عمل المنحنى القياسي :

المحاليل المستخدمة :

**محلول رقم (1) -** محلول صبغة كوماسي الزرقاء (Coomasie Brilliant Blue G250) أذيب 100 ملغم من صبغة الكوماسي الزرقاء في 50 مل من الكحول الأيثيلي 95 % ، ثم أضيف إلى هذا المحلول 100 مل من حامض الفسفوريك 85 % مع التبريد ، بعدها أكمل الحجم إلى لتر بإضافة الماء المقطر .

**محلول رقم (2) -** محلول ألبومين المصل البقري القياسي (100 مايكروغرام /مل)

حضرت تراكيز متدرجة من ألبومين المصل البقري حسب الجدول الآتي :

المحلول الخزين (مايكروليتر)	الماء المقطر (مايكروليتر)	الحجم الكلي (مايكروليتر)	تركيز البروتين (مايكروغرام)
100	900	1000	10
300	700	1000	30
500	500	1000	50
700	300	1000	70
900	100	1000	90
1000	0.0	1000	100

أضيفت 2.5 مل من محلول رقم (1) إلى 500 مايكروليتر من كل تركيز ، ثم مزج الخليط بصورة جيدة و ترك لمدة خمس دقائق بعدها تمت قراءة الامتصاص (لكل تركيز مكررين) على طول موجي 595 نانوميتر ، بعد أن صفر جهاز المطياف بمحلول صفر (Blank) الذي يتكون من 0.5 مل منظم الخلات (pH 5.0) و 2.5 مل من محلول رقم (1) .

استحصل المنحنى القياسي برسم العلاقة بين الامتصاص عند الطول الموجي 595 نانوميتر مقابل تركيز ألبومين المصل البقري ( الشكل 6 ) .

## 2-2-11 تنقية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز :

بعد تثبيت الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile* AH1 ، حضر وسط الإنتاج المكوّن من خميرة الخبز بتركيز 1.5 % و 0.1 % لكل من كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و بعد إذابة هذه المكونات عدل الرقم الهيدروجيني إلى 4 و عقم بالموصدة ثم لقع بحجم لقاح مقداره قرص واحد حاوي على (2.5×10<sup>6</sup> سبور/مل) وحضن في الحاضنة الهزازة على درجة حرارة 30 م° بسرعة رج 125 دورة/ دقيقة لمدة 96 ساعة ، بعدها فصلت الكتلة الحيوية عن راشح المزرعة الحاوي على الإنزيمين و ذلك للحصول على الإنزيمين بشكل رائق .

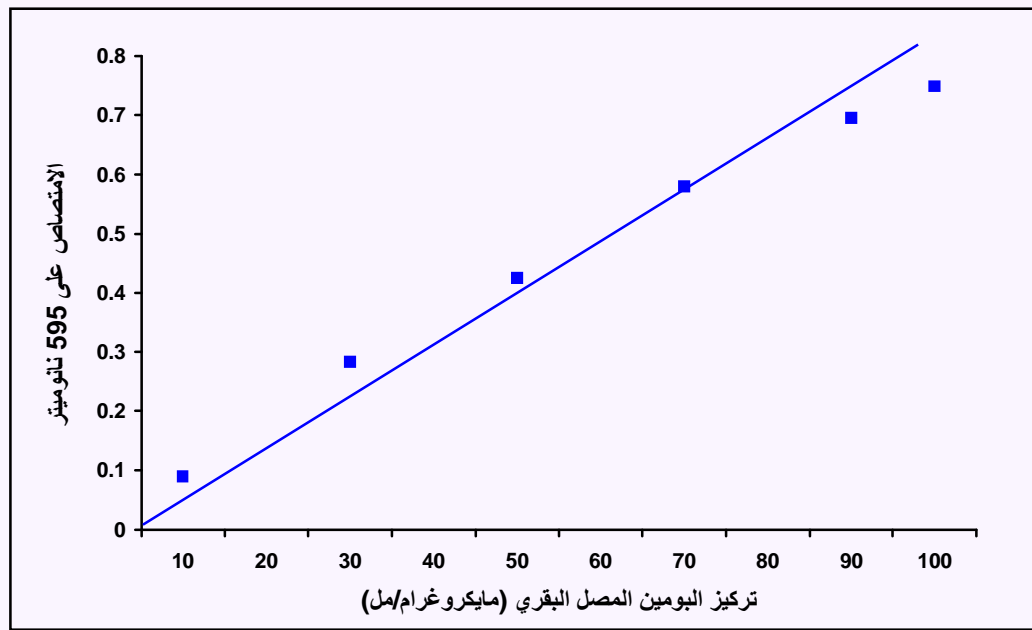
وجرت جميع مراحل التنقية تحت ظروف مبردة بحسب الخطوات الآتية :

## 1- الديليزة :

- محلول (0.005) مولر منظم الفوسفات (pH 6.5)

حضر بإذابة 0.68 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 6.5 أكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر .

و قد أجريت عملية الديليزة باستخدام أكياس الديليزة حيال محلول 0.005 مولر منظم الفوسفات بإبداله ثلاث مرات خلال 6 ساعات و بعد انتهاء العملية تم تقدير الفعالية الإنزيمية لكلا الإنزيمين فضلاً عن تقدير البروتين .



الشكل (6) : المنحنى القياسي للبروتين بطريقة برادفورد .

## 2- الترسيب بالايثانول بنسبة (20-70) % :

أجريت عملية الترسيب للمستخلص الإنزيمي المديلز في الخطوة السابقة بوساطة الايثانول المبرد بنسبة 20 % ثم طرد مركزياً باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 8000 دورة

/دقيقة لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4 م° بعدها اخذ الراشح و أجريت له عملية ترسيب أخرى  
بوساطة الايثانول المبرد بنسبة 70 % و طرد مركزياً بالظروف السابقة نفسها ، ثم أذيب الراسب  
في 16 مل من محلول منظم الفوسفات (pH 6.5) وقدرت الفعالية الإنزيمية لكلا الإنزيمين إضافة  
إلى تقدير البروتين .

### 3- التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose :

- المحاليل المستخدمة :

**محلول رقم (1) - (0.25) مولر هيدروكسيد الصوديوم - (0.25) مولر كلوريد الصوديوم**  
حضر بإذابة 2.5 غم من هيدروكسيد الصوديوم و 3.625 غم من كلوريد الصوديوم في كمية  
من الماء المقطر وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 250 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (2) - (0.25) مولر محلول حامض الهيدروكلوريك**  
حضر بتخفيف 5.38 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز في كمية من الماء المقطر ثم  
أكمل الحجم إلى 250 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (3) - (0.005) مولر منظم الفوسفات (pH 6.5)**  
حضر بذات الطريقة الواردة في خطوة الديلزة .

**محلول رقم (4) - (0.6) مولر كلوريد الصوديوم**  
حضر بإذابة 17.55 غم من كلوريد الصوديوم في كمية من محلول رقم (3) ثم أكمل الحجم  
إلى 500 مل بالمحلول رقم (3) ذاته .

## - إعداد العمود :

حضر المبادل الأيوني DEAE-Cellulose بحسب الطريقة الموصوفة من قبل Whitaker (1972) و ذلك بإتباع الخطوات التالية :

1- خلط 20 غم من المبادل الأيوني مع 1 لتر من الماء المقطر و ترك ليبرد و أزيل السائل العلوي و كررت هذه الخطوة مرات عدة لحين أصبح السائل العلوي رائقاً و من ثم ترشيحه على قمع بخنر .

2- نشط المبادل بإضافة 250 مل من محلول رقم (1) لمدة 30 دقيقة و غسل في قمع بخنر بالماء المقطر ، بعدها أضيف 250 مل من محلول رقم (2) ولمدة 30 دقيقة و غسل بالماء المقطر أيضاً .

3- علق المبادل في محلول رقم (3) و عبئ المبادل في عمود زجاجي بأبعاد (21×1.8) سم و أجريت له الموازنة باستخدام المحلول رقم (3) حتى اليوم التالي بسرعة جريان مقدارها 1 مل / دقيقة .

## - إضافة النموذج :

أضيف 16 مل من النموذج المتحصل عليه من خطوة الترسيب بالايثانول 70 % إلى سطح المبادل الأيوني بهدوء و جمعت الأجزاء المنفصلة بواقع 3 مل لكل جزء و بسرعة جريان ثابتة 1 مل /دقيقة . وتمت متابعة تركيز البروتين في الأجزاء المنفصلة (والتي لم ترتبط بالمبادل الأيوني) وذلك بمتابعة الامتصاص لكل جزء من هذه الأجزاء عند طول موجي 280 نانوميتر لحين التأكد من نزول جميع الأجزاء التي لم ترتبط بالمبادل . و قدرت الفعالية الإنزيمية لكل من إنزيمي الكايتينيز وبيتا-3 كلوكانيز في القم البروتينية المنفصلة ثم قدرت الفعالية الإنزيمية في الأجزاء التابعة للقمة التي أظهرت فعالية إنزيمية ، ثم جمعت هذه الأجزاء و تم قياس حجمها و قدرت فيها الفعالية لكلا الإنزيمين فضلاً عن تقدير البروتين .

ورسمت العلاقة بين الامتصاص وعدد الأجزاء وكذلك العلاقة بين الفعالية الإنزيمية (وحدة/مل) وعدد الأجزاء .

- استرداد الإنزيم :

أجريت عملية الاسترداد باستخدام 200 مل من محلول رقم (4) مقابل 200 مل من محلول رقم (3) وتم متابعة تركيز البروتين للأجزاء المنفصلة (بعد إجراء الاسترداد) عند نفس الطول الموجي السابق .

وقد قدرت الفعالية الإنزيمية لكلا الإنزيمين في القمم البروتينية المنفصلة ثم قدرت الفعالية الإنزيمية في الأجزاء التابعة للقمم التي أظهرت فعالية إنزيمية ، ثم جمعت الأجزاء التابعة لهذه القمم وتم قياس حجمها و قدرت فيها الفعالية لكلا الإنزيمين فضلاً عن تقدير البروتين . ورسمت العلاقة بين الامتصاص وعدد الأجزاء وكذلك العلاقة بين الفعالية الإنزيمية (وحدة/مل) وعدد الأجزاء .

## 2-2-12 توصيف إنزيمي الكايتينيز وبيتا 1-3 كلوكانيز :

1- تقدير الثوابت الحركية :

قدرت قيم ثابت ميكالس ( $K_m$ ) و السرعة القصوى ( $V_{max}$ ) بوساطة المنحنى المقلوب (Reciprocal plot) لتركيز مادة التفاعل مقابل السرعة الأولية تبعاً لطريقة Lineweaver & Burk (1934) .

أ- تقدير الثوابت الحركية لصورتي إنزيم الكايتينيز (A و B) :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (0.1) مولر منظم الخلات (pH 5.0)

حضر بتخفيف 0.58 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

**محلولة رقم (2) - محلولة مادة التفاعل (10 ملي مولر) pNP-GlcNAc**

حضر بإذابة 0.068 غم من مادة pNP-GlcNAc في كمية من محلولة رقم (1) وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 20 مل بالمحلولة رقم (1) ذاته . إذ عدّ المحلولة رقم (2) محلولة خزين وتم عمل تخافيف منه وكما هو موضح بالجدول الآتي :

التركيز النهائي (ملي مولر)	الحجم النهائي (مل)	مل من محلولة منظم الخلات	مل من محلولة 10 ملي مولر pNP-GlcNAc
0.1	10	9.9	0.1
0.5	10	9.5	0.5
1.0	10	9.0	1.0
2.5	10	7.5	2.5
5.0	10	5.0	5.0
10.0	10	-	10.0

وتم تقدير الفعالية الإنزيمية لكلتا صورتَي الإنزيم باستخدام محاليل مادة التفاعل أعلاه ، واستحصلت قيم  $K_m$  و  $V_{max}$  باستخدام المنحنى المقلوب لتركيز مادة التفاعل مقابل السرعة الأولية .

ب- تقدير الثوابت الحركية لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز :

- المحاليل المستخدمة :

محلولة رقم (1) - (0.1) مولر منظم الخلات (pH 4.5)



حضر بتخفيف 0.58 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 4.5 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (2) - محلول مادة التفاعل (500 مايكروغرام / مل) لامينارين**

حضر بإذابة 0.015 غم من اللامينارين في كمية من محلول رقم (1) وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 30 مل بالمحلول رقم (1) ذاته . إذ عدّ المحلول رقم (2) محلول خزين وتم عمل تخافيف منه وكما هو موضح بالجدول الآتي :

التركيز النهائي (مايكروغرام / مل)	الحجم النهائي (مل)	مل من محلول منظم الخلايا	مل من محلول اللامينارين 500 مايكروغرام/مل
25	10	9.5	0.5
50	10	9	1
100	10	8	2
150	10	7	3
250	10	5	5
400	10	2	8
500	10	-	10

وتم تقدير الفعالية الإنزيمية باستخدام محاليل مادة التفاعل أعلاه ، و استحصلت قيم  $K_m$  و  $V_{max}$  باستخدام المنحنى المقلوب لتركيز مادة التفاعل مقابل السرعة الأولية .

2- تقدير الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز :

أ- تقدير الـ pH الأمثل لفعالية صورتي إنزيم الكايتينيز (A و B) :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (0.1) مولر منظم الخلات بمدى pH من (4.0-6.0)

حضر بتخفيف 0.145 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل

الـ pH إلى الرقم الهيدروجيني المطلوب أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (2) - (0.1) مولر منظم الفوسفات بمدى pH من (6.5-7.5)

حضر بإذابة 0.34 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر

وبعد تعديل الـ pH إلى الرقم الهيدروجيني المطلوب أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

محلول رقم (3) - محلول مادة التفاعل (4 ملي مولر) pNP-GlcNAc

حضر بإذابة 0.034 غم من مادة pNP-GlcNAc في 25 مل من المحاليل المنظمة

المحضرة سابقاً بمدى الأرقام الهيدروجينية (4-7.5) .

- طريقة التقدير :

قدرت الفعالية لصورتي إنزيم الكايتينيز (A و B) في كل محلول من محاليل مادة التفاعل

المحضرة في الخطوة السابقة بالأسلوب نفسه المتبع في تقدير الفعالية الإنزيمية و رسمت العلاقة

بين الـ pH و الفعالية الإنزيمية لتحديد الـ pH الأمثل للفعالية .

ب- تقدير الـ pH الأمثل لفعالية إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز :

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1) - (0.1) مولر منظم الخلات بمدى pH من (4.0-6.0)  
حضر بالطريقة نفسها الواردة في تقدير الـ pH الأمثل لإنزيم الكايتينيز .

محلول رقم (2) - (0.1) مولر منظم الفوسفات بمدى pH من (6.5-7.5)  
حضر بالطريقة نفسها الواردة في تقدير الـ pH الأمثل لإنزيم الكايتينيز .

محلول رقم (3) - محلول مادة التفاعل (250 مايكروغرام /مل) لامينارين  
حضر بإذابة 0.006 غم من مادة اللامينارين في 25 مل من المحاليل المنظمة المحضرة  
سابقاً بمدى الأرقام الهيدروجينية (4-7.5) .

- طريقة التقدير :

قدرت الفعالية لإنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز في كل محلول من محاليل مادة التفاعل المحضرة في  
الخطوة السابقة بالأسلوب نفسه المتبع في تقدير الفعالية الإنزيمية و رسمت العلاقة بين الـ pH و  
الفعالية الإنزيمية لتحديد الـ pH الأمثل للفعالية .

3- تقدير الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيمي الكايتينيز و بيتا 1-3 كلوكانيز :

حضرت محاليل منظمة ذات قوة أيونية واحدة 0.2 مولر على مدى قيم pH بين (2.0-9.0)  
وعلى النحو الآتي :

**محلول رقم (1) - منظم الفوسفات (pH 2.0)**

حضر بتخفيف 0.35 مل من حامض الفسفوريك في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.05 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 2 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (2) - منظم الفوسفات (pH 2.5)**

حضر بتخفيف 0.35 مل من حامض الفسفوريك في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.02 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 2.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (3) - منظم الفوسفات (pH 3.0)**

حضر بتخفيف 0.35 مل من حامض الفسفوريك في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.006 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 3 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (4) - منظم الفوسفات (pH 3.5)**

حضر بتخفيف 0.35 مل من حامض الفسفوريك في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.002 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 3.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (5) - منظم الخلّات (pH 4.0)**

حضر بتخفيف 0.29 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.249 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 4 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (6) - منظم الخلات (pH 4.5)**

حضر بتخفيف 0.29 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.189 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 4.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (7) - منظم الخلات (pH 5.0)**

حضر بتخفيف 0.29 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.107 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (8) - منظم الخلات (pH 5.5)**

حضر بتخفيف 0.29 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.045 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 5.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (9) - منظم الخلات (pH 6.0)**

حضر بتخفيف 0.29 مل من حامض الخليك الثلجي في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.016 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 6 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (10) - منظم الفوسفات (pH 6.5)**

حضر بإذابة 0.68 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.109 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 6.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (11) - منظم الفوسفات (pH 7.0)**

حضر بإذابة 0.68 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.066 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 7 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (12) - منظم الفوسفات (pH 7.5)**

حضر بإذابة 0.68 غم من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر وبعد تعديل الـ pH إلى 7.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (13) - منظم الترس (pH 8.0)**

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.13 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 8 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (14) - منظم الترس (pH 8.5)**

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.223 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 8.5 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

**محلول رقم (15) - منظم الترس (pH 9.0)**

حضر بإذابة 0.61 غم من الترس (Tris-base) في كمية من الماء المقطر وعدلت القوة الأيونية بإضافة 0.259 غم من كلوريد الصوديوم . وبعد تعديل الـ pH إلى 9 أكمل الحجم إلى 25 مل بالماء المقطر .

#### - طريقة التقدير :

حضن 2 مل من كل صورة من صورتي إنزيم الكايتينيز إضافة إلى إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز (كلاً على انفراد) مع 2 مل من كل من المحاليل المنظمة [ محلول رقم (1) ولغاية محلول رقم (15) ] في أنابيب اختبار في حمام مائي على درجة حرارة 37 م° ولمدة 30 دقيقة ثم بردت الأنابيب في حمام مائي ثلجي وقدرت فعالية صورتي إنزيم الكايتينيز فضلاً عن فعالية إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز المتبقية في كل نموذج بالأسلوب نفسه الذي سبق وصفه في تقدير الفعالية الإنزيمية ورسمت العلاقة بين النسبة المئوية للفعالية المتبقية و الـ pH لتحديد الـ pH الأمثل لثبات الإنزيمين .

#### 4- تقدير الثبات الحراري لإنزيمي الكايتينيز وبيتا 1-3 كلوكانيز :

حضن 2 مل من كل صورة من صورتي إنزيم الكايتينيز إضافة إلى إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز (كلاً على انفراد) في حمام مائي على درجات حرارة (20 و 25 و 30 و 35 و 40 و 45 و 50 و 55 و 60 و 65 و 70) م° لمدة 30 دقيقة . وبردت الأنابيب في حمام مائي ثلجي مباشرة ثم قدرت الفعالية الإنزيمية المتبقية .

#### 5- تأثير بعض الأيونات المعدنية والمواد الكيميائية في إنزيمي الكايتينيز وبيتا 1-3 كلوكانيز :

حضرت محاليل كلوريدات الفلزات والمواد الكيميائية بتركيز 10 ملي مولر كمحلول خزين كالآتي :

#### محلول رقم (1) - محلول كلوريد المنغنيز

حضر بإذابة 0.063 غم من كلوريد المنغنيز ( $MnCl_2$ ) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

**محلول رقم (2) - محلول كلوريد الزئبق**

حضر بإذابة 0.135 غم من كلوريد الزئبق ( $HgCl_2$ ) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

**محلول رقم (3) - محلول كلوريد النيكل**

حضر بإذابة 0.065 غم من كلوريد النيكل ( $NiCl_2$ ) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

**محلول رقم (4) - محلول كلوريد الفضة**

حضر بإذابة 0.071 غم من كلوريد الفضة ( $AgCl$ ) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

**محلول رقم (5) - محلول كلوريد الكالسيوم**

حضر بإذابة 0.055 غم من كلوريد الكالسيوم ( $CaCl_2$ ) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

**محلول رقم (6) - محلول كلوريد الحديد**

حضر بإذابة 0.063 غم من كلوريد الحديد ( $FeCl_2$ ) في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

**محلول رقم (7) - محلول (Ethylene Diamine Tetra acetic acid , EDTA)**

حضر بإذابة 0.186 غم من مادة EDTA في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .



## محلول رقم (8) - محلول المركابتوايثانول

حضر بتخفيف 0.035 مل من المركابتوايثانول في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

## محلول رقم (9) - محلول حامض البوريك

حضر بإذابة 0.031 غم من حامض البوريك في كمية من الماء الخالي من الأيونات وبعد إتمام الإذابة أكمل الحجم إلى 50 مل بهذا الماء .

## - طريقة التقدير :

مزج محلول صورتي إنزيم الكايتينيز وإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز (كلاً على انفراد) مع حجم مماثل لكل من المحاليل آنفة الذكر للحصول على تركيز 5 ملي مولر لكل محلول ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م° لمدة 10 دقائق ، أعقبها تقدير الفعالية الإنزيمية فضلاً عن تقدير الفعالية الإنزيمية للسيطرة (المحلول الإنزيمي دون معاملة بأي من محاليل كلوريدات الفلزات والمواد الكيميائية) وذلك لتحديد نسبة الفعالية المتبقية . وللحصول على تركيز 1 ملي مولر للمحاليل آنفة الذكر ، أضيف 0.1 مل من كل محلول من المحاليل ذات التركيز 10 ملي مولر إلى 0.4 مل من الماء الخالي من الأيونات فأصبح الحجم 0.5 مل الذي مزج مع 0.5 مل من المحلول الإنزيمي لكلتا صورتَي إنزيم الكايتينيز وإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز (كلاً على انفراد) وتم الحضان وقياس الفعالية الإنزيمية كما هو الحال عند استخدام التركيز 5 ملي مولر السابق وصفه .

## 13-2-2 السيطرة الحيوية (Biological Control) :

- تأثير الراشح الإنزيمي الخام للفطر *T. fertile AH1* في نمو الفطريات الممرضة :

تم الحصول على أربع عزلات فطرية ممرضة للنبات من قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة كربلاء تعود لأجناس مختلفة وهي :

*Aspergillus flavus* و *Rhizoctonia solani* و *F. oxysporum* و *Fusarium solani*

نشطت هذه العزلات على وسط PDA بدرجة حرارة 28 م° لمدة (7-10) أيام .

ولغرض بيان تأثير إنزيمات الفطر *T. fertile* AH1 في نمو الفطريات الممرضة استخدم الراشح الإنزيمي الخام بعد تعقيمه خلال مرشح دقيق بقطر 0.22 ملليمتر بتركيز مختلفة [ 1:1 و 3:1 و 9:1 (إنزيم : وسط PDA) ] .

أضيف 10 مل من الإنزيم إلى 10 مل من وسط PDA (بنسبة أكار 4 %) و 5 مل من الإنزيم إلى 15 مل من الوسط (بنسبة أكار 3 %) و 2 مل من الإنزيم إلى 18 مل من الوسط (بنسبة أكار 2.5 %) قبل تصلب الوسط للحصول على تراكيز 1:1 و 3:1 و 9:1 على التوالي ، بعدها لقت الأوساط المتصلبة بقرص الفطر الممرض وبواقع مكررين لكل معاملة إضافة إلى معاملة السيطرة للفطر الممرض (بدون إضافة الإنزيم للوسط) وحضنت على درجة حرارة 20 م° لمدة 72 ساعة (Haggag, 2002) . ثم سجل معدل قطر مستعمرة الفطر بعد فترة الحضانة المذكورة واستخرجت نسبة التثبيط اعتماداً على المعادلة الآتية (Wang et al., 2006) :

قطر فطر السيطرة - قطر فطر المعاملة

$$100 \times \frac{\text{قطر فطر السيطرة} - \text{قطر فطر المعاملة}}{\text{قطر فطر السيطرة}} = \text{نسبة التثبيط (\%)}$$

قطر فطر السيطرة

# الفصل الثالث

## النتائج و المناقشة

## *Results and Discussion*

### 3 - النتائج و المناقشة

#### 1-3 اختيار العزلة الفطرية المناسبة :

تمت غربلة 25 عزلة فطرية عائدة لأجناس مختلفة لإختبار قابليتها في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا1-3 كلوكانيز الخارج خلويين (extracellular) وتمت تنمية هذه العزلات على وسط خميرة الخبز المدعم بالأملاح المعدنية وتحت ظروف نمو محددة . وقد اقتصرت عملية الغربلة على الإنزيمات الخارج خلوية نظراً لكون عملية فصل هذه الإنزيمات من أوساط النمو تمتاز بسهولة فضلًا عن كونها غير مكلفة (Vyas & Dixit , 2009) .

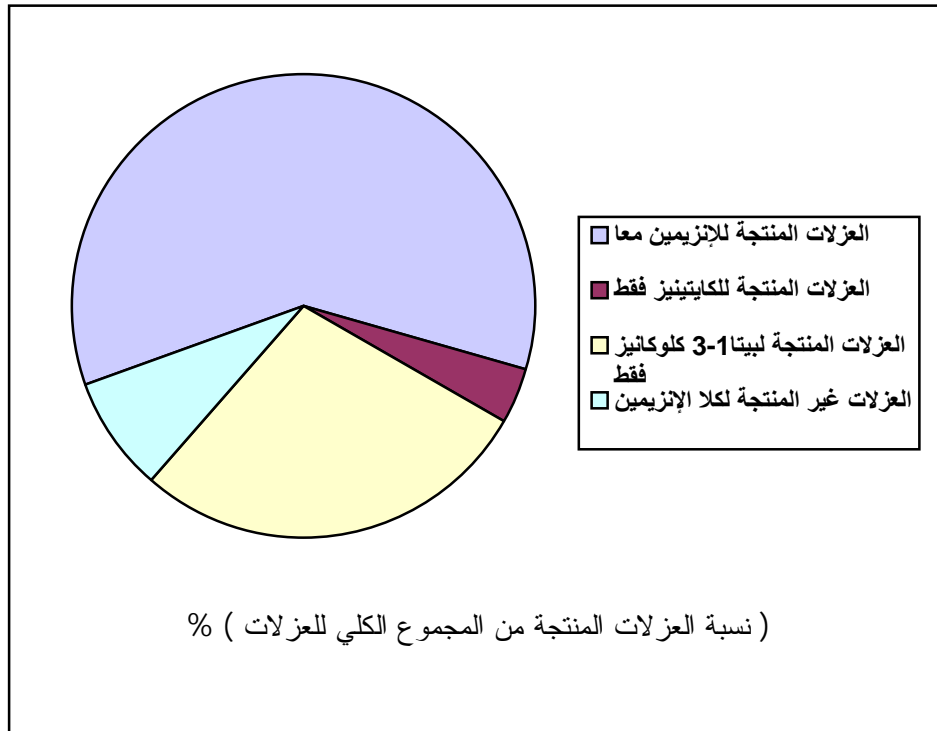
أظهرت النتائج المبينة في جدول (3) أن لبعض العزلات الفطرية القابلية على إنتاج الإنزيمين معاً ولكن بدرجات متفاوتة ، بينما اقتصر بعضها على إنتاج إنزيم واحد فقط ، في حين عجزت بعض العزلات عن إنتاج أي من الإنزيمين . ويظهر من الشكل (7) أن 60 % من العزلات تنتج الإنزيمين بينما 4 % من العزلات تنتج فقط إنزيم الكايتينيز بدون إنزيم بيتا1-3 كلوكانيز ، و 28 % تنتج فقط إنزيم بيتا1-3 كلوكانيز بدون إنزيم الكايتينيز ، أما العزلات غير المنتجة لكلا الإنزيمين فتمثل ما نسبته 8 % من المجموع الكلي لهذه العزلات .

وعند مقارنة قيم الفعالية النوعية يلاحظ أن الفعالية النوعية لإنزيمي الكايتينيز وبيتا1-3 كلوكانيز المنتجين من العزلة *Trichoderma sp.* كانت هي الأعلى ، إذ بلغت (93.70 و 6.26) وحدة / ملغم بروتين على التوالي ، بينما كانت أوطأ فعالية نوعية لإنزيم الكايتينيز المنتج من العزلة *Rhizopus sp.4* والتي بلغت 1.31 وحدة / ملغم بروتين وإنزيم بيتا1-3 كلوكانيز المنتج من العزلة *Penicillium sp.3* والتي بلغت 0.077 وحدة / ملغم بروتين .

وفي ضوء هذه النتائج اختيرت العزلة *Trichoderma sp.* كمصدر لإنتاج الإنزيمين كونها أكفأ العزلات المستخدمة .

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

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



الشكل (7) : غريلة العزلات الفطرية لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز .

تتفق نتائج هذه الدراسة ما ورد في دراسات سابقة ، إذ أوضح (Matroudi et al. 2009) أن بعض الأنواع العائدة لجنس *Trichoderma* المتمثلة بـ 8- *T. harzianum* و *T. atroviride* PTCC5220 و *T. longibrachiatum* PTCC5140 اختيرت لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من بين 30 عزلة فطرية . كما وجد El-Katatny et al. (2000) أن العزلة *T. harzianum* هي الأكثر إنتاجاً للإنزيمات من بين 24 عزلة فطرية . يعد الوسط المستخدم في عملية الغريلة هذه مناسباً لتحديد قابلية العزلات الفطرية على إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز . إن اختيار وسط التخمر عامل مهم في خفض كلفة الإنتاج والإسراع في نمو الكائن المجهرى و زيادة إنتاجه و تحسين نوعيته ، و يجب أن يحتوي هذا الوسط

على مصدر طاقة و كاربون و نيتروجين و بعض منشطات النمو كالفيتامينات و أحماض أمينية ، ولكن ليس بالضرورة أن يكون الوسط الجيد للنمو هو جيد لإنتاج الإنزيم ( الحيدري والمصلح ، 1989 ).

إن الحصول على الصفات المرغوبة للإنزيمات خاصة فيما يتعلق بثباتيتها و فعاليتها يتطلب برامج غربلة خاصة إلا انه يجب أن لا يغفل دور بعض العوامل المؤثرة في عملية الغربلة و التي تتضمن طريقة زرع الكائن المجهرى في مرحلة الإنتاج الصناعي (ينطبق ذلك على الفطريات) فعند استخدام تقنية المزارع العميقة يجب أن تكون هناك عملية انتخاب مناسبة للسلاطات في مرحلة مبكرة و يجب أن يؤخذ بنظر الاعتبار أن المزارع العميقة تختلف عن المزارع المهواة إذ أن الأخيرة تسمح بعملية انتخاب مبدئية لذا يجب أن تتبعها عملية انتخاب أخرى بالمزارع العميقة (Boing,2004) .

لم تقتصر عملية غربلة العزلات الفطرية على استخدام المزارع السائلة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز، بل اشتملت على استخدام تخمرات الحالة الصلبة ، فقد استخدمت التقنية الأخيرة في غربلة عشر عزلات فطرية لإنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز و أظهرت تلك الدراسة إن العزلة Tpo9 *T. viride* هي الأكفأ من بينها (Yi et al. , 2008) . واختيرت السلالة *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 من بين 14 سلالة عائدة للجنس نفسه لكونها الأفضل في إنتاج إنزيم الكايتينيز الخارج خلوي (extracellular chitinase) باستخدام تخمرات الحالة الصلبة أيضاً (Binod et al. , 2005) .

أما في البكتريا ، فقد تركزت الدراسات على غربلة العزلات لتحديد الأفضل منها في إنتاج إنزيم الكايتينيز ، فقد تم اختيار السلالة *Vibrio sp.* 98CJ 11027 بعد غربلة 38 عزلة بكتيرية منتجة للإنزيم (Park et al. , 2000) . كما تميزت 18 عزلة من بين 98 عزلة بكتيرية في قابليتها على إنتاج إنزيم الكايتينيز أيضاً واختيرت منها العزلة *Massilia timonae* لإنتاج الإنزيم في الدراسة التي أجراها (Faramarzi et al. (2009) ، بينما استخدم (Zarei et al. (2010)

البكتريا *Serratia marcescens* B4A لكونها أكفاً العزلات المستخدمة في إنتاج الإنزيم بعد  
غربة ثلاث وعشرين عزلة بكتيرية .

وفي عملية غربة واسعة شملت أكثر من 300 عزلة من البكتريا الخيطية  
(Actinomycetes) أسفرت عملية الغربة المذكورة عن اختيار العزلة *Streptomyces*  
*aureofaciens* CMUAc 130 لإنتاج إنزيم الكايتينيز (Taechowisan et al. , 2003) .  
إن قابلية الأحياء المجهرية لإنتاج الإنزيمات الخارجية تتباين تبعاً لاختلاف سلالات تلك  
الأحياء المجهرية في النوع الواحد وفي الأنواع المختلفة (الدليمي ، 2002) .

### 3-2 تشخيص العزلة المنتخبة :

بعد إرسال العزلة المنتخبة إلى كلية العلوم للنبات /جامعة بابل لغرض تشخيصها من قبل  
الأستاذ الدكتور زيدان خليف المعموري، فقد تبين أن العزلة المنتخبة هي *Trichoderma fertile*  
وقد أعطيت الرمز AH1 لتصبح *Trichoderma fertile* AH1 ، وعلى الرغم من كون جنس  
الـ *Trichoderma* معروف باستخدامه في السيطرة الحيوية إلا أنه لم نجد أي دراسة سابقة تشير  
إلى أن النوع *T. fertile* يستخدم في هذا النوع من السيطرة .

### 3-3 تحديد الظروف المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر : *Trichoderma fertile* AH1

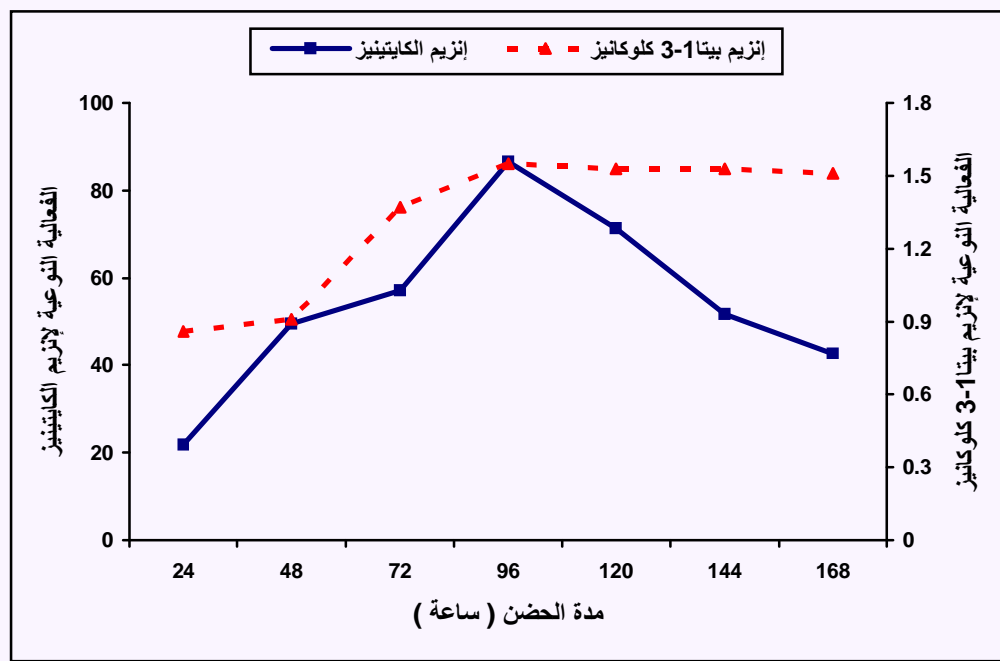
#### 1- تأثير مدة الحضان :

تم متابعة إنتاج الإنزيمين من الفطر *T. fertile* AH1 خلال سبعة أيام من التخمر وذلك  
بسحب كمية من وسط التخمر يومياً لتقدير الفعالية الإنزيمية والبروتين ، كما تمت متابعة تغيرات  
الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر فضلاً عن متابعة إنتاج إنزيم البروتينيز خلال المدة المذكورة من  
التخمر .



يتضح من الشكل (8) أن إنتاج الإنزيمين يبدأ بعد 24 ساعة من التخمير بفعالية نوعية 21.79 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز و 0.86 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز ليصل إلى أقصاه بعد 96 ساعة من التخمير بفعالية نوعية (86.49 و 1.55) وحدة /ملغم بروتين لإنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز على التوالي .

وتتفق النتيجة المستحصلة من هذه الدراسة مع ما ورد في بعض الدراسات ، إذ أن إنتاج الإنزيمات المحللة للكايتين في الفطريات الخيطية يبدأ بعد فترة (20-40) ساعة خلال طور النمو اللوغاريتمي (Matsumoto et al. , 2004 ; Fenice et al. , 1998 ; Nuero , 1995) . كما يبدأ إنتاج إنزيمات الكايتينيز من الفطر *Verticillium lecanii* والفطر *Penicillium sp.* وكذلك بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* بعد 24 ساعة (de Marco & Felix , 2007 ; Lee et al. , 2009 ; Fenice et al. , 1998) .



الشكل (8) : تأثير مدة الحضانة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر

*T. fertile AH1*

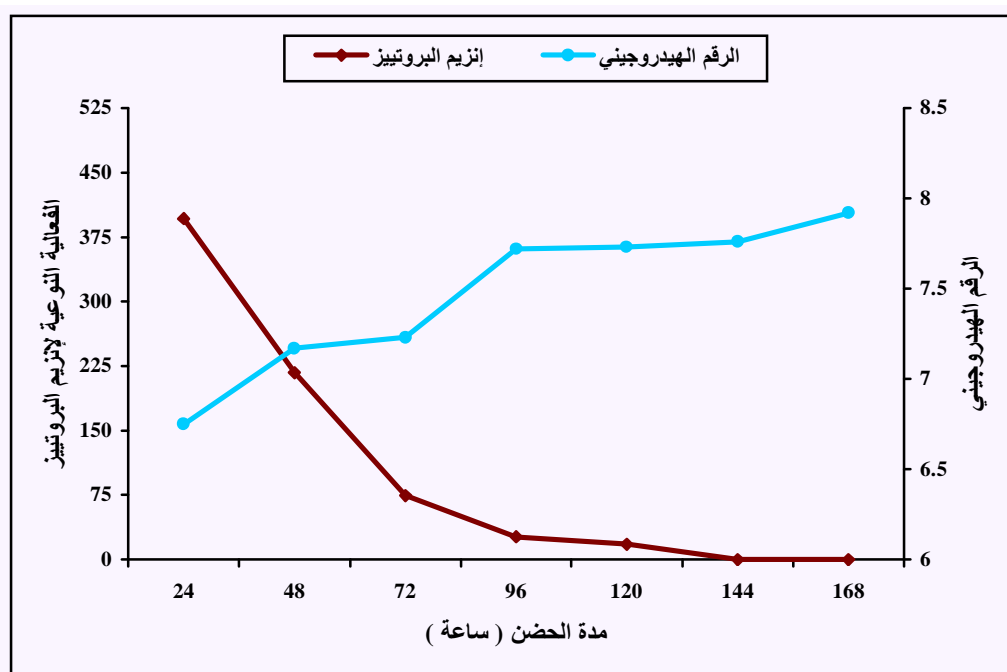
وبعد مدة الحضانة المثالية يبدأ إنتاج الإنزيمين بالانخفاض تدريجياً إذ تصل الفعالية النوعية في اليوم السابع إلى (42.76 و 1.51) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز على التوالي .

إن الانخفاض في إنتاج الإنزيمين بعد مدة الحضانة المثالية قد يعزى إلى انخفاض مستوى المواد المغذية في الوسط بما ينعكس على مستوى تخليق الإنزيم فضلاً عن احتمال مسخ الإنزيمين بواسطة إنزيم البروتيز المنتج من الفطر نفسه (Binod , 2007) .

وفي ضوء هذه النتائج فقد تم تثبيت مدة حضانة قدرها 96 ساعة لأفضل إنتاج من الإنزيمين وتم استخدامها في التجارب كافة، وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره كل من (Ghanem et al. (2010) و (Wang et al. (2010) و (Shanmugaiah et al. (2008) من أن مدة حضانة 96 ساعة هي الأفضل للحصول على أقصى إنتاج من إنزيم الكايتينيز من الفطر *Aspergillus terreus* والبكتريا *Pseudomonas sp. TKU008* والبكتريا *Bacillus laterosporous MML2270* على التوالي . كما ذكر (Sandhya et al. (2004) أيضاً أن 96 ساعة هي أفضل مدة حضانة لإنتاج إنزيم الكايتينيز الخارج خلوي (extracellular Chitinase) من الفطر *T. harzianum* TUBF966 . وكانت مدة حضانة مقدارها 4 أيام هي المثلى أيضاً لإنتاج إنزيم الكايتينيز الداخلي (endochitinase) من الفطر *Colletotrichum gloeosporioides* (Souza et al. ,2003) . كما استخدمت مدة الحضانة المذكورة لإنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. viride* TP09 (Yi et al. ,2008) ، بينما كانت مدة حضانة مقدارها 72 ساعة هي الأفضل لإنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* 1051 (De Marco et al. ,2003) وإنزيم الكايتينيز الداخلي (endochitinase) من البكتريا *Paenibacillus chitinolyticus* JK2 (Al-Ahmadi et al. ,2008a) ، في حين أشار الجراح (1994) و (Sharaf (2005) إلى أن مدة الحضانة اللازمة لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Serratia marcescens* والفطر *Alternaria alternate* على التوالي كانت 7 أيام . وأوضح (Leelasuphakul et al. (2006)

و (2009) Budiarti *et al.* أن مدة حضن مقدارها 5 أيام هي المثلى لإنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من البكتريا *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 و الفطر *T. reesei* على التوالي .

يلاحظ من الشكل (9) أن الرقم الهيدروجيني لوسط التخمر يبدأ بالارتفاع بعد 24 ساعة من التخمر ليصبح 6.75 ثم يستمر بالارتفاع ليصل إلى 7.72 بعد 96 ساعة حيث يصل إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز إلى أقصاه ، و بلغ أقصى ارتفاع لهذا الرقم 7.92 في اليوم السابع من التخمر . وتتفق هذه النتيجة مع ما أشارت إليه بعض الدراسات إذ لوحظ ارتفاع الرقم الهيدروجيني من 7 إلى 8.5 في وسط إنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Serratia marcescens* GG5 (Singh *et al.*, 2008) . كما لوحظ ارتفاع هذا الرقم من 7 إلى 9.2 في وسط إنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Sphingomonas sp.* CJ-5 (Zhu *et al.*, 2007) .



الشكل (9) : تأثير مدة الحضن في إنتاج إنزيم البروتياز من الفطر *T. fertile* AH1

يمكن تفسير ارتفاع الرقم الهيدروجيني خلال مدة التخمر في هذه الدراسة إلى وجود خميرة الخبز في وسط التخمر التي يمكن أن تكون مصدراً نيتروجينياً عضوياً لنمو الفطر *T. fertile* AH1 ، حيث انه في حالة استخدام الكائنات المجهرية الحية للمركبات الأمينية العضوية لغرض النمو فإن ذلك يؤدي إلى ارتفاع في الرقم الهيدروجيني بسبب أن هذه المركبات ستفقد مجموعة الأمين (الحيدري و المصلح، 1989) . فضلاً عن ذلك تستعمل المصادر النيتروجينية العضوية مصدراً للنيتروجين من قبل الكائنات المجهرية القادرة على تحليل هذه المركبات إلى أمونيا (صالح، 1991) مما يؤدي إلى ارتفاع الرقم الهيدروجيني .

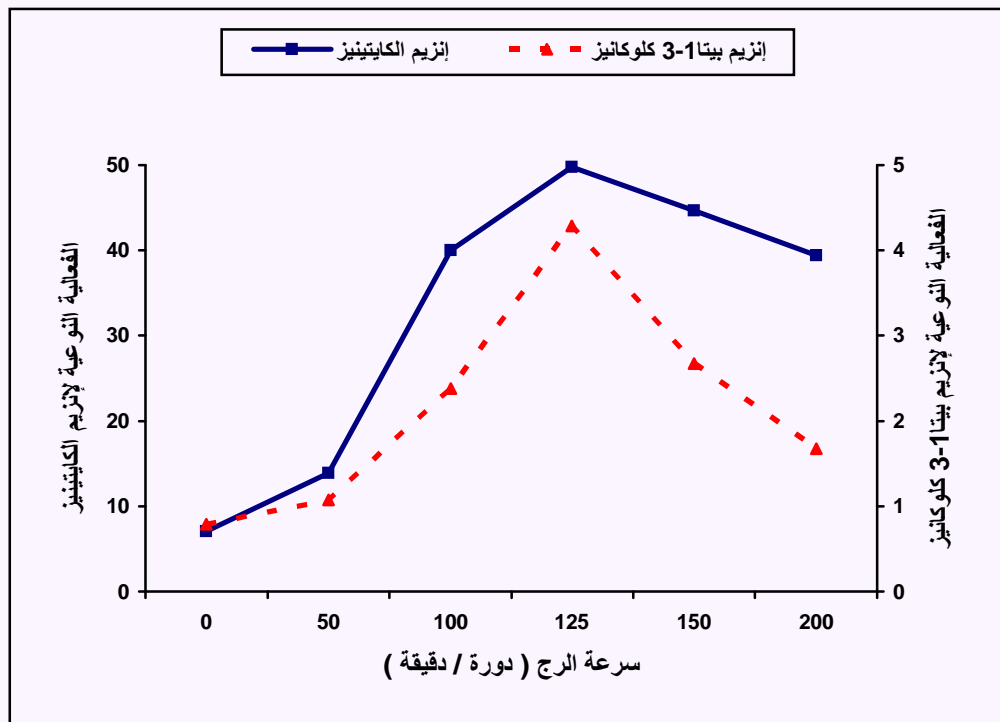
وبالرجوع إلى الشكل (9) مرة أخرى يلاحظ أن أعلى مستوى لإنتاج إنزيم البروتياز من الفطر *T. fertile* AH1 كان بعد 24 ساعة من التخمر إذ بلغت الفعالية النوعية 396.5 وحدة /ملغم بروتين وانخفض مستواه بإزدياد مدة الحضانة . إن هذه النتائج تتفق مع ما ذكرته عبيد (2006) من أن أعلى إنتاج لإنزيم البروتياز من الفطر *T. harzianum* Rifai كان بعد 24 ساعة من الحضانة بعد تنمية الفطر في وسط حاوي على الغزل الفطري الطري و الجاف للفطر *Rhizoctonia solani* كمصدر وحيد للكربون . كما وجد Ferracini-Santos & Sato (2009) و Kalaiarasi & Sunitha (2009) أيضاً أن مدة حضانة مقدارها 24 ساعة هي المثلى لإنتاج إنزيم البروتياز القاعدي (alkaline protease) من البكتريا *Cellulosimicrobium cellulans* و البكتريا *Pseudomonas fluorescens* على التوالي .

## 2- تأثير سرعة الرج :

لقد وُجد أن إنتاج إنزيم الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز بسبورات الفطر *T. fertile* AH1 ثم حضانة تحت ظرفين مختلفين أحدهما ساكن و الآخر متحرك باستخدام الحاضنة الهزازة بسرعة رج (50 و 100 و 125 و 150 و 200) دورة /دقيقة . و يتضح من الشكل (10) أن إنتاج الإنزيمين يكون أعلى عند استخدام الحاضنة الهزازة و بسرعة رج 125 دورة /دقيقة إذ بلغت الفعالية النوعية (4.28 و 49.74) وحدة /ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز على التوالي ، بينما

كانت أوطاً فعالية نوعية باستخدام الحاضنة الساكنة إذ بلغت 7.12 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز و 0.79 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز .

إن استخدام الحاضنة الهزازة في إنتاج الإنزيمات بواسطة الأحياء المجهرية الهوائية كالأعفان يسمح بالاستغلال الأمثل لمكونات البيئة فضلاً عن تكوين طبقة رقيقة نسبياً من البيئة المهواة بواسطة الانتشار خلال سطح السائل عن طريق الحركة الرحوية للرج ، وبذلك يسمح الرج أو التحريك بمزج و تجانس مكونات البيئة بشكل جيد و كفوء بحيث يستطيع الفطر من النمو في اتزان بين الإمداد من الهواء في الأعلى والإمداد من المواد المغذية في الأسفل . ( Stanbury & Whitaker , 1984 ; Casida ,1968 ; Rhodes & Fletcher ,1966 ) .



الشكل (10) : تأثير سرعة الرج في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر

*T. fertile AH1*

كما يلاحظ من الشكل (10) أيضاً أن الفعالية النوعية للإنزيمين انخفضت بزيادة سرعة الرج إذ بلغت 39.39 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز و 1.68 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز عند سرعة رج 200 دورة /دقيقة . إن السرعة العالية من الرج لا تؤدي إلى زيادة في فعالية الإنزيمين و ربما يعزى ذلك إلى القوة الميكانيكية الكبيرة التي تؤدي إلى تكسر الغزل الفطري (Wang et al. , 2005) . و في ضوء هذه النتيجة اختيرت الحاضنة الهزازة بسرعة رج 125 دورة /دقيقة لإنتاج الإنزيمين من الفطر *T. fertile* AH1 و اعتمدت في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها . و تعد النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة مماثلة لما ذكره Pedraza-Reyes & Lopez-Romero (1989) و Abd-Aziz et al. (2008) من استخدام سرعة رج مقدارها 120 دورة /دقيقة لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Mucor rouxii* و الفطر *T. virens* UKM1 على التوالي . كما ذكر Celestino et al. (2006) في دراسة لإنتاج إنزيم بيتا-كلوكانيز من الفطر *Rhizopus microsporus var microsporus* أن سرعة الرج المستخدمة هي 120 دورة /دقيقة . وتم إنتاج كلا الإنزيمين من الفطر *Stachybotrys elegans* باستخدام الحاضنة الهزازة بسرعة رج 110 دورة /دقيقة (Tweddell et al. , 1994) ، في حين كانت سرعة الرج 150 دورة /دقيقة هي المثلى لإنتاج كلا الإنزيمين من الفطر *T. harzianum* (El-Katatny et al. , 2000) .

وفي دراسة قام بها Wasli et al. (2006) كانت سرعة الرج المثلى لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. virens* هي 250 دورة/دقيقة باستخدام المخمر .

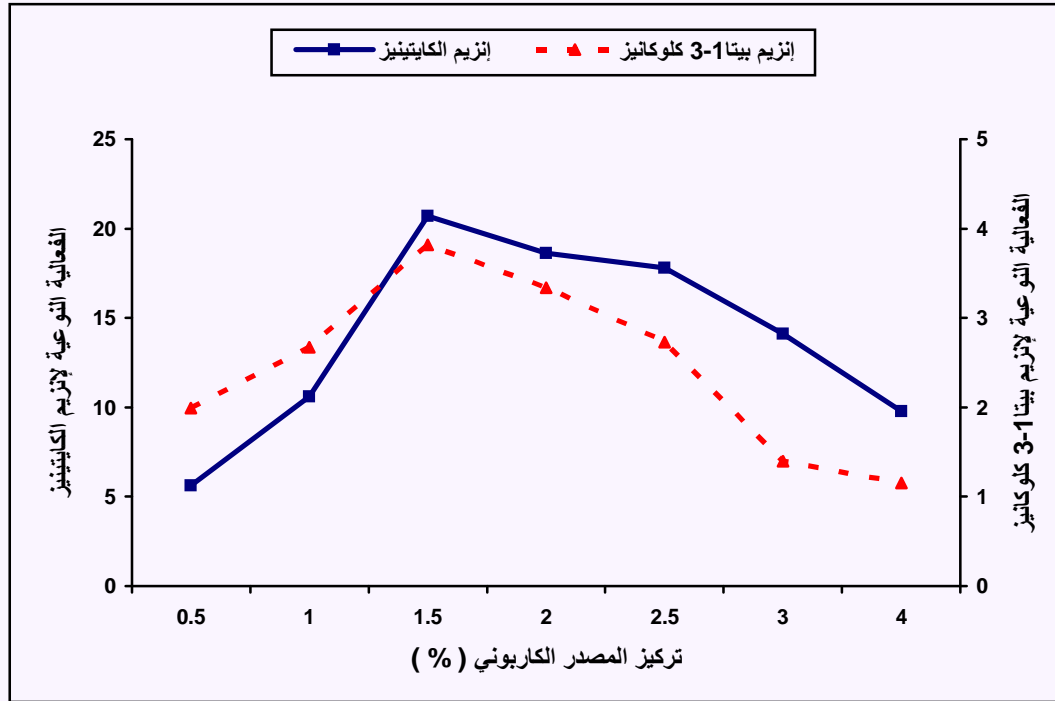
أما في البكتريا فقد أشار (Lilley & Bull , 1974) إلى استخدام سرعة رج 200 دورة /دقيقة لإنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من البكتريا *Streptomyces* sp. 17 . كما كانت سرعة الرج 200 دورة /دقيقة أيضاً هي المثلى لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Cellulosimicrobium cellulans* 191 (Fleuri et al. , 2009) .

### 3- تأثير تركيز المصدر الكربوني :

تم استخدام خميرة الخبز كمصدر كربوني لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile AH1* ، إذ تم استخدامها بتركيز متدرجة (0.5 و 1 و 1.5 و 2 و 2.5 و 3 و 4) % ، وأظهرت النتائج الموضحة في الشكل (11) أن أفضل تركيز لخميرة الخبز لإنتاج الإنزيمين المذكورين هو 1.5 % إذ أعطى إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز أعلى فعالية نوعية عند هذا التركيز والتي بلغت (20.69 و 3.82) وحدة /ملغم بروتين على التوالي ، وقد بلغت الفعالية النوعية لإنزيم الكايتينيز (3.74 و 1.98 و 1.11 و 1.16 و 1.47 و 2.12) مرة ولإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز (1.92 و 1.43 و 1.14 و 1.39 و 2.73 و 3.32) مرة بقدر الفعالية النوعية المتحصلة من استخدام التراكيز (0.5 و 1 و 2 و 2.5 و 3 و 4) % على التوالي. واعتماداً على هذه النتائج تم استخدام خميرة الخبز بتركيز 1.5 % لإنتاج كلا الإنزيمين في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها.

اتضح من إحدى الدراسات أن جدار خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* يمثل حوالي 30 % من الوزن الجاف للخلية ، علماً أن هذا الجدار يتكون بشكل رئيس من ~85 % سكريات متعددة و ~15 % بروتين (Nguyen et al., 1998) ، كما أوضح التحليل الكيموحيوي أيضاً أن ثمالات الكلوكوز و N-اسيتل كلوكوز أمين و المانوز تشكل [ (80-90) و (1-2) و (15-20) ] % من مكونات الجدار على التوالي (Lesage & Bussey, 2006) ، لذا فإن ثمالات كل من الكلوكوز و N-اسيتل كلوكوز أمين المكونة للكلوكان (glucan) و كذلك الكايتين (chitin) يمكن أن تعمل كمادة حاثّة لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile AH1* المستخدم في هذه الدراسة .

وتنتج معظم الإنزيمات التي لها تطبيقات على المستوى الصناعي بوجود مواد محفزة و تكون هذه المواد عادة المادة الأساسية التي تعمل عليها الإنزيمات ، ولتركيز هذه المواد اثر كبير على عملية الإنتاج (الحيدري و المصلح ، 1989) .



الشكل (11) : تأثير تركيز المصدر الكربوني في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3-كلوكانيز من الفطر

#### *T. fertile AH1*

لقد أشارت الدراسات إلى استخدام مصادر كربونية مختلفة لإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3-كلوكانيز ، فقد كان الكايتين بتركيز 1 % هو التركيز الأمثل لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. harzianum* (Saad & Nawar, 2001) و البكتريا *Serratia marcescens* B4A (Zarei et al., 2010) . وأوضح Sandhya et al. (2004) في دراسة لتحديد تركيز الكايتين الغروي الأمثل كمصدر كربوني لإنتاج إنزيم الكايتينيز الخارج خلوي (Extracellular) من الفطر *T. harzianum* TUBF966 أن 1.5 % هو أفضل تركيز لإنتاج الإنزيم . أما التركيز الأمثل للكايتين الغروي لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Bacillus laterosporous* MML2270 و البكتريا *Massilia timonae* فهو (0.3 و 1) % على التوالي (Shanmugaiah et al., 2008) و (Faramarzi et al., 2009) على التوالي أيضاً. و كان

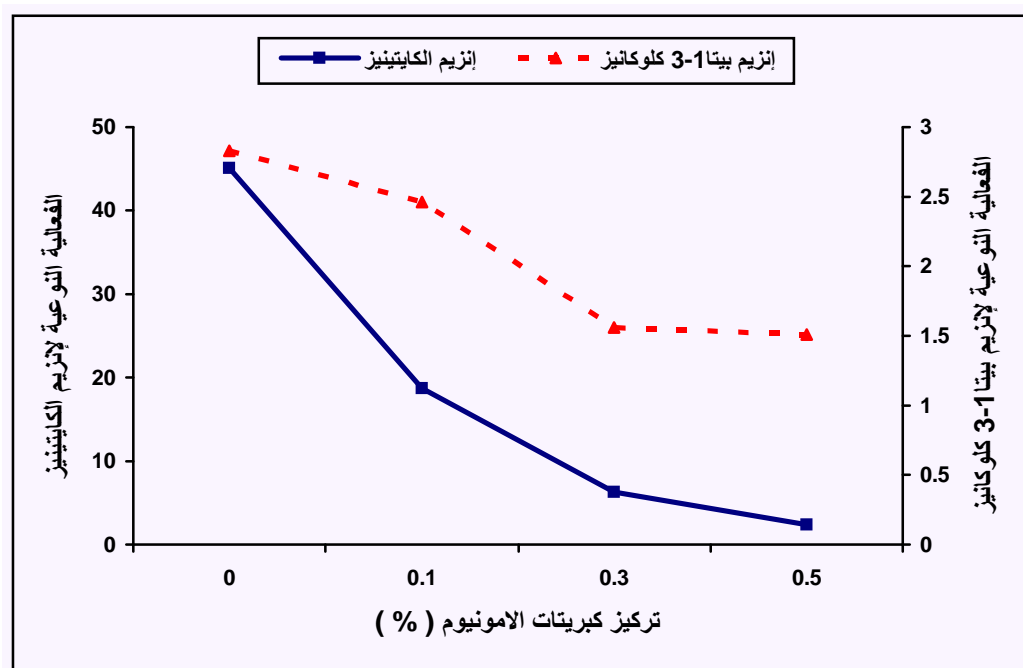


أعلى إنتاج لإنزيم الكايتينيز من البكتريا *Streptomyces sp.* ANU6277 بإضافة النشا بتركيز 0.2 % إضافة إلى الكايتين 1 % (Narayana & Vijayalakshmi , 2009) ، بينما كان الجدار الخلوي للفطر *Pythium sp.* أفضل مصدر كاربوني لإنتاج إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* بفعالية إنزيمية مقدارها 10.8 وحدة / مل (Noronha et al. ,2000) .  
واستخدم الكايتين بتركيز 0.3 % لإنتاج الإنزيم نفسه من البكتريا *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 (Leelasuphakul et al. ,2006) .

#### 4- تأثير نوع المصدر النيتروجيني و تركيزه :

تم دراسة تأثير نوع و تركيز المصدر النيتروجيني في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile AH1* ، فقد استخدم مصدران نيتروجينيان هما كبريتات و كلوريد الامونيوم بتراكيز مختلفة (0.1 و 0.3 و 0.5) % ، إضافة إلى المعاملة الخالية من المصدر النيتروجيني للمقارنة ، وكان السبب في اختيار هذين المصدرين كونهما مصادر رخيصة ومتوافرة.  
يتضح من الشكلين (12) و (13) أن هناك تأثيراً تثبيطياً للمصادر النيتروجينية في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile AH1* مقارنة بالمعاملة الخالية من المصدر النيتروجيني . كما يلاحظ أيضاً انخفاض الفعالية النوعية للإنزيمين بزيادة تركيز المصدرين النيتروجينيين المستخدمين في الدراسة ، إذ بلغت الفعالية النوعية لإنزيم الكايتينيز المنتج باستخدام المعاملة الخالية من المصدر النيتروجيني (2.42 و 7.21 و 18.88) مرة و (3.49 و 9.44 و 13.97) مرة بقدر الفعالية النوعية للإنزيم المنتج باستخدام التراكيز (0.1 و 0.3 و 0.5) % من كبريتات و كلوريد الامونيوم على التوالي . كما بلغت الفعالية النوعية لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنتج باستخدام المعاملة الخالية من المصدر النيتروجيني (1.15 و 1.18 و 1.87) مرة و (1.35 و 1.65 و 1.74) مرة بقدر الفعالية النوعية للإنزيم المنتج باستخدام التراكيز (0.1 و 0.3 و 0.5) % من كبريتات و كلوريد الامونيوم على التوالي .

و يمكن تفسير هذه النتيجة بأن الوسط المستخدم لإنتاج الإنزيمين يحوي على خميرة الخبز التي تمثل مصدراً نيتروجينياً عضوياً تزود الفطر بالحوامض العضوية ، وأن الأحياء المجهرية تفضل المصادر النيتروجينية العضوية على المصادر غير العضوية ( مثل كبريتات و كلوريد الامونيوم المستخدمتين في هذه الدراسة ) إذ أن ذلك يجعل الخلايا في غنى عن العديد من مسارات التخليق التي تصرف فيها كميات كبيرة من الطاقة ، فضلاً عن احتمال حصول تداخل في عمليات دخول الأحماض الأمينية وأيون الامونيوم لاشتراكهم بنفس أنظمة النقل (الخفاجي، 1990).



الشكل (12) : تأثير تركيز كبريتات الامونيوم في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر

*T. fertile AH1*



(2009) لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Streptomyces sp. ANU6277* ، لوحظ أن المصادر النيتروجينية اللاعضوية لا تؤدي إلى زيادة فعالية الإنزيم على عكس المصادر النيتروجينية العضوية مثل مستخلص الخميرة 0.4 % التي أدت إلى زيادة فعاليته .

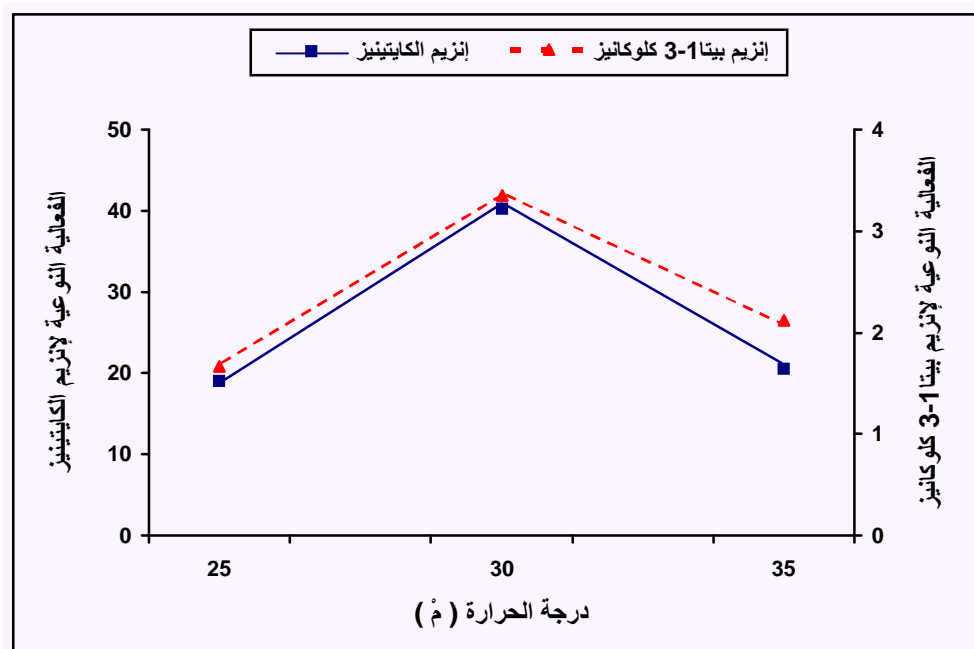
#### 5- تأثير درجة الحرارة :

درس تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile AH1* . ويتضح من الشكل (14) أن أعلى فعالية نوعية للإنزيمين كانت باستخدام الدرجة الحرارية 30 م° ، إذ بلغت 40.27 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز و 3.35 وحدة / ملغم بروتين لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز ، في حين انخفضت الفعالية النوعية للإنزيمين باستخدام الدرجتين الحراريتين (25 و 35) م° . و في ضوء هذه النتائج فقد تم اختيار الدرجة الحرارية 30 م° كأفضل درجة حرارة لإنتاج الإنزيمين و اعتمدت في التجارب اللاحقة كافة .

تعد درجة الحرارة عاملاً مؤثراً لمعظم الفعاليات الحيوية فهي تؤثر في مختلف النشاطات الإنزيمية في الخلية (السعد ، 1991) ، كما أن المدى الحراري الأمثل يؤدي إلى حدوث سرعة ونشاط إنزيمي أفضل (المفرجي، 1991) .

إن النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة تؤيد ما ورد في العديد من الدراسات فقد وجد (2000) *El-Katatny et al.* أن درجة الحرارة 30 م° هي المثلى لإنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* . كما ذكر (2005) *Sharaf* و (2008b) *Al-Ahmadi et al.* و (2010) *Wang et al.* أن الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *Alternaria alternate* و البكتريا *Aeromonas sp. JK1* و البكتريا *Pseudomonas sp. TKU008* على التوالي هي 30 م° . و استخدمت درجة الحرارة المذكورة في إنتاج إنزيم بيتا-كلوكانيز من الفطر *T. viride TPO9* (Yi et al., 2008) و إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. virens* (Abd-Aziz et al., 2008) ، بينما استخدم *Harman et al.* (1993) درجة حرارة مقدارها 25 م° لإنتاج الإنزيمات المحللة للكايتين

(chitobiosidase and endochitinase) من الفطر *T. harzianum* . و في دراسة قام بها Celestino *et al.* (2006) استخدمت درجة الحرارة 40 م° لإنتاج إنزيم بيتا-كلوكانيز من الفطر *Rhizopus microsporus var microsporus* ، في حين كانت الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. harzianum* Rifai النامي في وسط حاوي على الغزل الفطري الجاف للفطر *R. solani* هي 20 م° (عبيد ، 2006) .



الشكل (14) : تأثير درجة الحرارة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3-كلوكانيز من الفطر

*T. fertile* AH1

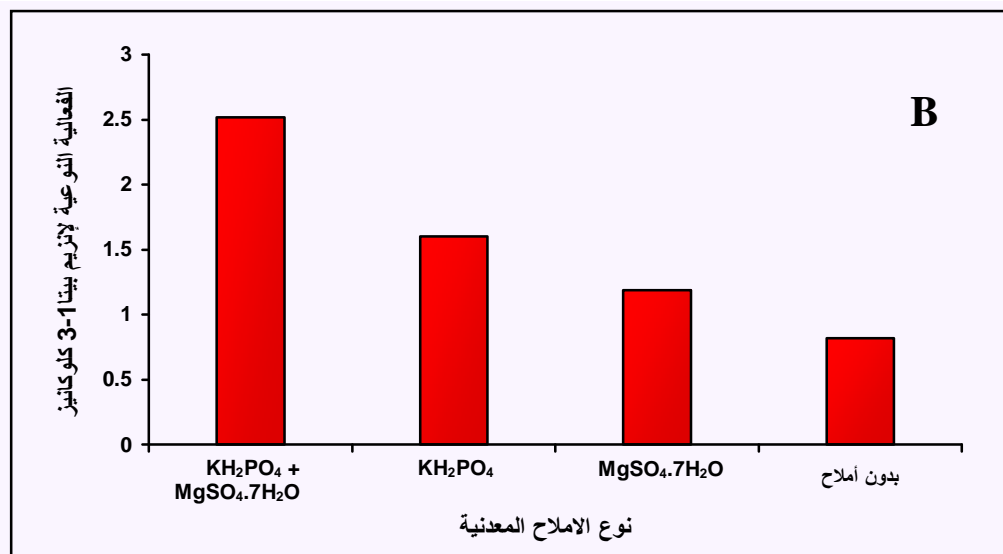
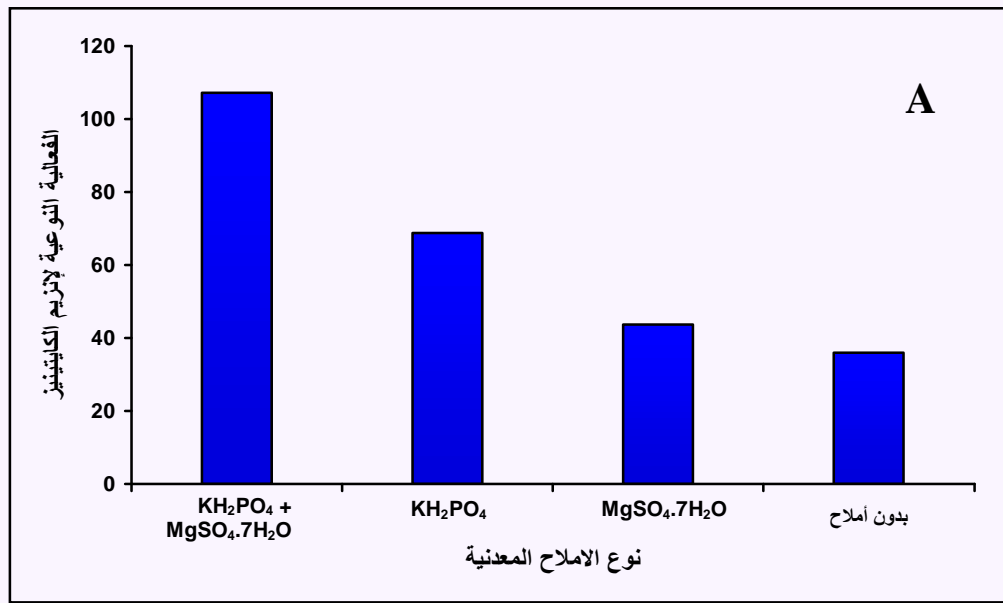
## 6- تأثير نوع الأملاح المعدنية و تركيزها :

درس تأثير نوع الأملاح المعدنية في إنتاج الإنزيمين من الفطر *T. fertile AH1* ، فقد استخدم الملحان كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين كلاً على انفراد، إضافة إلى المعاملة الحاوية على كلا الملحين ، و تركت إحدى المعاملات بدون إضافة أملاح معدنية للمقارنة . وأوضحت النتائج أن أفضل إنتاج لإنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز كان باستخدام الملحين معاً (الشكل 15) ، إذ بلغت الفعالية النوعية (107.12 و 2.52) وحدة /ملغم بروتين على التوالي ، بينما أظهرت المعاملة الخالية من الأملاح المعدنية أوطأ فعالية نوعية إذ بلغت 35.99 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم الكايتينيز و 0.82 وحدة /ملغم بروتين لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز .

في ضوء ما تقدم من نتائج تم اختيار الملحين ( كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ) لإنتاج الإنزيمين و تم استخدامهما في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها .

وعلى الرغم من تباين الأحياء المجهرية في احتياجاتها الغذائية لكونها تختلف في مقدرتها على استهلاك و تخليق المواد المختلفة ، إلا أن هنالك متطلبات عامة تعد أساسية للنمو و تكوين الناتج . وتعد الأملاح المعدنية إحدى هذه المغذيات الأساسية والتي تحتاجها الأحياء المجهرية بمقادير ضئيلة للنمو و تكوين الناتج ، لذلك ينبغي إضافتها إلى البيئة لتدعيمها (Stanbury & Whitaker ,1984) . وهذا ما يبدو جلياً من الحصول على أوطأ فعالية إنزيمية في المعاملة الخالية من الأملاح المعدنية .

لقد استخدمت الأملاح المعدنية قيد الدراسة في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* (Kucuk & Kivanc , 2008) . كما أشار (Dahiya et al. (2005 إلى استخدام كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في إنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Enterobacter sp. NRG4* .



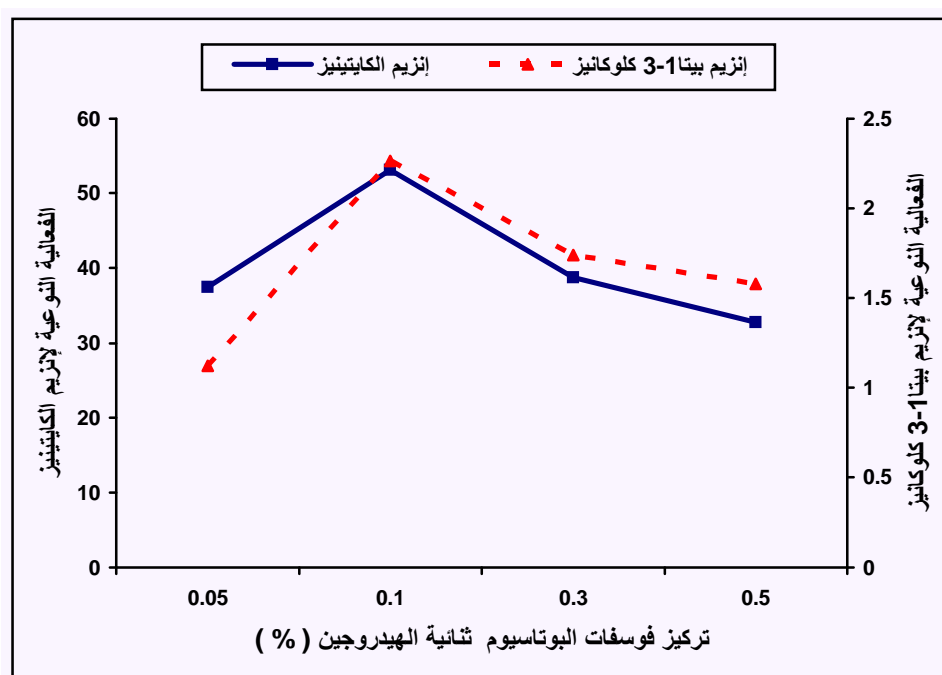
الشكل (15) : تأثير نوع الأملاح المعدنية في إنتاج :

(A) إنزيم الكايتينيز / من الفطر *T. fertile* AH1

(B) إنزيم بيتا 3-1 كلوكانيز

و بعد أن تم تحديد الأملاح المعدنية الضرورية لإنتاج الإنزيمين تم تحديد التركيز الأمثل من الملح حيث استخدمت تراكيز متدرجة من كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين ( 0.05 و 0.1 و 0.3 و 0.5 ) % ، و تشير النتائج الموضحة في الشكلين (16) و (17) إلى أن أعلى فعالية نوعية لإنزيمي الكابتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز كانت باستخدام التركيز 0.1 % لكلا الملح حيث بلغت (53.11 و 2.26) وحدة /ملغم بروتين على التوالي . واعتماداً على هذه النتيجة فقد تم اختيار التركيز 0.1 % من كلا الملح كأفضل تركيز لإنتاج الإنزيمين وتم استخدامه في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها .

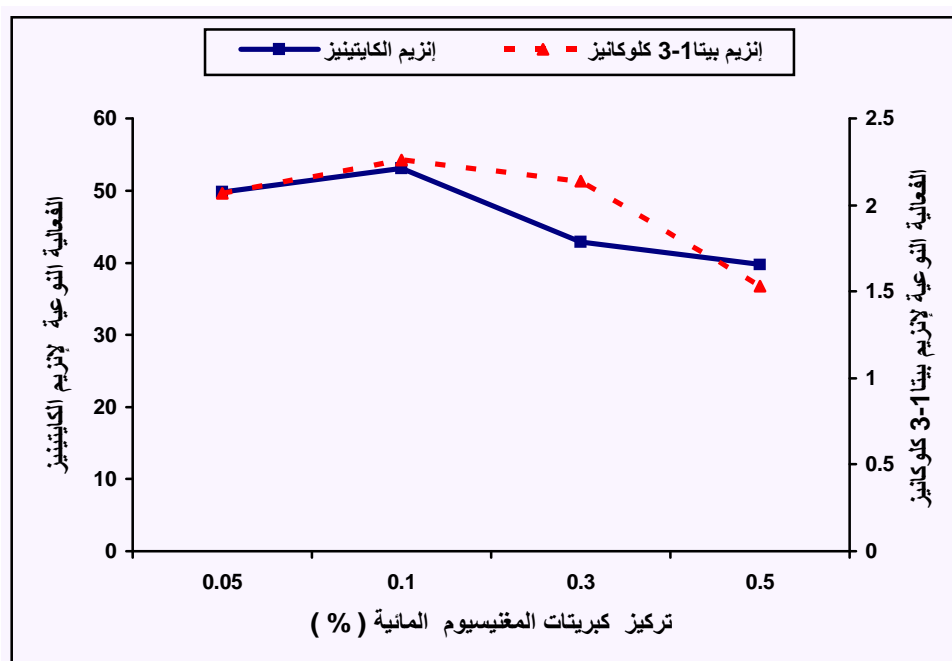
تؤدي فوسفات البوتاسيوم الموجودة في الوسط الزراعي مهمتين أساسيتين : الأولى هي المحافظة على الرقم الهيدروجيني للوسط الزراعي كونها محلولاً منظماً و الثانية مصدراً مغذياً للفطر بتزويده بالفسفور (الخفاجي ، 1990) .



الشكل (16) : تأثير تركيز فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في إنتاج إنزيمي الكابتينيز وبيتا-1-3

كلوكانيز من الفطر *T. fertile AH1*





الشكل (17) : تأثير تركيز كبريتات المغنيسيوم المائية في إنتاج إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3-كلوكانيز من

#### الفطر *T. fertile* AH1

إن استخدام تراكيز واطئة من الملحين قد ورد في العديد من الدراسات إذ استخدمت كبريتات المغنيسيوم المائية و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين بتركيز (0.05 و 0.1) % على التوالي لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Streptomyces griseus* (Jung et al., 1999) ، بينما أشارت دراسة أخرى إلى استخدام كبريتات المغنيسيوم المائية بتركيز 0.03 % و فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين بتركيز 0.2 % لإنتاج إنزيم بيتا-1-3-كلوكانيز من الفطر *Trichoderma* spp. و الفطر *T. harzianum* (de Marco & Felix, 2007) . (Ramada et al., 2010) .

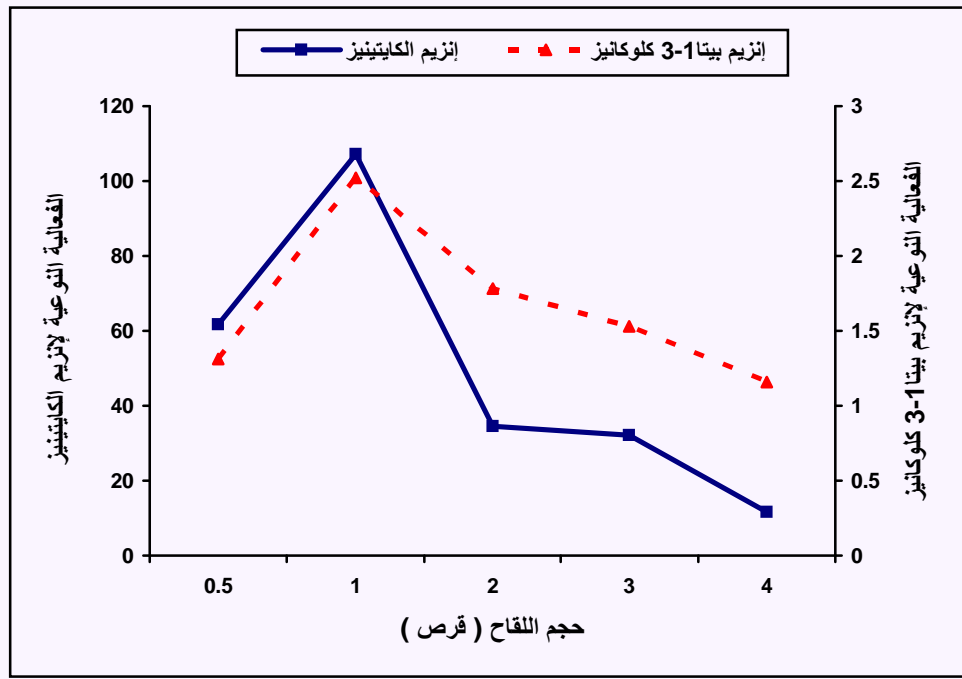
#### 7- تأثير حجم اللقاح :

لغرض معرفة تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3-كلوكانيز من الفطر *T. fertile* AH1 فقد تم تلقيح وسط الإنتاج باستخدام حجوم متدرجة من اللقاح (0.5 و 1 و 2 و 3

و (4) قرص ، و تشير النتائج الموضحة في الشكل (18) إلى أن إنتاج الإنزيمين يصل إلى أقصاه باستخدام حجم لقاح مقداره قرص واحد و الحاوي على  $2.5 \times 10^6$  سبور/ مل حيث بلغت الفعالية النوعية لإنزيم الكايتينيز 107.12 وحدة /ملغم بروتين و لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز 2.52 وحدة /ملغم بروتين ، لذا فقد اعتمدت هذه النتيجة و استخدمت في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها .

يعد تركيز اللقاح حرجاً لأي عملية حيوية لذا يجب أن يضاف بالمستوى الأمثل (Sandhya et al., 2004) ، كما أن تلقیح بيئة النمو بعدد معلوم من السبورات يعد من الطرق الشائعة الاستخدام في إنتاج الإنزيمات من الفطريات ، إذ تضمن الحصول على نتائج قابلة للتكرار و غير متذبذبة .

و بالرجوع إلى الشكل (18) يلاحظ انخفاض الفعالية النوعية للإنزيمين باستخدام حجوم كبيرة من اللقاح ، إذ بلغت (11.67 و 1.16) وحدة / ملغم بروتين لإنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز على التوالي باستخدام حجم لقاح مقداره أربعة أقراص . و يمكن تفسير الانخفاض الحاد بإنتاج هذين الإنزيمين من الفطر *T. fertile AH1* عند استخدام حجوم كبيرة من اللقاح و ذلك لانخفاض مستوى المواد المغذية (nutrients) نتيجة استهلاكها لتكوين الكتلة الحيوية و النمو السريع للفطر (Sandhya et al., 2004) . استخدم (De Marco et al., 2004) و (de Marco & Felix (2007) حجم لقاح مقداره  $2 \times 10^6$  سبور لكل 250 مل من وسط إنتاج إنزيم N-acetylglucosaminidase و إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز على التوالي وذلك لإنتاج الإنزيمين من الفطر *T. harzianum* . وإنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* استخدم حجم لقاح مقداره ثلاثة أقراص ( قطر القرص 5 ملم ) لكل 10 مل من وسط الإنتاج (El-Katatny et al., 2000) . كما أشار (Sandhya et al., 2004) إلى أن أفضل حجم لقاح لإنتاج إنزيم الكايتينيز الخارج خلوي (extracellular) من الفطر *T. harzianum* TUBF966 هو ثلاثة أقراص بعد مدة حضن 96 ساعة ، بينما كان حجم اللقاح الأمثل لإنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Serratia marcescens* هو  $2.2 \times 10^4$  خلية / مل (محمود ، 2007) .



الشكل (18) : تأثير حجم اللقاح في إنتاج إنزيمي الكابتينيز وبيتا-3-1-3 كلوكانيز من الفطر

### *T. fertile* AH1

وفي دراسة لإنتاج إنزيم بيتا-كلوكانيز من الفطر *Penicillium italicum* استخدم حجم لقاح مقداره  $4 \times 10^6$  سبور/مل (Santos et al. , 1977) ، في حين استخدم Ramada et al. (2010) حجم لقاح مقداره  $10^7$  سبور/مل لإنتاج إنزيم بيتا-3-1-3 كلوكانيز من الفطر *Trichoderma* spp.

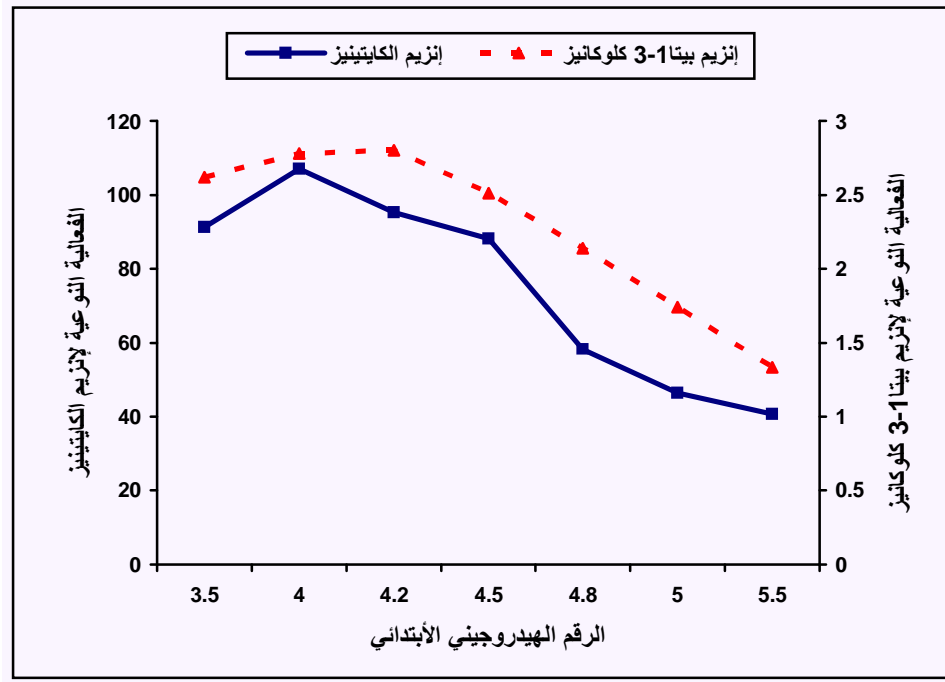
### 8- تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي :

يتضح من الشكل (19) أن أفضل رقم هيدروجيني ابتدائي لإنتاج إنزيم الكابتينيز من الفطر *T. fertile* AH1 هو 4 إذ بلغت الفعالية النوعية 107.11 وحدة / ملغم بروتين ، كما يتضح أيضاً أن أفضل رقم هيدروجيني ابتدائي لإنتاج إنزيم بيتا-3-1-3 كلوكانيز من الفطر نفسه هو (4.0 و 4.2) إذ بلغت الفعالية النوعية (2.78 و 2.80) وحدة / ملغم بروتين عند الرقمين الهيدروجينيين المذكورين . و بناءً على ما تقدم من نتائج فقد تم تعديل الرقم الهيدروجيني لوسط الإنتاج إلى 4 في مراحل الدراسة اللاحقة جميعها . و يلاحظ أيضاً من الشكل (19) أن الفعالية النوعية لإنزيمي

الكابتينيز و بيتا 1-3 كلوكانيز بلغت (91.28 و 2.62) وحدة /ملغم بروتين عند الرقم الهيدروجيني 3.5 ثم أخذت بالازدياد إلى أن وصلت أقصاها عند الرقم الهيدروجيني (4 و 4.2) على التوالي ، ثم بدأت بعدها بالانخفاض إلى أن وصلت الفعالية النوعية إلى (40.65 و 1.33) وحدة / ملغم بروتين للإنزيمين على التوالي أيضاً عند الرقم الهيدروجيني 5.5 . و تتفق النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة مع ما توصلت إليه عبيد (2006) و التي أوضحت أن الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لإنتاج إنزيم الكابتينيز من الفطر *T. harzianum* Rifai كان 4 . كما ذكر *Liu et al.* (2003) أن الرقم الهيدروجيني 4 هو الأمثل لإنتاج إنزيم الكابتينيز من الفطر *Verticillium lecanii* F091 باستخدام المخمر .

يعد الرقم الهيدروجيني للوسط مهماً جداً لنمو الأحياء المجهرية و لتوجيه أيضاً ، كما تعد التغيرات في الرقم الهيدروجيني مهمة جداً أيضاً لفعالية إنزيمات الأحياء المجهرية و النواتج الوسطية و درجة تحللها و ذائبيتها ، كما أن لهذه التغيرات تأثيراً في حصيللة النواتج النهائية لأيض الأحياء المجهرية (Egorov ,1985) .

أشارت العديد من الدراسات إلى تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي للوسط في إنتاج إنزيمات الكابتينيز و بيتا 1-3 كلوكانيز من الأحياء المجهرية فقد أشار *El-Katatny et al.* (2000) إلى أن أعلى إنتاج لإنزيمي الكابتينيز و بيتا 1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* كان عند رقم هيدروجيني (6 و 5.5) على التوالي ، في حين وجد *Sharaf* (2005) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنتاج إنزيم الكابتينيز من الفطر *Alternaria alternate* هو 5 . و في دراسة أخرى قام بها *Sandhya et al.* (2004) لإنتاج إنزيم الكابتينيز الخارج خلوي من الفطر *T. harzianum* TUBF966 كان الرقم الهيدروجيني الابتدائي الأمثل لإنتاج الإنزيم هو 5.5 . كما استخدم الرقم الهيدروجيني 5.5 أيضاً لوسط إنتاج إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* BIU 10671 (Mustafa et al. ,2005) .



الشكل (19) : تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من

#### الفطر *T. fertile AH1*

وفي دراسة تناولت تأثير الرقم الهيدروجيني الابتدائي في إنتاج إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Streptomyces sp. ANU6277* تراوحت قيم الـ pH المدروسة من (4 - 9) كان الرقم الهيدروجيني 6 هو الأمثل لإنتاج الإنزيم (Narayana & Vijayalakshmi , 2009) . يعتمد إنتاج إنزيمات الكايتينيز على الرقم الهيدروجيني للوسط ، و عادة يكون هذا الرقم في المدى نفسه الذي يبدي فيه الإنزيم فعاليته القصوى (Matsumoto , 2006) . و قد بيّنت إحدى الدراسات أن دور الرقم الهيدروجيني يتضح من خلال تأثيره في تعبير الجينات المشفرة لإنزيمات الكايتينيز حيث تبدي الجينات المذكورة أقصى معدل لإستسآخ الـ mRNA عند الرقم الهيدروجيني 5 و ذلك في دراسة عن الإنزيمات المحللة للكايتين من الفطر *Metarhizium anisopliae* (Leger et al. ,1998) .

### 3-4 التنقية الجزئية لإنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز :

تم إنتاج 80 مل من إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز بتنمية الفطر *T. fertile* AH1 في وسط الإنتاج المكون من خميرة الخبز 1.5 % والمدعم بكبريتات المغنيسيوم المائية وفوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين و تحت الظروف المثالية للإنتاج التي تم تحديدها من خلال التجارب السابقة ، لغرض استخدامه في تنقية الإنزيمين .

#### خطوات التنقية :

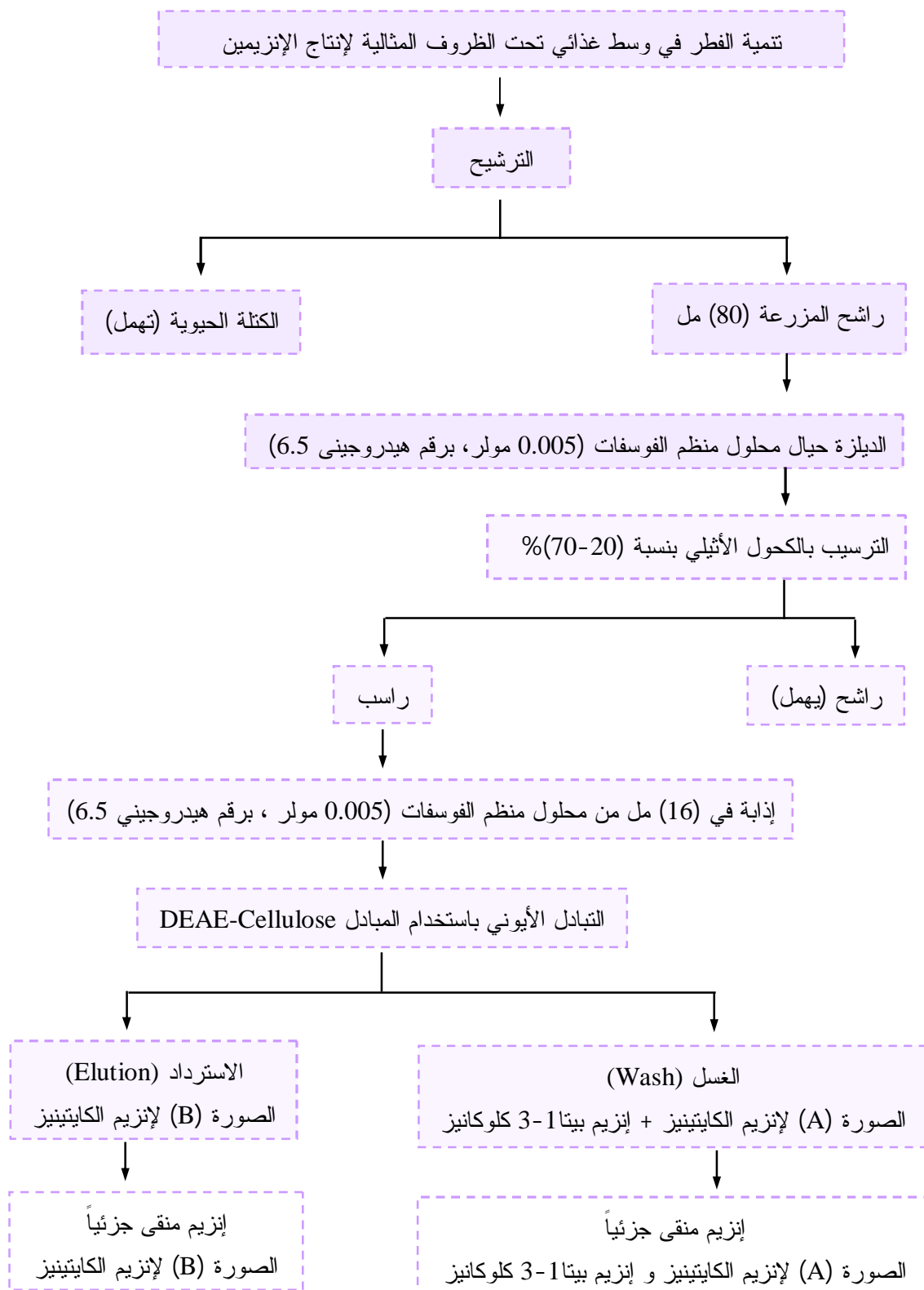
جرت جميع خطوات تنقية الإنزيمين تحت ظروف مبردة ، و يلخص المخطط (2) خطوات التنقية الجزئية لإنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز المنتجين من الفطر *T. fertile* AH1 .

#### 1- الديلزة :

أجريت عملية الديلزة للمستخلص الإنزيمي الخام حيال محلول منظم الفوسفات (0.005 مولر برقم هيدروجيني 6.5 ) و لمدة 6 ساعات و عند درجة حرارة 4 م . و تنعكس أهمية الديلزة في إزالة بعض المركبات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة ، فضلاً عن خفض القوة الأيونية للمستخلص و تهيئته للخطوات التالية للتنقية . و قد حققت هذه الخطوة تنقية جزئية لإنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز ، إذ بلغ عدد مرات التنقية (1.123 و 1.097) مرة بحصيلة إنزيمية مقدارها (95.97 و 93.46%) للإنزيمين على التوالي [ جدول (4) ] .

استخدمت الديلزة كخطوة أولى في العديد من دراسات تنقية الإنزيمات المحللة للكايتين والكلوكان من الأحياء المجهرية ، إذ أشار *Harman et al.* (1993) إلى استخدامها في تنقية الإنزيمات المحللة للكايتين (chitobiosidase and endochitinase) من الفطر *T. harzianum* . كما تم استخدامها في تنقية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز إذ تم الحصول على عدد مرات تنقية (9.1 و 18.6) و (6.9 و 11.9) مرة على التوالي من البكتريا *Paenibacillus* sp.300 و البكتريا *Streptomyces* sp.385 على التوالي أيضاً (Singh et al. 1999) .

مخطط (2) : تنقية إنزيمي الكايتينيز وبيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile* AH1



جدول (4) : خطوات تنقية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile* AH1

الحصيلة (%)	عدد مرات التنقية	الفعالية الكلية (وحدة)	الفعالية النوعية (وحدة/ملغم بروتين)	تركيز البروتين (ملغم/مليتر)	الفعالية (وحدة/مليتر)	الحجم (مليتر)	خطوة التنقية
							المستخلص الإنزيمي الخام
100	1	1396.8	194	0.090	17.46	80	إنزيم الكايتينيز
100	1	10.4	1.44	0.090	0.13	80	إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز
							الديلزة
95.97	1.123	1340.55	217.76	0.076	16.55	81	إنزيم الكايتينيز
93.46	1.097	9.72	1.58	0.076	0.12	81	إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز
							الترسيب بالكحول الأثيلي (20-70%)
45.7	1.285	638.4	249.38	0.16	39.9	16	إنزيم الكايتينيز
50.77	1.432	5.28	2.063	0.16	0.33	16	إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز
							التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose
							الغسل
31.49	2.22	439.96	431.33	0.030	12.94	34	الصورة (A) لإنزيم الكايتينيز
35.96	2.55	3.74	3.67	0.030	0.11	34	إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز
							الاسترداد
03.18	0.27	44.48	51.48	0.027	1.39	32	الصورة (B) لإنزيم الكايتينيز



## 2- الترسيب بالكحول الأثيلي :

تم استخدام الكحول الأثيلي المبرد لترسيب الإنزيمين بعد خطوة الديلزرة باستخدام نسبة ترسيب (20 - 70)% وقد حققت هذه الخطوة تنقية جزئية لإنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز بعدد مرات تنقية مقداره (1.285 و 1.432) مرة و حصيداً إنزيمية مقدارها (45.7 و 50.77)% على التوالي و كما هو موضح في جدول (4) .

يحدث الترسيب باستخدام المذيبات العضوية بسبب خفض ثابت العزل الكهربائي (dielectric constant) للوسط مما يؤدي إلى زيادة التجاذب بين الجزيئات و بالتالي تكتلها ثم ترسيبها (Whitaker, 1972) .

استخدمت طرق الترسيب بالمذيبات العضوية في تنقية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الأحياء المجهرية ، فقد قام Tangarone *et al.* (1989) باستخدام الترسيب بالكحول الأثيلي في تنقية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الداخلي من الفطر *T. longibrachiatum* و كانت الحصيداً الإنزيمية 76.2% و عدد مرات التنقية 21.6% . كما تمت تنقية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. harzianum* BIU10671 باستخدام الأسيتون 80% كخطوة أولى في التنقية (Mustafa *et al.*, 2005) . أما إنزيم الكايتينيز المنتج من الفطر *Penicillium sp.* LYG0704 فقد تمت تنقيته باستخدام الأيزوبروبانول (isopropanol) و تم الحصول على عدد مرات تنقية 1.6 مرة بحصيداً إنزيمية 43.8% (Lee *et al.*, 2009) .

كما استخدمت طريقة الترسيب بالأملاح في تنقية الإنزيمين قيد الدراسة ، فقد أدى استخدام كبريتات الامونيوم في تنقية إنزيم الكايتينيز من الفطر *Myrothecium verrucaria* و الفطر *Metarhizium anisopliae* إلى الحصول على عدد مرات تنقية (0.9 و 2.21) مرة بحصيداً إنزيمية (18.7 و 60.7)% على التوالي (Govindsamy *et al.*, 1998) و (Kang *et al.*, 1999) على التوالي أيضاً . كما تمت تنقية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. viride* TP09 باستخدام كبريتات الامونيوم 70% كخطوة أولى في التنقية بحصيداً إنزيمية 73.4% و عدد مرات تنقية 2.0 مرة (Yi *et al.*, 2008) .

أما في البكتريا ، فقد تمكن (Wang *et al.* (2010) من تنقية إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Pseudomonas sp.* باستخدام كبريتات الامونيوم ، و قد بلغت الحصيعة الإنزيمية 59 % بعدد مرات تنقية 2.9 مرة .

### 3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني :

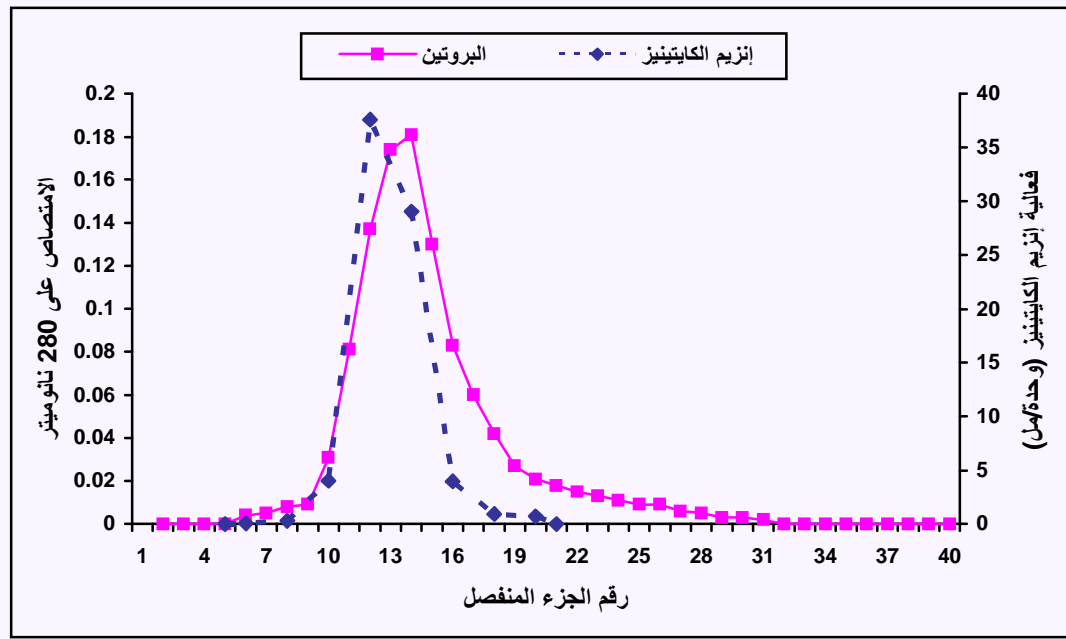
أجريت عملية التبادل الأيوني للمستخلص الإنزيمي ( الحاوي على كلا الإنزيمين ) المتحصل عليه من الخطوة السابقة باستخدام المبادل DEAE-Cellulose بوجود محلول منظم الفوسفات (0.005 مولر و برقم هيدروجيني 6.5) .

استخدم المبادل المذكور لما يتميز به من ميزات عدة جعلته من أكثر أنظمة الكروماتوغرافيا شيوعاً في الاستخدام و من ضمن هذه الميزات القدرة العالية على الفصل (high resolving power) و السعة العالية لاستيعاب البروتينات المرتبطة (high protein-binding capacity) و وضوح و بساطة مبدأ الفصل والذي يعتمد بشكل أساس على الاختلاف في الشحنة (Karlsson *et al.* ,1998) .

تمخض عن عملية التبادل الأيوني ظهور قمة بروتينية واحدة في مرحلة الغسل تركزت في الأجزاء المنفصلة (9-18) كما في الشكلين (20) و (21) ، فضلاً عن ظهور قمم عدة في مرحلة الاسترداد ( الذي تم باستخدام المحلول المنظم ذاته و بوجود تدرج ملحي (0.0-0.3) مولر كلوريد الصوديوم ) كما مبين في الشكل (22) . و بتقدير الفعالية الإنزيمية في القمم المذكورة لوحظ وجود فعالية إنزيمية لإنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز في القمة البروتينية الواقعة في الأجزاء (9-18) في مرحلة الغسل ( الشكلين 20 و 21 ) على التوالي ، إضافة إلى وجود فعالية إنزيمية لإنزيم الكايتينيز في قمة بروتينية واقعة في الأجزاء (5-14) في مرحلة الاسترداد (الشكل 22) ، لذا فقد تم تقدير الفعالية الإنزيمية في الأجزاء التابعة للقمم الحاوية على فعالية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز ، كما جمعت الأنابيب الخاصة بكل قمة بمزجها و حساب حجمها و تقدير الفعالية الإنزيمية و البروتين لاستخراج الفعالية النوعية لكلا الإنزيمين [جدول (4)] .

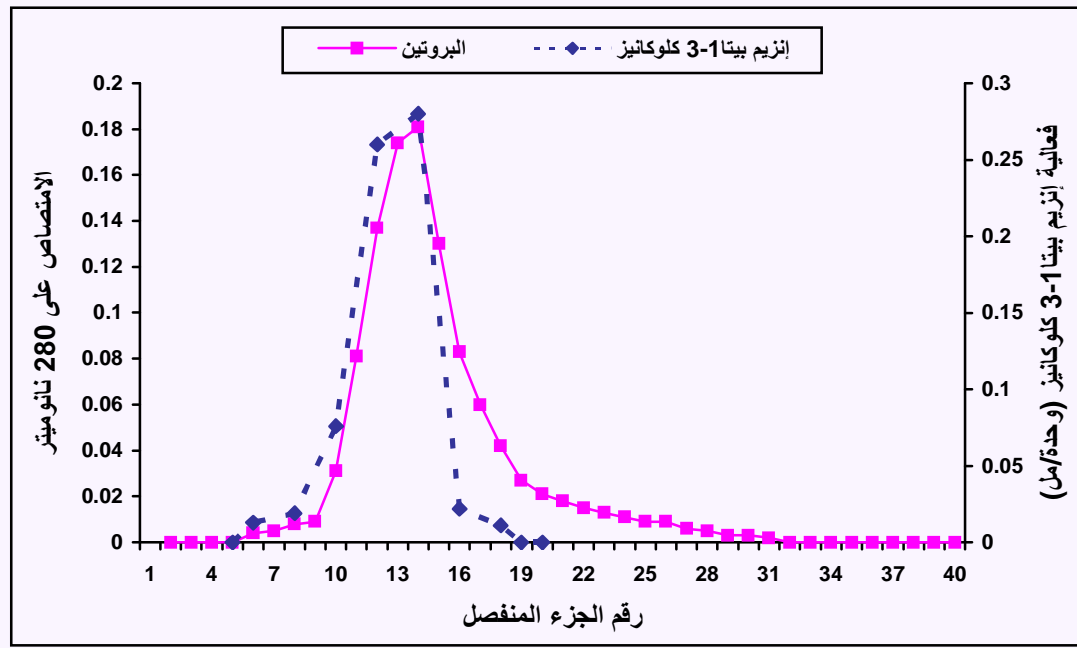
يتضح من النتائج وجود صورتين إنزيميتين لإنزيم الكايتينيز المنتج من الفطر *T. fertile* AH1 أحدهما في مرحلة الغسل (والتي أعطيت الرمز A) أما الأخرى فكانت في مرحلة الاسترداد (والتي أعطيت الرمز B) ، بينما لوحظ وجود صورة إنزيمية واحدة لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنتج من الفطر نفسه . يمكن الاستنتاج من ذلك بأن كلاً من الصورة A لإنزيم الكايتينيز و كذلك إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز تحملان شحنة موجبة نظراً لنزولهما في مرحلة الغسل ، بينما تحمل الصورة B لإنزيم الكايتينيز شحنة سالبة مما يجعلها ترتبط بالمبادل في ظروف الفصل المستخدمة . إن تعدد الصور الإنزيمية لإنزيم الكايتينيز شائع عند تنقيته من الأحياء المجهرية ، فقد أشار Pedraza-Reyes & Lopez-Romero (1989) إلى ظهور صورتين لإنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *Mucor rouxii* في خطوة التبادل الأيوني . كما لوحظ ظهور صورتين أيضاً (I و II) لإنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *Rhizopus oligosporus* (Yanai et al. , 1992) . فضلاً عن ظهور صورتين (CHIT41 و CHIT32) للإنزيم المنقى من الفطر *Talaromyces flavus* (Duo-Chuan et al. ,2005) ، بينما تم فصل ثلاث صور (M و L و S) لإنزيم الكايتينيز الداخلي المنقى من البكتريا *Bacillus sp. Strain MH-1* (Sakai et al. ,1998) .

أدى فصل الصورة A لإنزيم الكايتينيز قيد الدراسة إلى الحصول على نقاوة جزئية للإنزيم بعدد مرات تنقية 2.22 مرة و حصيلة إنزيمية 31.49 % ، و من جدول (4) يلاحظ كذلك الحصيلة الإنزيمية للصورة B لإنزيم الكايتينيز والتي بلغت 3.18 % بعدد مرات تنقية 0.27 مرة . أما تنقية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز فقد أدت إلى الحصول على حصيلة إنزيمية مقدارها 35.96 % بعدد مرات تنقية 2.55 مرة ، جدول (4) .



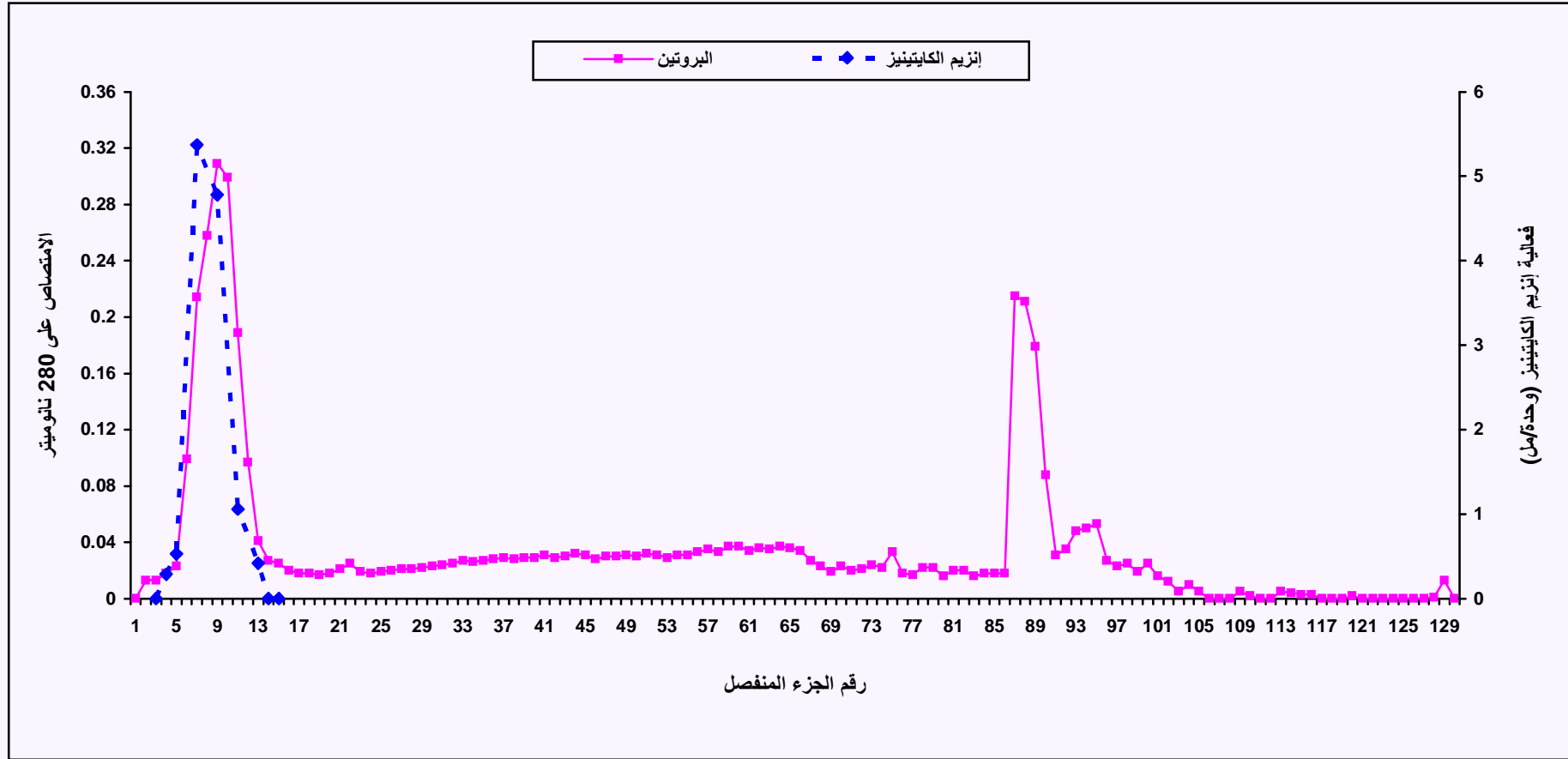
الشكل (20) : كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. fertile* AH1 باستخدام عمود DEAE-Cellulose (21×1.8) سم الذي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات (0.005 مولر ، برقم هيدروجيني 6.5) بسرعة جريان 1 مل /دقيقة وبواقع 3 مل /جزء (خطوة الغسل).

استخدمت كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل DEAE-Cellulose في العديد من دراسات تنقية إنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز ، فقد استخدم Woo & Park (2003) المبادل المذكور في تنقية إنزيم الكايتينيز الخارج خلوي من البكتريا *Bacillus* sp. و كان عدد مرات التنقية المستحصلة من هذه الخطوة 7.4 مرة بحصيلة إنزيمية 31 % . كما تمت تنقية إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Streptomyces* sp. M-20 باستخدام المبادل نفسه ، و بلغ عدد مرات التنقية 4.1 مرة (Kim et al. ,2003) . وتمت تنقية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الخارجي من الفطر *T. harzianum* باستخدام المبادل DEAE-Cellulose أيضاً (Kitamoto et al. ,1987) .



الشكل (21) : كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم بيتا-1-3-كلوكانيز من الفطر *T. fertile* AH1 باستخدام عمود DEAE-Cellulose (21×1.8) سم الذي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات (0.005 مولر ، برقم هيدروجيني 6.5) بسرعة جريان 1 مل /دقيقة وبواقع 3 مل /جزء (خطوة الغسل).

و قام (Ogawa *et al.* (2000) باستخدام المبادل DEAE-Sepharose CL-6B لتنقية إنزيم الكايتينيز من البكتريا *Burkholderia cepacia* Strain KH2 و بلغ عدد مرات التنقية 2.51 مرة بحصيلة إنزيمية 12.2 % . و تمكن (Sanchez *et al.* (1982) من تنقية إنزيم بيتا-1-3-كلوكانيز من الفطر *Penicillium italicum* باستخدام المبادل DEAE-Sephadex وكانت الحصيلة الإنزيمية 6% و عدد مرات التنقية 148 مرة .



الشكل (22) : كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية إنزيم الكايتينيز من الفطر *T. fertile* AH1 باستخدام عمود DEAE-Cellulose (21×1.8) سم الذي تمت موازنته بمحلول منظم الفوسفات (0.005 مولر ، برقم هيدروجيني 6.5) تم الاسترداد بمحلول تدرج ملحي من كلوريد الصوديوم (0.0-0.3) مولر بسرعة جريان 1 مل /دقيقة وبواقع 3 مل / جزء .

### 3-5 توصيف إنزيمي الكايتينيز وبيتا 1-3 كلوكانيز :

استخدم المستخلص الإنزيمي المتحصل عليه من خطوة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني في دراسة بعض الصفات المهمة لكلتا صورتى إنزيم الكايتينيز ( A و B ) و إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز كلاً على انفراد .

#### 1- الثوابت الحركية [ ثابت ميكالس ( $K_m$ ) و السرعة القصوى ( $V_{max}$ ) ] :

##### أ- الثوابت الحركية لإنزيم الكايتينيز :

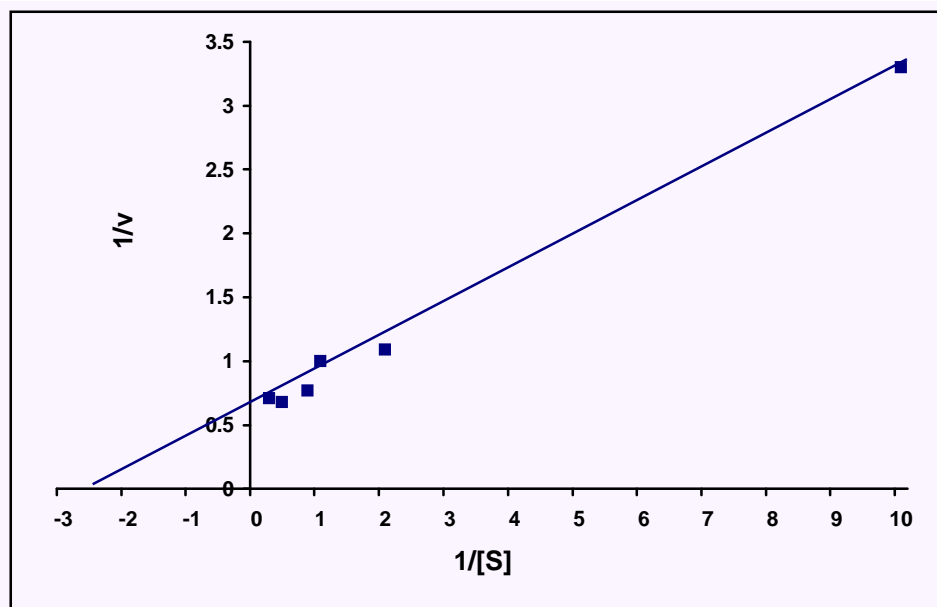
استخدمت طريقة لاينويفر-بورك لتقدير ثابت ميكالس و السرعة القصوى للإنزيم ( بكتا صورتيه A و B ) باستخدام مادة التفاعل pNP-GlcNAc و بتراكيز تراوحت بين (0.1-10) ملي مولر . أظهرت النتائج المبينة في الشكل (23) أن قيمة ثابت ميكالس لإنزيم الكايتينيز (الصورة A) كانت 0.4 ملي مولر و السرعة القصوى 1.5 مايكرومول/مليتر/دقيقة . أما قيمة ثابت ميكالس للصورة B لهذا الإنزيم فكانت 0.37 ملي مولر ، والسرعة القصوى 1.4 مايكرومول/مليتر/دقيقة ( الشكل 24 ) .

يعد ثابت ميكالس ثابتاً مهماً في تشخيص الإنزيمات ، فمثلاً تشير قيمة  $K_m$  الصغيرة إلى الميل العالي للإنزيم تجاه مادة تفاعله بينما تشير قيمة  $K_m$  الكبيرة إلى الحاجة إلى تركيز عالي من مادة التفاعل للوصول إلى نصف التشبع ( ساجدي و علي ، 1983 ) .

في دراسة قام بها ( De Marco et al. (2004) لتوصيف إنزيم N-acetylglucosaminidase من الفطر *T. harzianum* وجد أن قيمة  $K_m$  و  $V_{max}$  تساوي 8.06 مايكرومول/مليتر و 3.36 مايكرومول/مليتر/دقيقة على التوالي باستخدام مادة التفاعل p-nitrophenyl-N-acetylglucosaminide . ووجد ( Giambattista et al. (2001) عند دراسته لإنزيم  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase من الفطر *Penicillium janthinellum* أن قيم  $K_m$  و  $V_{max}$  بلغت (0.20 و 0.35) ملي مول/لتر و (0.86 و 1.4) ملي مول/لتر/ملغم لصورتي الإنزيم اللتين حصل عليهما (CHI1 و CHI2) على التوالي باستخدام مادة التفاعل

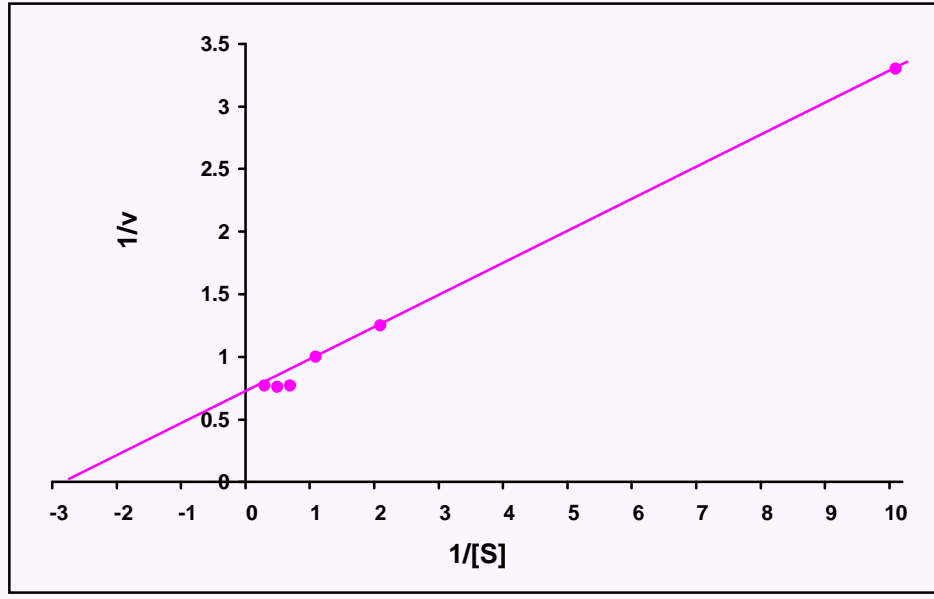
الكابتينيز الخارج خلوي المنقى من الفطر *Myrothecium verrucaria* باستخدام الكابتين كـمادة تفاعل فهي 0.61 ملغم/مليتر و 0.15 مايكرومول/ساعة/مليتر على التوالي (Govindsamy *et al.*, 1998).

وفي دراسة أخرى قام بها Adrangi *et al.* (2010) لتقدير الثابت الحركية لـصورتى إنزيم الكابتينيز الداخلي الخارج خلوي (extracellular endochitinase) (chi-56 و chi-64) المنقى من البكتريا *Massilia timonae* كانت قيمة  $K_m$  (1.1 و 1.3) ملغم/مليتر على التوالي و  $V_{max}$  (0.59 و 1.36) مايكرومول/ملغم/ساعة على التوالي أيضاً باستخدام الكابتين الغروي كمادة تفاعل.



الشكل (23) : منحنى لاينويفر-بورك لتقدير  $K_m$  و  $V_{max}$  للصورة (A) من إنزيم الكابتينيز المنقى جزئياً من الفطر *T. fertile* AH1 باستخدام مادة التفاعل pNP-GlcNAc.



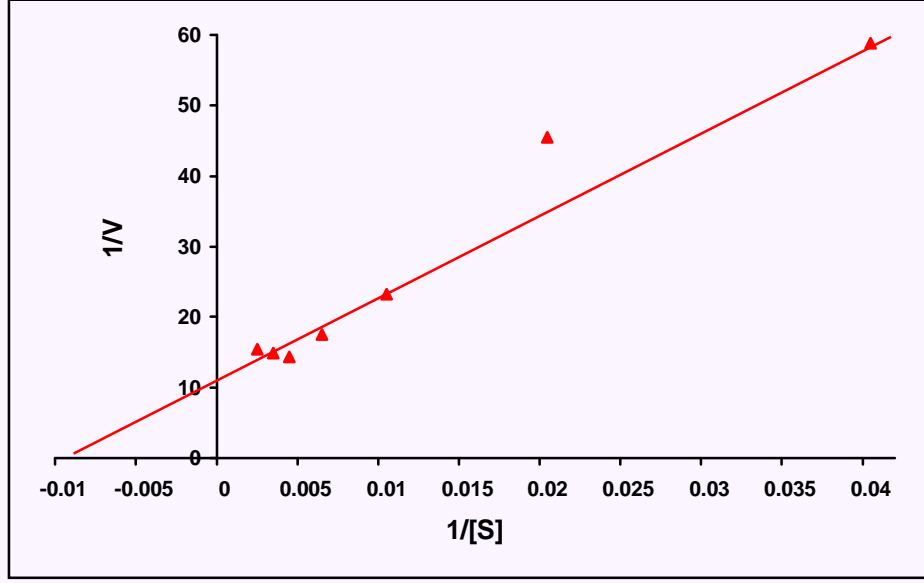


الشكل (24) : منحنى لاينويفر-بورك لتقدير  $K_m$  و  $V_{max}$  للصورة (B) من إنزيم الكايتينيز المنقى جزئياً من الفطر *T. fertile* AH1 باستخدام مادة التفاعل pNP-GlcNAc .

#### ب - الثوابت الحركية لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز :

استخدمت طريقة لاينويفر-بورك أيضاً لتقدير الثوابت الحركية لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز . ويتضح من الشكل (25) أن قيمة ثابت ميكالس و السرعة القصوى لهذا الإنزيم بلغت 111 مايكروغرام/ مليلتر و 0.09 مايكرومول/ مليلتر/ دقيقة على التوالي و ذلك باستخدام اللامينارين مادة تفاعل و بتراكيز تراوحت بين (25-500) مايكروغرام/ مليلتر .

وجد (Noronha & Ulhoa (2000) أن قيمة  $K_m$  و  $V_{max}$  لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى من الفطر *T. harzianum* تساوي 1.72 ملغم/ مليلتر و 3.10 وحدة/ مليلتر على التوالي باستخدام اللامينارين كمادة تفاعل ، بينما وجد (Tangarone *et al.* (1989) في دراسة قام بها لتوصيف إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الداخلي من الفطر *T. longibrachiatium* أن قيمة  $K_m$  و  $V_{max}$  باستخدام اللامينارين كمادة تفاعل بلغت 0.0016 % و 3.170 مايكرومول/ ملغم/ دقيقة على التوالي .



الشكل (25) : منحنى لاينويفر-بورك لتقدير  $K_m$  و  $V_{max}$  لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى جزئياً من الفطر *T. fertile* AH1 باستخدام اللامينارين كمادة تفاعل .

و ذكر *Celestino et al.* (2006) أن قيمة  $K_m$  و  $V_{max}$  لإنزيم بيتا-كلوكانيز المنقى من الفطر *Rhizopus microsporus var microsporus* هي 22.39 ملغم/مليتر و 16.46 ملغم/دقيقة على التوالي باستخدام بيتا-كلوكان مادة تفاعل ، بينما كانت قيمة  $K_m$  (0.12) ملي مولر و  $V_{max}$  ( $10^3 \times 17$ ) ملي مول/دقيقة/ملغم لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الخارجي المنقى من الفطر *T. viride* و ذلك باستخدام اللامينارين كمادة تفاعل (*Kulminskaya et al.*, 2001) . أما قيمة  $K_m$  للإنزيم المنقى من الفطر *Penicillium italicum* فكانت تساوي 0.04 ملغم/مليتر باستخدام اللامينارين كمادة تفاعل أيضاً (*Sanchez et al.*, 1982) .

## 2- الرقم الهيدروجيني الأمثل للفعالية الإنزيمية :

### أ- الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتينيز :

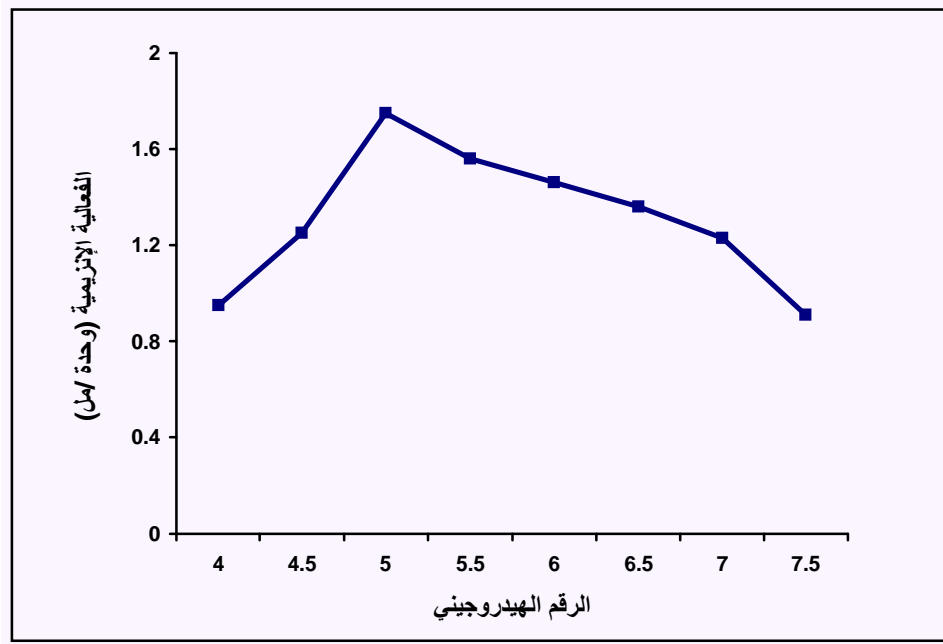
درس تأثير الرقم الهيدروجيني في فعالية صورتي إنزيم الكايتينيز (A و B) من الفطر *T. fertile AH1* . وقد أظهرت النتائج المبينة في الشكلين (26) و (27) أن الرقمين الهيدروجيين 5 و 5.5 هما الأمثلان لفعالية صورتي الإنزيم (A و B) على التوالي . يمتلك كل إنزيم رقماً هيدروجينياً مثالياً واحداً لفعاليته ، بيد أن بعض الإنزيمات تمتلك أكثر من ذلك ، وعادة ما يكون هذا الرقم بمدى ضيق تماماً إلا أن بعض الإنزيمات تبدي مدى واسع له (de Man , 2007) .

وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما تم الإشارة إليه في العديد من الدراسات فقد كان الرقم الهيدروجيني 5 هو الأمثل لفعالية إنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *Metarhizium anisopliae* (Kang et al. ,1999) و الفطر *Trichothecium roseum* (Li et al. ,2004) و الخميرة *Candida albicans* (Mellor et al. ,1994) . كذلك أشار (Adrangi et al. (2010 إلى أن إنزيم الكايتينيز الداخلي الخارج خلوي المنقى من البكتريا *Massilia timonae* بكتريا صورتيه (chi-56 و chi-64) يظهر أعلى فعالية عند رقم هيدروجيني 5 . كما تتفق أيضاً مع ما أشار إليه كل من (Woo & Park (2003 و (Dahiya et al. (2005 من أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا *Bacillus* sp. و البكتريا *Enterobacter* sp. NRG4 على التوالي كان 5.5 . و وجد (Tikhonov et al. (2002 أن إنزيم الكايتينيز المنقى من الفطرين *Verticillium chlamydosporium* و *V. suchlasporium* يظهر أعلى فعالية عند رقم هيدروجيني يتراوح بين (5.2-5.7) . في حين كان الرقم الهيدروجيني 6.7 هو الأمثل لفعالية الإنزيم المنقى من الفطر *Neurospora crassa* (Zarain-Herzberg & Arroyo-Begovich ,1983) .

إن نقصان سرعة التفاعل الإنزيمي عند قيم pH أقل أو أكثر من قيمة الـ pH المثالي يعود

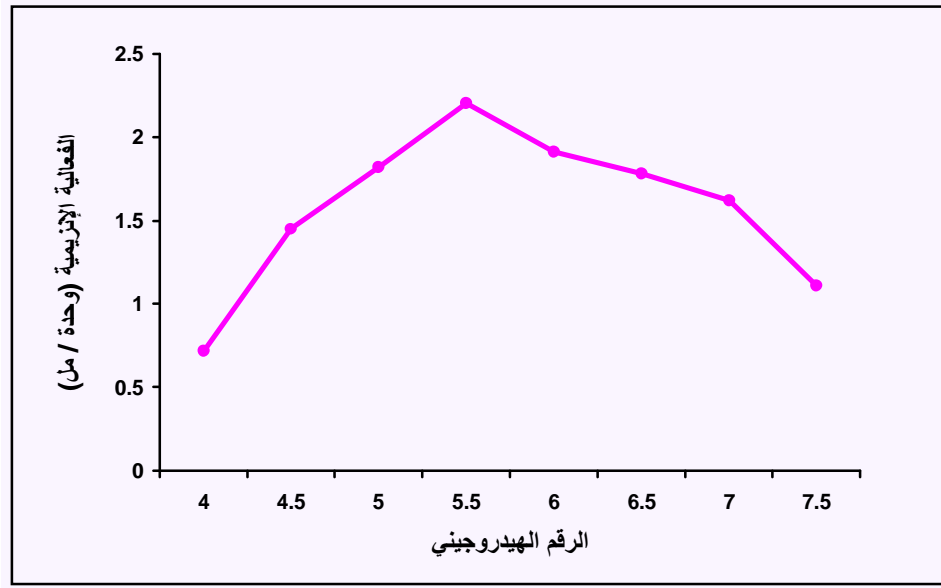
إلى :

- 1- تكوين صورة أيونية للإنزيم غير ملائمة للتفاعل الإنزيمي .
- 2- تكوين صورة أيونية للركيزة غير ملائمة للتفاعل الإنزيمي .
- 3- تكوين صورة أيونية لكل من الإنزيم و الركيزة غير ملائمة للتفاعل الإنزيمي .
- 4- تغيير التركيب الطبيعي للإنزيم .
- 5- جميع المسببات المذكورة أعلاه ( الداودي ، 1991 ) .



الشكل (26) : الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتيناز (الصورة A) المنقى جزئياً من الفطر

*T. fertile AH1*



الشكل (27) : الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم الكايتيناز (الصورة B) المنقى جزئياً من الفطر

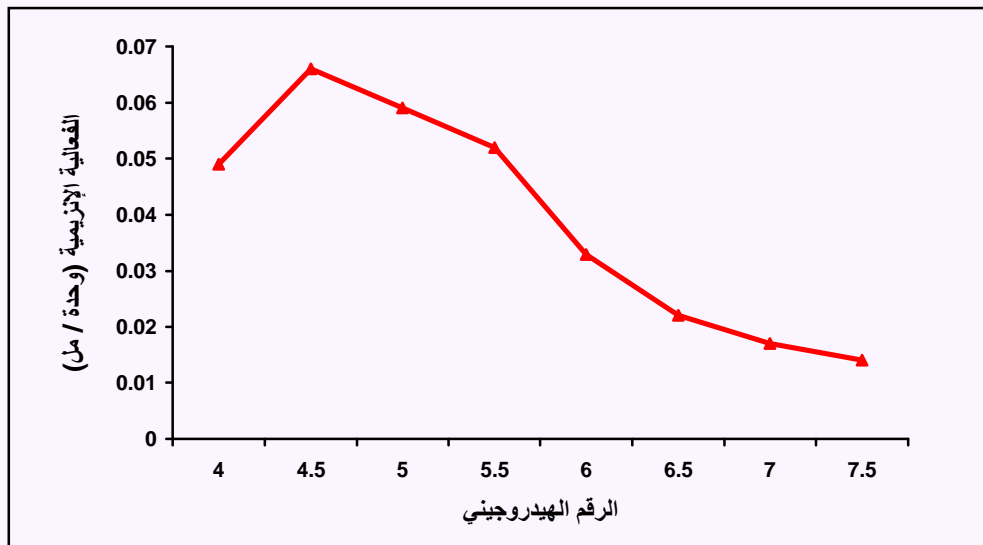
#### *T. fertile AH1*

#### ب - الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز :

تشير النتائج الموضحة في الشكل (28) إلى أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لإنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile AH1* بلغ 4.5 . و تعد هذه النتيجة مماثلة لما وجدته كل من Kitamoto *et al.* (1987) و Kulminskaya *et al.* (2001) في دراسة عن إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الخارجي المنقى من الفطر *T. harzianum* و الفطر *T. viride* على التوالي ، إذ كان الرقمان الهيدروجينيان الأمثلان للفعالية (4.5 و 4.6) على التوالي أيضاً . كما كان الرقم الهيدروجيني 4.5 الأمثل لفعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الداخلي المنقى من الفطر *T. harzianum* Rifai T24 (El-Katatny *et al.*, 2001) . و أشار Noronha & Ulhoa (2000) إلى أن الإنزيم المنقى من الفطر *T. harzianum* يظهر أعلى فعالية عند رقم هيدروجيني (4.4) . كما تعد النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة مقارنة لما وجدته Tangarone *et al.* (1989) إذ كان الرقم الهيدروجيني 4.8 هو الأمثل لفعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الداخلي المنقى من الفطر

*T. longibrachiatum* ، بينما يلاحظ أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية الإنزيم المنقى من الفطر *Aureobasidium pullulans* و البكتريا *Bacillus circulans* IAM1165 بلغ 5.5 و 6.5 على التوالي (Dake et al., 2004) و (Aono et al., 1992) على التوالي أيضاً . أما الرقم الهيدروجيني للصور الإنزيمية الثلاث (I و II و III) المنقاة من الفطر *T. reesei* فكان 5 (Budiarti et al., 2009) .

يتأثر نشاط الإنزيم بدرجة كبيرة بتركيز أيون الهيدروجين في وسطه ، و من المرجح أن يكون هذا التغيير في النشاط مع تغير الـ pH ناجماً عن التغيرات في تأين الإنزيم أو مادة التفاعل أو معقد الإنزيم- مادة التفاعل ، وبالإضافة إلى التأثيرات الأيونية ، يمكن لقيم الـ pH الواطئة أو العالية أن تتسبب في إيقاف النشاط نتيجة لإزالة طبيعة البروتين الإنزيمي (ساجدي وعلي، 1983) .



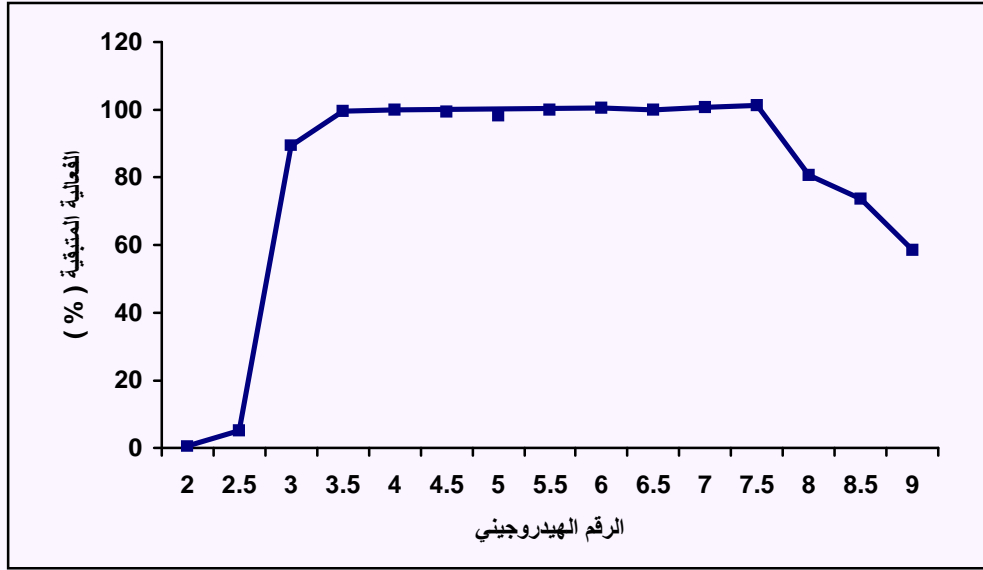
الشكل (28) : الرقم الهيدروجيني الأمثل لفعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى جزئياً من الفطر

*T. fertile* AH1

### 3- الرقم الهيدروجيني لثبات الإنزيم :

#### أ- الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيم الكايتينيز :

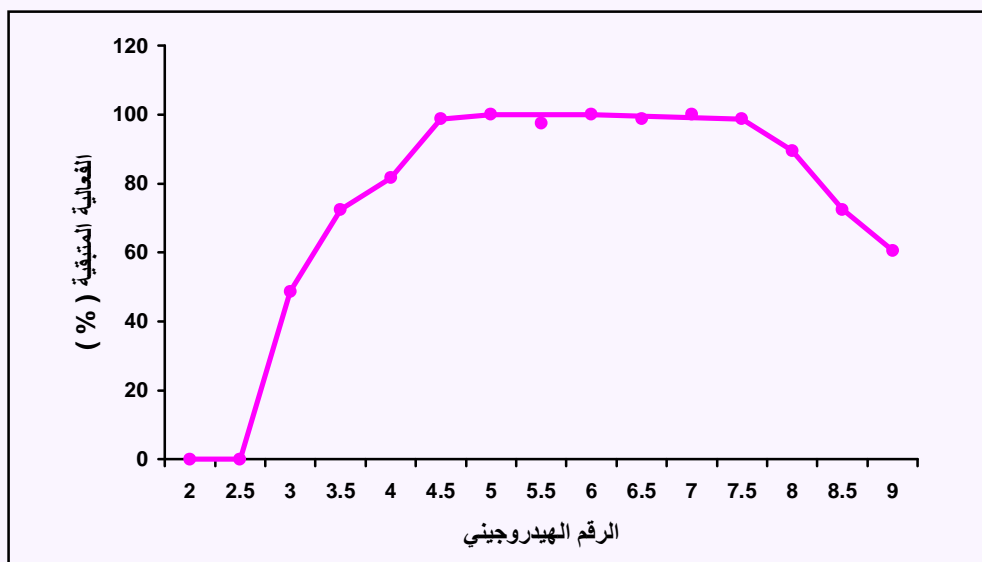
درس الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *T. fertile* AH1 ، إذ يعد هذا الرقم من الصفات المهمة في تحديد ظروف التثقية و خزن الإنزيم و يتضح من الشكل (29) أن المدى الأمثل لثبات إنزيم الكايتينيز (الصورة A) يتراوح بين (3.5-7.5) كما يلاحظ أن الصورة المذكورة احتفظت بـ 80.5 % من فعاليتها عند الحضان لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 37 م° في الرقم الهيدروجيني 8 ، و انخفضت الفعالية إلى 73.5 % عند الرقم الهيدروجيني 8.5 . وكانت الفعالية الإنزيمية منخفضة في الأرقام الهيدروجينية الحامضية و القاعدية المتطرفة ، إذ احتفظت صورة الإنزيم أعلاه بـ (0.56 و 62.39)% فقط من فعاليتها عند الرقمين الهيدروجيين (2 و 9) على التوالي .



الشكل (29) : الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم الكايتينيز (الصورة A) المنقى جزئياً من الفطر

*T. fertile* AH1

أما الصورة B من إنزيم الكايتينيز فيلاحظ من الشكل (30) أن الرقم الهيدروجيني الأمثل لثباتها يقع بمدى (4.5- 7.5) و هذا يدل على أنها اقل ثباتاً من الصورة A إذ احتفظت الصورة B لإنزيم الكايتينيز بـ (48.7 و 60.52)% من فعاليتها عند الرقمين الهيدروجيين (3 و 9) على التوالي ، بينما فقدت هذه الصورة فعاليتها تماماً عند الرقمين الهيدروجيين (2 و 2.5) . ويبدو أن النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة مقارنة لما وجدته Mahata *et al.* (2008) من أن إنزيم الكايتينيز الخارج خلوي المنقى من العزلتين البكتيريتين (Isolate 99 و *Enterobacter sp.* G-1) كان ثابتاً بمدى رقم هيدروجيني يتراوح بين (4-7) و (3-7) على التوالي . كما ذكر Dahiya *et al.* (2005) أن إنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا *Enterobacter sp.* NRG4 يبدي ثباتاً تجاه رقم هيدروجيني يتراوح بين (4.5-8) ، بينما وجد Omumasaba *et al.* (2001) أن الإنزيم المنقى من الفطر *T. viride* يكون ثابتاً في مدى رقم هيدروجيني يتراوح بين (3.5-6) .



الشكل (30) : الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم الكايتينيز ( الصورة B ) المنقى جزئياً من الفطر

*T. fertile AH1*



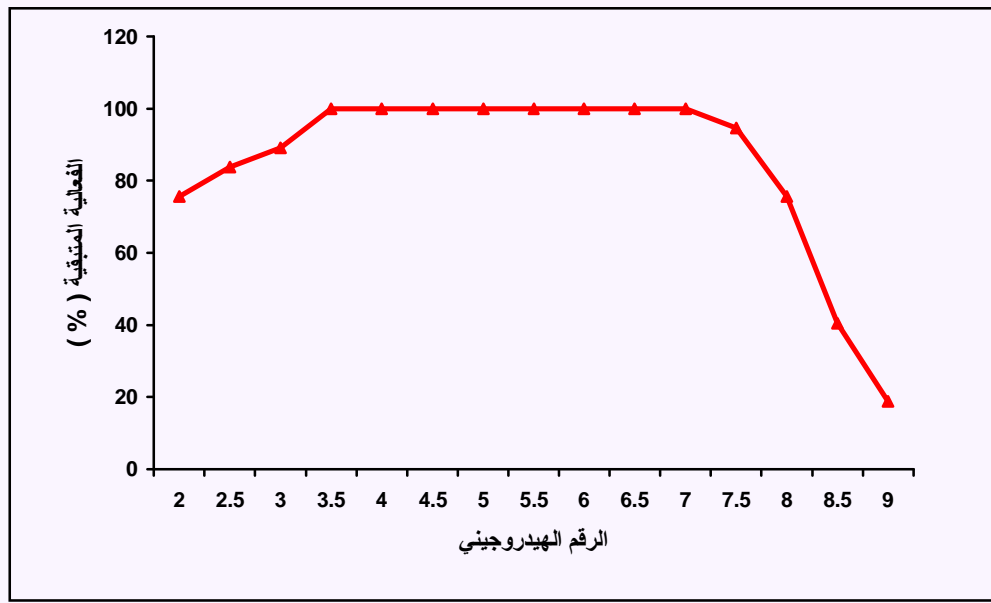
وأوضح (2001) Giambattista *et al.* في دراسة لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات صورتين من إنزيم  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase من الفطر *Penicillium janthinellum* P9 أن الصورة CHI1 كانت ثابتة بمدى رقم هيدروجيني (3-5.5) بينما كانت الصورة CHI2 ثابتة بمدى رقم هيدروجيني (2-4.5) ، في حين كان إنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *Penicillium sp.* (VB2) و البكتريا *Bacillus sp.* (SB5) ثابتاً بمدى من الرقم الهيدروجيني (4-9) و (7-11) على التوالي (Bansode & Bajekal, 2006) .

#### ب - الرقم الهيدروجيني لثبات إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز :

أظهرت النتائج المبينة في الشكل (31) أن إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز يكون ثابتاً عند مدى رقم هيدروجيني يتراوح بين (3.5-7) ، كما يلاحظ أن هذا الإنزيم احتفظ بـ 94.6 % من فعاليته عند الحضان برقم هيدروجيني 7.5 لمدة 30 دقيقة ، فيما انخفضت هذه الفعالية إلى 75.6 % عند الرقم الهيدروجيني 8 .

تعد هذه النتيجة مماثلة لما ذكره (2001) Kulminskaya *et al.* من أن إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الخارجي المنقى من الفطر *T. viride* يبدي ثباتاً تجاه رقم هيدروجيني يتراوح بين (3.5-7.5) . كما وجد (2002) Jian-Yi *et al.* أن إنزيم بيتا-كلوكانيز المنقى من الفطر *T. reesei* GXC كان ثابتاً بمدى من الرقم الهيدروجيني يتراوح بين (3-7) ، في حين كان الإنزيم المنقى من الفطر *T. harzianum* ثابتاً بمدى رقم هيدروجيني (4-6) (Mustafa *et al.*, 2005) . و في دراسة قام بها (2004) Pang *et al.* كان إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الداخلي المنقى من البكتريا *Arthrobacter sp.* يبدي ثباتاً تجاه رقم هيدروجيني يتراوح بين (5-8) .

إن تحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات الإنزيم يعد ضرورياً لتوفير البيئة الملائمة لخزن الإنزيم (Whitaker ,1972) .



الشكل (31) : الرقم الهيدروجيني الأمثل لثبات إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى جزئياً من الفطر

#### *T. fertile* AH1

#### 4- الثبات الحراري للإنزيم :

##### أ- الثبات الحراري لإنزيم الكايتينيز :

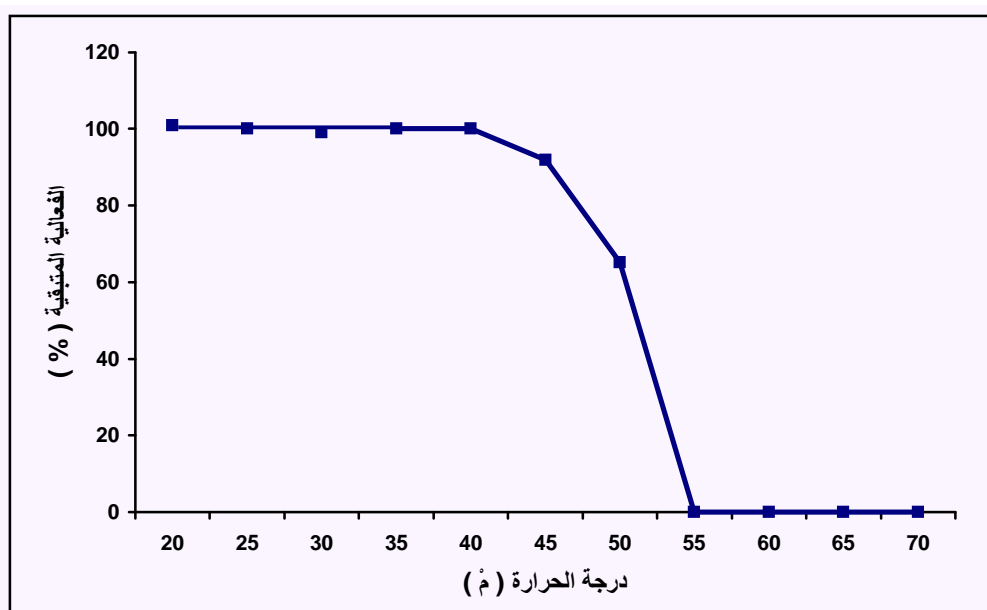
أظهرت نتائج حضان إنزيم الكايتينيز المنقى جزئياً من الفطر *T. fertile* AH1 بدرجات حرارة تتراوح بين (20-80) م° و لمدة 30 دقيقة ، أن الصورة (A) للإنزيم احتفظت بكامل فعاليتها بدرجات حرارة تراوحت بين (20-40) م° (الشكل 32) ، انخفضت بعدها الفعالية الإنزيمية تدريجياً إذ فقدت الصورة المذكورة 8.1 % من فعاليتها بدرجة 45 م° و 35 % بدرجة 50 م° ، و فقدت فعاليتها تماماً بدرجة حرارة 55 م° . أما الشكل (33) فيبين أن الصورة (B) للإنزيم قد احتفظت بكامل فعاليتها بدرجات حرارة تراوحت بين (20-55) م° و فقدت 31.6 % و 55.3 % من فعاليتها بدرجة (60-65) م° على التوالي ، و فقدت فعاليتها تماماً بدرجة حرارة 70 م° .

تبدي اغلب الإنزيمات حساسية لدرجات الحرارة العالية نظراً لتأثر التركيب الثانوي والثالثي

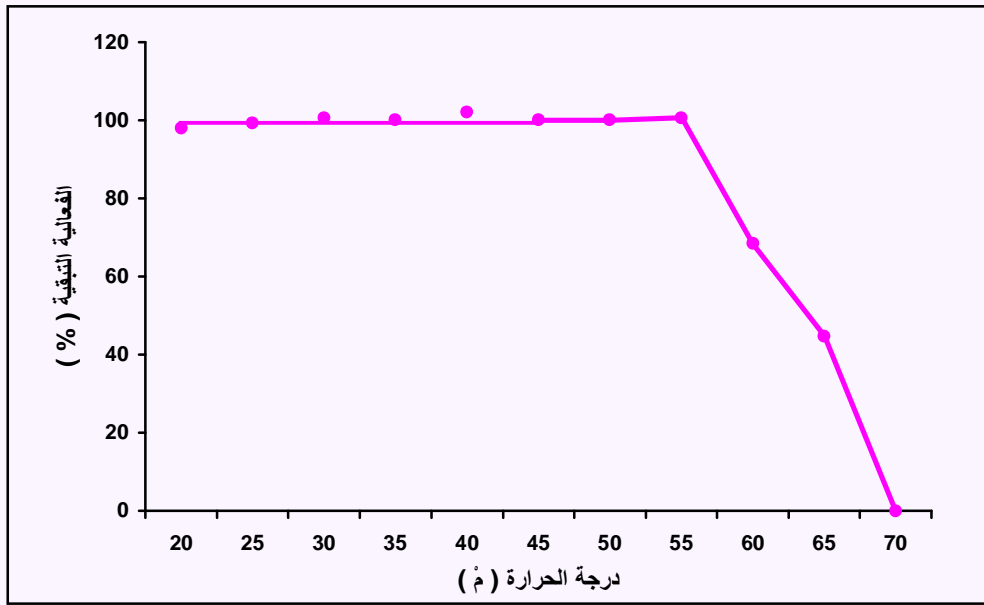
و الرابعي للإنزيم مما يؤدي إلى مسخه و بالتالي فقدان الفعالية الإنزيمية (Whitaker, 1972) .

و تتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه (Kim et al. 2003) من أن إنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا *Streptomyces sp. M-20* يمتلك ثباتاً حرارياً لغاية درجة حرارة 40 م° عند حضنه لمدة 30 دقيقة بدرجات حرارة تتراوح بين (20-80) م°. و وجد (Omumasaba et al. 2001) أن إنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *T. viride* يحتفظ بكامل فعاليته لغاية درجة حرارة 45 م° عند الحضان لمدة ثلاث ساعات ، في حين يتبقى أكثر من 75 % من الفعالية عند درجة حرارة 50 م°. كما أشار (Konagaya et al. 2006) إلى أن الإنزيم المنقى من البكتريا *Clostridium sp. E-16* (chitinase 1) يبدي ثباتاً حرارياً لغاية درجة حرارة 50 م° ، في حين يتبقى 10 % من فعاليته عند الحضان لمدة 90 دقيقة على درجة حرارة 55 م° ، بينما كان الإنزيم (chitinase 2) ثابتاً حرارياً لغاية درجة حرارة 35 م° و يتبقى 20 % من فعاليته عند درجة حرارة 45 م° .

أما عند دراسة الثبات الحراري لإنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا *Burkholderia cepacia Strian KH2* فتبين أن الإنزيم كان ثابتاً حرارياً عند الحضان لمدة ثلاث ساعات لغاية درجة حرارة 50 م° (Ogawa et al., 2002) .



الشكل (32) : الثبات الحراري لإنزيم الكايتينيز (الصورة A) المنقى جزئياً من الفطر *T. fertile AH1*



الشكل (33) : الثبات الحراري لإنزيم الكايتينيز (الصورة B) المنقى جزئياً من الفطر *T. fertile AH1*

#### ب - الثبات الحراري لإنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز :

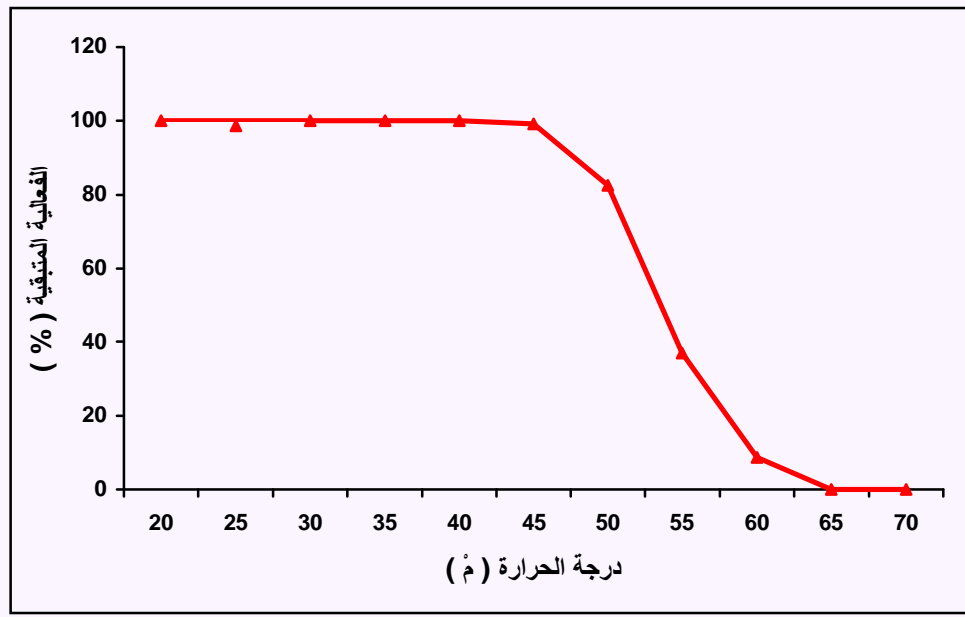
درس تأثير درجة الحرارة في ثبات إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز المنقى جزئياً من الفطر *T. fertile AH1* بمدى درجات حرارة تتراوح بين (20-80) م°. و يلاحظ من النتائج المبينة في الشكل (34) أن للإنزيم ثباتاً حرارياً عند حوضه لمدة 30 دقيقة بدرجات حرارة تتراوح بين (20-45) م° بيد أن الإنزيم فقد 63 % من فعاليته بدرجة حرارة 55 م° ، و فقدتها تماماً بدرجة حرارة 65 م° .

و يمكن أن يعزى سبب الانخفاض في فعالية إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز المنقى في هذه الدراسة عند درجة الحرارة العالية إلى تغير الحالة الطبيعية للإنزيم (denaturation) وأن التغير السريع في طبيعة الإنزيم يؤدي إلى تحطيم الأواصر الهيدروجينية بصورة تؤدي إلى فقدان الإنزيم لفعاليته كلياً (دلالي ، 1989) .

وتعد النتيجة المتحصلة من هذه الدراسة مقارنة لما وجدته Leelasuphakul et al. (2006)

من أن إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز المنقى من البكتريا *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 يحتفظ

بكامل فعاليتته عند درجة حرارة تتراوح بين (20-40) م° بينما يتبقى 50 % من فعاليتته عند حضنه لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 60 م° . كذلك ذكر (Mustafa et al. (2005 أن الإنزيم المنقى من الفطر *T. harzianum* BIO 10671 يمتلك ثباتاً حرارياً لغاية درجة حرارة 50 م° عند حضنه لمدة ساعة على درجات حرارة تتراوح بين (25-75) م° . و عند دراسة الثبات الحراري لإنزيم بيتا-كلوكانيز المنقى من الفطر *T. viride* TP09 لوحظ أن الإنزيم يحتفظ بفعاليتته عند درجات الحرارة (30 و 40 و 50) م° عند الحضان لمدة 120 دقيقة ، بينما يفقد جزءاً من فعاليتته عند الحضان على درجتى حرارة (60-70) م° (Yi et al. , 2008) .



الشكل (34) : الثبات الحراري لإنزيم بيتا-3 كلوكانيز المنقى جزئياً من الفطر *T. fertile* AH1

## 5- تأثير بعض أيونات المعادن و المواد الكيميائية في فعالية الإنزيم :

### أ- تأثير بعض أيونات المعادن و المواد الكيميائية في فعالية إنزيم الكايتينيز :

درس تأثير بعض الأيونات المعدنية و المواد الكيميائية في فعالية إنزيم الكايتينيز بكلتا صورتيه (A) و (B) ، إذ لوحظ أن لهذه الأيونات تأثيراً متبايناً في فعالية الإنزيم قيد الدراسة .

ويتضح من جدول (5) أن هناك تأثيراً حاثاً لكلوريد المنغنيز ( $MnCl_2$ ) و الحديد ( $FeCl_2$ ) في فعالية الصورة A لإنزيم الكايتينيز بمقدار (136 و 141)% و (16.4 و 36.6)% على التوالي باستخدام التركيزين (1 و 5) ملي مولر على التوالي أيضاً ، بينما يلاحظ أن هناك تأثيراً مثبطاً قوياً لأيونات الفضة (Ag) و الزئبق ( $Hg^{+2}$ ) عند التركيز 5 ملي مولر ، فقد كانت الفعالية المتبقية للإنزيم بوجود كلوريد الفضة 35.6 % للتركيز 5 ملي مولر بينما كان لها تأثيراً حاثاً بمقدار 70 % عند التركيز 1 ملي مولر .

أما كلوريد الكالسيوم و كلوريد النيكل فكان تأثيرهما التثبيطي طفيفاً في فعالية الإنزيم (الصورة A) ، إذ انحصرت الفعالية المتبقية للإنزيم بوجود هذين الأيونين بين (75-89)% باستخدام التركيزين (1 و 5) ملي مولر .

أما فيما يتعلق بتأثير المواد الكيميائية الأخرى فكانت الفعالية المتبقية (79.10 و 73.26)% و (79.10 و 65.35)% و (49.25 و 37.62)% باستخدام التركيزين (1 و 5) ملي مولر على التوالي باستخدام كل من الـ EDTA و حامض البوريك و المركابتوايثانول على التوالي أيضاً .

وبالرجوع إلى جدول (5) مرة أخرى يلاحظ أن تأثير الأيونات في فعالية إنزيم الكايتينيز (الصورة B) مشابه لتأثيرها في فعالية (الصورة A) للإنزيم حيث أن لكلوريد المنغنيز و الحديد تأثيراً حاثاً بمقدار (252 و 254)% و (33.3 و 47.2)% على التوالي عند التركيزين (1 و 5) ملي مولر على التوالي أيضاً ، فيما فقدت الصورة الإنزيمية المذكورة فعاليتها تماماً بوجود كلوريد الفضة عند التركيز 5 ملي مولر ، في حين أن لكلوريد الفضة تأثيراً حاثاً عند التركيز 1 ملي

مولر. واحتفظت الصورة B بـ (68 و 72 و 40)% من فعاليتها في تركيز 5 ملي مولر بوجود كلوريدات الكالسيوم و النيكل و الزئبق على التوالي .

أما تأثير المواد الكيميائية الأخرى في فعالية الصورة المذكورة ، فقد احتفظ الإنزيم بـ (66.6 و 61.90 و 64.28)% و (62 و 34 و 50)% من فعاليته باستخدام الـ EDTA و حامض البوريك و المركابتوايثانول على التوالي و عند التركيزين (1 و 5) ملي مولر على التوالي أيضاً .

جاءت هذه النتائج متفقة مع ما وجدته Adrangi *et al.* (2010) إذ كان لأيونات المنغنيز ( $Mn^{+2}$ ) تأثيراً حاثاً في صورتى إنزيم الكايتينيز الداخلي الخارج خلوي (chi-56 و chi-64) المنقى من البكتريا *Massilia timonae* و ازدادت فعاليته بمقدار (17 و 31)% للصورتين المذكورتين على التوالي ، و قد ثبتت الفعالية بوجود أيونات الزئبق ( $Hg^{+2}$ ) بمقدار (42 و 46)% بينما احتفظ الإنزيم بـ (64 و 65)% من فعاليته باستخدام الـ EDTA لصورتي الإنزيم (chi-56 و chi-64) على التوالي .

وأشار Omumasaba *et al.* (2001) إلى أن أيونات الزئبق ( $Hg^{+2}$ ) لها تأثير تثبيطي في فعالية إنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *T. viride* حيث احتفظ بـ (71.9 و 51.5)% من فعاليته بوجود الأيون المذكور عند التركيزين (1 و 5) ملي مولر على التوالي بدرجة حرارة 40 م° ولمدة 15 دقيقة ، معللاً ذلك إلى أهمية مجموعة الثايول (sulfhydryl group) في تعبير (expression) الفعالية الإنزيمية . ووجد كل من Zarain- Herzberg & Arroyo-Begovich (1983) أن إنزيم الكايتينيز المنقى من الفطر *Neurospora crassa* يثبط بنسبة (70 و 100)% بوجود (1 و 5) ملي مولر على التوالي من أيونات الزئبق . و ارتفعت فعالية الإنزيم بمقدار 15% بوجود 10 ملي مولر من كلوريد الحديد ( $FeCl_3$ ) ، أما أيونات المغنيسيوم و الكالسيوم و البوتاسيوم فليس لها تأثير في الفعالية الإنزيمية .

جدول (5) : تأثير بعض الأيونات المعدنية و المواد الكيميائية في فعالية صورتي إنزيم الكايتينيز

(A و B) و إنزيم بيتا1-3 كلوكانيز من الفطر *T. fertile AH1*

الفعالية المتبقية (%) إنزيم بيتا 1-3 كلوكانيز	الفعالية المتبقية (%) لإنزيم الكايتينيز		التركيز (ملي مولر)	الأيون أو المادة الكيميائية
	الصورة B	الصورة A		
100	100	100	-	إنزيم غير معامل
120	352	236	1	كلوريد المنغنيز (MnCl <sub>2</sub> )
244	354	241	5	
35.4	133.3	116.4	1	كلوريد الحديد (FeCl <sub>2</sub> )
35.4	147.2	136.6	5	
49.2	69.0	77.61	1	كلوريد الكالسيوم (CaCl <sub>2</sub> )
15.4	68.0	75.24	5	
66.2	78.5	89.55	1	كلوريد النيكل (NiCl <sub>2</sub> )
13.8	72.0	87.12	5	
41.5	273	170	1	كلوريد الفضة (AgCl)
0.0	0.0	35.6	5	
32.3	92.0	97.0	1	كلوريد الزئبق (HgCl <sub>2</sub> )
24.6	40.0	47.5	5	
72.3	66.6	79.10	1	اثيلين ثنائي أمين رباعي حامض الخليك (EDTA)
32.3	62.0	73.26	5	
73.8	61.90	79.10	1	حامض البوريك (Boric acid)
33.8	34.0	65.35	5	
70.8	64.28	49.25	1	مركابتو ايثانول (mercaptoethanol)
23.1	50.0	37.62	5	



و في دراسة أخرى قام بها Kim *et al.* (2003) لاحظ أن للمركابتوايثانول تأثيراً حاثاً في فعالية الإنزيم المنقى من البكتريا *Streptomyces sp. M-20* ، و كانت الفعالية المتبقية للإنزيم (80 و 87)% بوجود أيونات الحديد ( $Fe^{+2}$ ) و المنغنيز ( $Mn^{+2}$ ) على التوالي عند التركيز 1 ملي مولر ، بينما أدى استخدام أيونات الفضة و الزئبق إلى بقاء 35% من الفعالية بوجود أيونات الفضة و فقدانها تماماً بوجود أيون الزئبق .

#### ب - تأثير بعض أيونات المعادن و المواد الكيميائية في فعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز :

يتضح من جدول (5) أن تأثير الأيونات و المواد الكيميائية في فعالية الإنزيم كان تأثيراً تنشيطياً ماعداً أيون المنغنيز ( $Mn^{+2}$ ) الذي أبدى تأثيراً حاثاً بمقدار (20 و 144)% باستخدام التركيزين (1 و 5) ملي مولر على التوالي . و فقد إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز فعاليته تماماً بوجود كلوريد الفضة عند التركيز 5 ملي مولر بينما احتفظ بـ 41.5 % من فعاليته في تركيز 1 ملي مولر . كما أن لأيونات الحديد ( $Fe^{+2}$ ) و الكالسيوم ( $Ca^{+2}$ ) و النيكل ( $Ni^{+2}$ ) و الزئبق ( $Hg^{+2}$ ) تأثيراً مثبطاً قوياً ، إذ كانت الفعالية المتبقية للإنزيم بوجود كلوريدات الحديد و الكالسيوم و النيكل و الزئبق (35.4 و 15.4 و 13.8 و 24.6)% على التوالي عند التركيز 5 ملي مولر .

أما تأثير المواد الكيميائية الأخرى فكانت الفعالية المتبقية للإنزيم (72.3 و 32.3)% و (73.8 و 33.8)% و (70.8 و 23.1)% باستخدام التركيزين (1 و 5) ملي مولر على التوالي باستخدام كل من الـ EDTA و حامض البوريك و المركابتوايثانول على التوالي أيضاً .

و يعود سبب تأثير أيونات المعادن في فعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز نتيجة ارتباط الأيونات بالموقع الفعّال للإنزيم ( الذي من خلاله يرتبط بالمادة الأساس و يطلها ) مما يؤدي إلى منع الفعالية الإنزيمية من الوصول إلى المستوى المثالي (Watanabe *et al.* ,1988) .

أما تثبيط الفعالية الإنزيمية بوجود أيون الزئبق فيعود إلى ارتباط الأيون مع مجموعة الثايول (SH group) لثمالة حامض السستئين (cysteine) الضرورية للفعل الحفزي (catalytic action) لإنزيم بيتا-كلوكانيز (Fukuda *et al.*, 2008).

أشارت بعض الدراسات إلى التأثير الحاد لأيون المنغنيز في فعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى من الفطريات ، فقد وجد (Sun *et al.* (2006) أن فعالية الإنزيم المنقى من الفطر *Chaetomium sp.* ارتفعت بمقدار 80 % بوجود 5 ملي مولر من أيون المنغنيز ( $Mn^{+2}$ ) ، بينما ثبتت الفعالية بمقدار 50 % بوجود أيون الحديد ( $Fe^{+3}$ ) عند نفس التركيز ، أما أيونات الكالسيوم و النحاس و المغنيسيوم و الزنك فلها تأثير قليل في الفعالية . كما ذكر (Kulminskaya *et al.* (2001) أن لأيون المنغنيز تأثيراً حاداً في فعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز الخارجي المنقى من الفطر *T. viride* عند تركيز 1 ملي مولر ، في حين كان تأثير أيونات  $Mg^{+2}$  و  $Zn^{+2}$  و  $Hg^{+2}$  و الـ EDTA طفيفاً ، إذ احتفظ الإنزيم بـ (89 و 83 و 86 و 81) % من فعاليته بوجود الأيونات المذكورة و الـ EDTA على التوالي .

و أوضح (Sanchez *et al.* (1982) أن فعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى من الفطر *Penicillium italicum* قد ثبتت بنسبة (71 و 90) % بوجود أيونات الزئبق ( $Hg^{+2}$ ) عند التركيزين (1 و 5) ملي مولر على التوالي ، بيد أن فعالية الإنزيم لم تتأثر بوجود التركيز نفسه من أيونات الكالسيوم و المنغنيز و المغنيسيوم . و ثبتت تماماً فعالية إنزيم بيتا-1-3 كلوكانيز المنقى من الفطر *T. harzianum* بوجود كلوريد الزئبق ( $HgCl_2$ ) ، بينما كان لأيونات الزنك ( $Zn^{+2}$ ) تأثيراً حاداً للفعالية (Noronha & Ulhoa, 2000).

### 6-3 السيطرة الحيوية :

درس تأثير الراشح الإنزيمي الخام المنتج من الفطر *T. fertile* AH1 [ الحاوي على فعالية إنزيمية لإنزيمي الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز بمقدار (0.14 و 14.32) وحدة /مليتر على التوالي، بالإضافة إلى فعالية إنزيمية لإنزيم البروتينيز بمقدار 2.5 وحدة /مليتر ] في تثبيط نمو

الفطريات الممرضة للنبات *Rhizoctonia* و *F. oxysporum* و *Fusarium solani* و الفطر *Aspergillus flavus* المنتج للسم افلاتوكسين (Aflatoxin) لمدة 72 ساعة باستخدام تراكيز مختلفة من ( الإنزيم : الوسط ) . و يتضح من جدول (6) أن نسبة تثبيط نمو الفطر *F. solani* بلغت 100 % لكل التراكيز المستخدمة في الدراسة ، كما كانت نسبة التثبيط 100 % باستخدام التركيز (1 : 1) (إنزيم : وسط) للفطريات *F. oxysporum* و *R. solani* و *A. flavus* بينما انخفضت إلى (54.5 و 62.5 و 44.4) % و (43.2 و 50 و 22.2) % للفطريات الثلاثة على التوالي باستخدام التركيزين (1 : 3 و 1 : 9) على التوالي أيضاً .

بما أن الجدران الخلوية للفطريات تتكون بصورة رئيسة من الكايتين والكلوكان ، لذا تعد إنزيمات الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز من الإنزيمات الأساسية المسؤولة عن تحليل و تحطيم الجدران الخلوية للفطريات (Kucuk & Kivanc, 2004) ، إضافة إلى إنزيم البروتيناز الذي يعمل على تحطيم البروتين الموجود في الجدار الخلوي للفطريات (Flores et al. , 1997) .

كما يتضح أيضاً من النتائج المبينة في جدول (6) أن أعلى نسبة تثبيط كانت باستخدام التركيز (1 : 1) وانخفضت باستخدام التركيز (1 : 3) ، بينما أدى استخدام التركيز (1 : 9) إلى الحصول على أوطأ نسبة تثبيط لنمو الفطريات الممرضة قيد الدراسة ، يمكن الاستنتاج من هذه النتائج أن نسبة التثبيط تزداد بزيادة تركيز الإنزيم بالنسبة للوسط PDA .

يعد الفطر *Trichoderma* spp. من أهم عوامل السيطرة الحيوية و أكثرها شيوعاً في العالم (Rajendiran et al. , 2010) للدور المهم الذي تلعبه الإنزيمات المحللة للجدران الخلوية الفطرية ( مثل الكايتينيز و الكلوكانيز ) في عملية تضاد الفطر مع مدى واسع من الممرضات النباتية الفطرية (Kucuk & Kivanc, 2008) .

جدول (6) : تأثير الراشح الإنزيمي الخام المنتج من الفطر *T. fertile AH1* في تثبيط نمو الفطريات الممرضة

نسبة التثبيط (%)			الفطر الممرض
( 1 : 9 ) إنزيم : وسط	( 1 : 3 ) إنزيم : وسط	( 1 : 1 ) إنزيم : وسط	
100	100	100	<i>Fusarium solani</i>
43.2	54.5	100	<i>F. oxysporum</i>
50	62.5	100	<i>Rhizoctonia solani</i>
22.2	44.4	100	<i>Aspergillus flavus</i>

هنالك العديد من الدراسات التي أشارت إلى أهمية إنزيمات الكايتينيز و بيتا-1-3 كلوكانيز و البروتينيز في السيطرة الحيوية ضد الممرضات النباتية الفطرية ، ففي دراسة عن تأثير إنزيم الكايتينيز المنتج من الفطر *T. harzianum* Rifai أشارت عبيد (2006) إلى أن نسبة تثبيط نمو الفطر *R. solani* على وسط PDA برقم هيدروجيني 4 بلغت 64 % باستعمال الراشح الإنزيمي المركز بالأسيتون ، بينما انخفضت إلى 13 % باستعمال الراشح الإنزيمي الخام و وصلت إلى 8 % باستعمال الراشح الإنزيمي المعامل حرارياً . و في دراسة قام بها Wang et al. (2006) لبيان تأثير إنزيم الكايتينيز المنتج من البكتريا *Bacillus subtilis* W-118 ، أشار فيها إلى أن نسبة تثبيط نمو الفطر *F. oxysporum* كانت 100 % بفعالية إنزيمية 5.6 وحدة /مليتر باستخدام تركيز (1 : 1) عند درجة حرارة 25 م° . و أوضح Taechowisan et al. (2003) أن لإنزيم الكايتينيز المنقى من البكتريا *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 تأثيراً تثبيطياً على نمو الفطر *F. oxysporum* في وسط PDA و بتركيز مختلفة (5 و 2.5 و 1.25) ملغم /مليتر لمدة 5 أيام بدرجة حرارة 30 م° .

و أشار (2002) Haggag إلى إمكانية تثبيط نمو الفطر الممرض *Botrytis cinerea* باستخدام تركيز 50 % من إنزيم الكايتينيز المنتج من العزلتين *T. koningii* و *T. harzianum* ، حيث كانت نسبة التثبيط 100 % باستخدام النوع الطافر لكلا العزلتين (TKS و TH12) و انخفضت إلى (60.7 و 57.31%) للنوع البري للفطرين المذكورين على التوالي . كما وجد (2010) Anitha & Rabeeth أن إنزيم الكايتينيز المنتج من البكتريا *Streptomyces griseus* يعمل على تثبيط نمو الفطريات (*F. solani* و *R. solani* و *F. oxysporum* و *Alternaria alternate* و *A. flavus* AFC5 و *A. flavus* AFC6) . وذكر (2010) Rajendiran et al. أن للفطر *T. viride* القابلية على تثبيط نمو الفطريات (*Aspergillus niger* و *A. flavus* و *A. fumigatus* و *Fusarium sp.* و *Penicillium sp.*) بنسبة (55 و 51 و 52 و 64 و 54%) على التوالي ، معللاً سبب ذلك بإنتاج إنزيمات الكايتينيز و الكلوكانيز أو إنتاج المضاد الحيوي ، في حين وجد (2002) De Marco & Felix أن لإنزيم البروتينيز المنقى من الفطر *T. harzianum* القابلية على تحليل الجدار الخلوي للفطر الممرض *Crinipellis perniciosus* ، مشيراً في ذلك إلى دور الإنزيم في التضاد الإحيائي بين الفطر و الفطريات الممرضة .

الاستنتاجات

و

التوصيات

*Conclusions and  
Recommendations*

## الاستنتاجات (Conclusions) :

- 1- تم الحصول على عزلة فطرية كفوءة في إنتاج الإنزيمات المحللة لجدران الفطريات .
- 2- التوصل إلى وسط غذائي مناسب واقتصادي لإنتاج الإنزيمات المحللة لجدران الفطريات .
- 3- تميزت الإنزيمات المنتجة من الفطر قيد الدراسة بكفاءتها في تثبيط نمو بعض الفطريات الممرضة للنبات فضلاً عن الفطر المنتج للسم افلاتوكسين (Aflatoxin) مما يتيح إمكانية استخدامها في السيطرة الحيوية .

## التوصيات (Recommendations) :

- 1- البحث عن مصادر ميكروبية جديدة لاستخدامها في السيطرة الحيوية .
- 2- التوسع في دراسة دور الإنزيمات المنتجة قيد الدراسة في تثبيط مجاميع أخرى من الفطريات سواء الممرضة منها للنبات أو الحيوان .

المصادر

*References*



## المصادر

### المصادر العربية

الجراح، علاء هاني حسن . (1994) . عزل و تشخيص الأحياء المجهرية المحللة للكابتين في التربة و دراسة قابليتها على تحليل جدران بعض الفطريات . رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة بابل .

الحيدري، نظام كاظم والمصلح، رشيد محجوب . (1989) . الأحياء المجهرية الصناعية . الطبعة الأولى ، جامعة بغداد .

الحيدري، نظام كاظم . (1991) . التطبيقات الصناعية للأحياء المجهرية . في: علم الأحياء المجهرية . تأليف لجنة من تدريسي قسم علوم الحياة . جامعة بغداد / وزارة التعليم العالي و البحث العلمي .

الخفاجي، زهرة محمود . (1990) . التقنية الحيوية . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي / جامعة بغداد . مطابع دار الحكمة للطباعة و النشر .

الدليمي، خلف صوفي داود . (2002) . الإنزيمات المايكروبية و التقانات الحيوية . المكتبة الوطنية . عمان - الأردن .

الداودي، علي محمد حسن . (1991) . الكيمياء الحيوية المتقدمة . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي / جامعة بغداد - كلية الزراعة .

السعد، مها رؤوف . (1991) . النمو . في: علم الأحياء المجهرية . تأليف لجنة من تدريسي قسم علوم الحياة . جامعة بغداد / وزارة التعليم العالي و البحث العلمي .

الشعبي، صلاح وملوحي، جورج ومطروود، لينا . (2007) . مكافحة مرض سقوط بادرات البندورة / الطماسة (*Rhizoctonia solani* Kuhn) باستخدام الفطر *Trichoderma koningii* Oudem و المبيدين فلوتولانيل و تولكلوفوس ميثيل . مجلة وقاية النبات العربية . 25: 15-27 .

المفرجي، طالب كاظم . (1991) . الأحياء المجهرية لمياه المجاري و المياه . في: علم الأحياء المجهرية . تأليف لجنة من تدريسي قسم علوم الحياة . جامعة بغداد / وزارة التعليم العالي و البحث العلمي .

دلالي، باسل كامل . (1986) . أساسيات الكيمياء الحيوية . جامعة الموصل / وزارة التعليم العالي و البحث العلمي .

ساجدي، عادل جورج و علي، علاء يحيى محمد . (1987) . أساسيات التخمرات الصناعية ، الجزء الأول . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي / جامعة البصرة . مطبعة جامعة البصرة .

ساجدي، عادل جورج و علي، علاء يحيى محمد . (1983) . كيمياء الأغذية . (ترجمة) . كلية الزراعة / جامعة البصرة . تأليف : أل. دبليو. أورانند و أي. إي. وودز . الطبعة الأولى .

صالح، ضحى سعد . (1991) . تغذية الأحياء المجهرية . في: علم الأحياء المجهرية . تأليف لجنة من تدريسي قسم علوم الحياة . جامعة بغداد / وزارة التعليم العالي و البحث العلمي .

عبيد، زينة هادي . (2006) . دراسة مختبرية لتأثير إنزيم الكايتينيز في عملية التضاد بين الفطرين *Trichoderma harzianum* Rifai و *Rhizoctonia solani* Kuhn . رسالة ماجستير /كلية العلوم / جامعة بابل .

كمال الدين، زاهد نوري علي . (2008) . تأثير التداخل بين الفطرين *Trichoderma harzianum* Rifai و *Aspergillus niger* Van Tieghem في حماية نباتات الطماطة من الإصابة بالفطر *Fusarium oxysporum f. sp. Lycopersici* . رسالة ماجستير /كلية الزراعة / جامعة الكوفة .

محمود، ميس عماد احمد . (2007) . إنتاج إنزيم Chitinase من بكتريا *Serratia marcescens* باستخدام حالة التخمرات السائلة و الصلبة ودوره في المعالجة الحيوية . رسالة ماجستير / كلية العلوم / جامعة بغداد .

- Abd-Aziz**, S. ; Sin, T. L. ; Alitheen, N. ; Shahab, N. and Kamaruddin, K. (2008) . Microbial Degradation of Chitin Materials by *Trichoderma virens* UKM1 . Journal of Biological Sciences , 8(1): 52-59 .
- Abeyasinghe**, S.(2007). Biological control of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* the causal agent of root rot of bean using *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU01.Ruhuna Journal of Science, 2: 82-88.
- Adams**, D. J. (2004) . Fungal cell wall chitinases and glucanases . Microbiology , 150: 2029-2035 .
- Adrangi**, S.; Faramarzi, M.A.; Shahverdi, A. R. and Sepehrizadeh, Z. (2010). Purification and characterization of two extracellular endochitinases from *Massilia timonae* . Carbohydrate Research, 345: 402-407.
- Al Ahmadi**, K. J. ; Yazdi, M. T. ; Najafi, M. F. ; Shahverdi, A. R. ; Faramarzi, M. A. ; Zarrini, G. and Behravan, J. (2008a) . Isolation and Characterization of a Chitinolytic Enzyme Producing Microorganism, *Paenibacillus chitinolyticus* JK2 from Iran . Research Journal of Microbiology , 3(6): 395-404 .
- Al Ahmadi**, K. J.; Yazdi, M. T. ; Najafi, M. F. ; Shahverdi, A. R. ; Faramarzi, M. A. ; Zarrini, G. and Behravan, J. (2008b). Optimization of Medium and Cultivation Condition for Chitinase Production by the Newly Isolated : *Aeromonas* sp. Biotechnology , 7(2): 266-272 .
- Al-Douri**, S. S. (2003) . Characteristics of Alkaline Protease Produced by *P. aeruginosa* . MSc. Thesis , College of Science , Saddam University .
- Alexopoulos**, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M. (1996) . Introductory Mycology, 4th Ed., 869 pp., John Wiley and Sons, New York .Cited

from Kemal Al-Deen (2008) MSc. Thesis, Agriculture College, University of Kufa (In Arabic) .

**Allardyce**, B. J. and Linton, S. M. (2008). Purification and characterization of endo- $\beta$ -1,4-glucanase and laminarinase enzymes from the gecarcinid land crab *Gecarcoidea natalis* and the aquatic crayfish *Cherax destructor* . *The Journal of Experimental Biology* , 211: 2275-2287.

**Anitha**, A. and Rabeeth, M. (2010) . Degradation of fungal cell walls of phytopathogenic fungi by lytic enzyme of *Streptomyces griseus* . *African Journal of Plant Science* , 4 (3): 061-066 .

**Aono**, R. ; Sato, M. ; Yamamoto, M. and Horikoshi, K. (1992) . Isolation and Partial Characterization of an 87-Kilodalton  $\beta$ -1,3-Glucanase from *Bacillus circulans* IAM1165. *Applied and Environmental Microbiology* , 58(2): 520-524 .

**Aranaz**, I. ; Mengíbar, M. ; Harris, R. ; Paños, I. ; Miralles, B. ; Acosta, N. ; Galed, G. and Heras, Á. (2009) . Functional Characterization of Chitin and Chitosan . *Current Chemical Biology* , 3: 203-230 .

**Bamforth**, C. W. (1980) . The adaptability, purification and properties of exo- $\beta$ 1,3-glucanase from the fungus *Trichoderma reesei* . *Biochem. J.* , 191: 863-866 .

**Bansode**, V. B. and Bajekal, S. S. (2006) . Characterization of chitinases from microorganism isolated from Lonar lake . *Indian Journal of Biotechnology* , 5: 357-363 .

**Bara**, M. T. F. ; Lima, A. L. and Ulhoa, C. J. (2003) . Purification and characterization of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum* . *FEMS Microbiology Letters* , 219: 81-85.

- Barakat, R. M. ; Al-Mahareeq, F. ; Ali-Shtayeh, M. S. and Al-Masri, M. I.** (2007) . Biological control of *Rhizoctonia solani* by indigenous *Trichoderma* spp. Isolates from Palestine . Hebron University Research Journal , 3: 1-15 .
- Berahim, Z.** (2007) . Production of Chitinase by a Locally isolated fungus . MSc. Thesis , Universiti Putra Malaysia .
- Bhargava, M.** (2008) . Handbook of Fungal Diseases of Plants and Their Control . Dominant Publishers and Distributors, First Edition .
- Binod, P. ; Pusztahelyi, T. ; Nagy, V. ; Sandhya, C. ; Szakacs, G. ; Pocs, I. and Pandey, A.** (2005) . Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation . Enzyme and Microbial Technology , 36: 880-887 .
- Binod, P. ; Sandhya, C. ; Suma, P. ; Szakacs, G. and Pandey, A.** (2007) . Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of N-acetyl-D-glucosamine from colloidal chitin . Bioresource Technology , 98: 2742-2748 .
- Bissett, J.** (1991) . A revision of the genus *Trichoderma* . II. Infrageneric classification . Can. J. Bot. , 69: 2357-2372 .(Cited from Druzhinina & Kubicek ,2005) .
- Boing, J. T. P.** (2004) . Enzyme Production . in Prescott and Dunn's industrial Microbiology . Edited by Gerold Reed . Wisconsin . Fourth edition .
- Boeckmann, B. ; Bairoch, A. ; Apweiler, R. ; Blatter, M.-C. ; Estreicher, A. ; Gasteiger, E. ; Martin, M. J. ; Michoud, K. ; O'Donovan, C. ; Phan, I. et al.** (2003). The SWISSPROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. Nucleic Acids Res., 31: 365-370. (Cited from Allardyce and Linton ,2008) .

- Bradford**, M. M. (1976) . A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding . *Analytical Biochemistry* , 72: 248-254 .
- Bruce**, A. ; Srinivasan, U. ; Staines, H. J. and Highley, T. L. (1995) . Chitinase and Laminarinase Production in Liquid Culture by *Trichoderma* spp. and their Role in Biocontrol of Wood Decay Fungi . *International Biodeterioration & Biodegradation* , 337- 353 .
- Budiarti**, S. W. ; Widyastuti, S. M. and Margina, S. (2009) . Purification and Characterization of  $\alpha$ -1,3-Glucanase from the Antagonistic Fungus *Trichoderma reesei* . *HAYATI Journal of Biosciences* , 16(3): 115-119 .
- Burgess**, R. R. (2008) . Protein Purification . in: *Proteomics of the Nervous System* . Edited by Nothwang, H. G. & Pfeiffer, S. E. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim .
- Cannon**, R. D. ; Niimi, K. ; Jenkinson, H. F. and Shepherd, M. G. (1994) . Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* beta-N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene . *J. Bacteriol* , 176: 2640-2647. (Cited from Duo-Chuan ,2006) .
- Casida**, L. E. Jr. (1968) . *Industrial microbiology* . John Wiley and Sons , Inc. , New York .
- Celestino**, K. R. S. ; Cunha, R. B. and Felix, C. R. (2006) . Characterization of a  $\beta$ -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry . *BMC Biochemistry* , 7: 23 .
- Cortes**, C. ; Gutierrez, A. ; Olmedo, V. ; Inbar, J. ; Chet, I. and Herrera-Estrella, A. (1998) . The expression of genes involved in parasitism by *Trichoderma harzianum* is triggered by a diffusible factor . *Mol. Gen. Genet.* , 260: 218-225 .

- Dahiya**, N. ; Tewari, R. ; Tiwari, R. P. and Hoondal, G. S. (2005) . Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: Its purification, characterization and reaction pattern . *Electronic Journal of Biotechnology* , 8 (2) .
- Dake**, M. S. ; Jadhav, J. P. and Patil, N. B. (2004) . Induction and properties of (1 → 3)-β-D-glucanase from *Aureobasidium pullulans* . *Indian Journal of Biotechnology* , 3: 58-64 .
- De La Cruz**, J. ; Pintor-Toro, J. A. ; Benitez, T. ; Llobell, A. and Romero, L. C. (1995a) . A Novel Endo-β-1,3-Glucanase, BGN13.1, Involved in the Mycoparasitism of *Trichoderma harzianum* . *Journal of Bacteriology* , 177(23): 6937-6945 .
- De La Cruz**, J. ; Pintor-Toro, J. A. ; Benitez, T. and Llobell, A. (1995b) . Purification and Characterization of an Endo-β-1,6-Glucanase from *Trichoderma harzianum* That Is Related to Its Mycoparasitism . *Journal of Bacteriology* , 177(7): 1864-1871 .
- De La Cruz**, J. ; Rey, M. ; Lora, J. M. ; Hidalgo-Gallegn, A. ; Dominguez, F. ; Pintor-Toro, J. ; Llobell, A. and Benitez, T. (1993) . Carbon source control on β- glucanase , chitobiase and chitinase from *Trichoderma harzianum* . *Arch. Microbiol.* , 159: 316-322 .
- de Man**, J. M. (2007) . *Principles of Food Chemistry* . Third Edition . Springer International Edition .
- De Marco**, J. L. ; Valadares-Inglis, M. C. and Felix, C. R. (2003) . production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso* , the causal agent of witches' broom of coca . *Brazilian Journal of Microbiology* , 34: 33-38 .



- De Marco, J. L. ; Valadares-Inglis, M. C. and Felix, C. R. (2004) .**  
Purification and characterization of an N-acetylglucosaminidase  
produced by a *Trichoderma harzianum* strain which controls  
*Crinipellis pernicioso* . Appl. Microbiol. Biotechnol. , 64: 70-75 .
- De Marco, J. L. and Felix, C. R. (2002) .** Characterization of a protease  
produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa  
plant witches' broom disease . BMC Biochemistry , 3: 3 .
- de Marco, J. L. and Felix, C. R. (2007) .** Purification and Characterization of  
a  $\beta$ -Glucanase Produced by *Trichoderma harzianum* Showing  
Biocontrol Potential . Brazilian Archives of Biology and  
Technology , 50(1): 21-29 .
- Desai, S. ; Thakur, R. P. ; Rao, V. P. and Anjaiah, V. (2000).** Characterization  
of Isolates of *Trichoderma* for Biocontrol Potential Against  
*Aspergillus flavus* Infection in Groundnut . IAN , 20: 57-59 .
- Donderski, W. and Trzebiatowska, M. (1999) .** Chitinase Activity Production  
by Planktonic, Benthic and Epiphytic Bacteria Inhabiting the Moty  
Bay of the Jeziorak Lake (Poland) . Polish Journal of Environmental  
Studies , 8(4): 215-220 .
- Druzhinina, I. and Kubicek, C. P. (2005) .** Species concepts and biodiversity  
in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species  
clusters . J. Zhejiang Univ. SCI. , 6B(2): 100-112 .
- Duo-Chuan, L. (2006) .** Review of fungal chitinases . Mycopathologia , 161:  
345-360 .
- Duo-Chuan, L. I. ; Chen, S. and Jing, L. U. (2005) .** Purification and partial  
characterization of two chitinases from the mycoparasitic fungus  
*Talaromyces flavus* . Mycopathologia , 159: 223-229 .

- Dutta, P. K. ; Dutta, J. and Tripathi, V. S. (2004) . Chitin and chitosan : chemistry, properties and application . Journal of Scientific and Industrial Research , 63: 20-31 .**
- Egorov, N. S. (1985) . Antibiotics a Scientific approach . Mir Publishers . Moscow .**
- Elad, Y. (2000) . Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action . Crop Protection , 19: 709-714 .**
- Elad, Y. ; Chet, I. and Katan, J. (1980) . *Trichoderma harzianum* : A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* . Phytopathology , 70: 119-121 .**
- El-Katatny, M. H.; Somitsch, W.; Robra, K.-H.; El-Katatny, M. S. and Gübitz, G. M. (2000). Production of Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for Control of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotium rolfsii*. Food technol. biotechnol., 38(3):173-180.**
- El-Katatny, M.H. ; Gudelj, M. ; Robra, K.-H. ; Elnaghy, M.A. and Gübitz, G.M. (2001) . Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii* . Appl. Microbiol. Biotechnol., 56: 137-143.**
- Erflle, J. D. and Teather, R. M. (1991) . Isolation and Properties of a (1,3)- $\beta$ -D-Glucanase from *Ruminococcus flavefaciens* . Applied and Environmental Microbiology , 57(1): 122-129 .**
- Faramarzi, M. A. ; Fazeli, M. ; Yazdi, M. T. ; Adrangi, S. ; Al Ahmadi, K. J. ; Tasharrofi, N. and Mohseni, A. (2009) . Optimization of Cultural Conditions for Production of chitinase by a Soil Isolate of *Massilia timonae* . Biotechnology , 8(1): 93-99 .**

- Fenice, M. ; Selbmann, L. ; Giambattista, R. D. and Federici, F. (1998) .**  
Chitinolytic activity at low temperature of an Antarctic strain (A3)  
of *Verticillium lecanii* . Res. Microbiol. , 149: 289-300 .
- Ferracini-Santos, L. and Sato, H. H. (2009) .** Production of alkaline protease  
from *Cellulosimicrobium cellulans* . Brazilian Journal of  
Microbiology , 40: 54-60 .
- Fleuri, L. F. ; Kawaguti, H. Y. and Sato, H. H. (2009) .** Production,  
purification and application of extracellular chitinase from  
*Cellulosimicrobium cellulans* 191 . Brazilian Journal of  
Microbiology , 40: 623-630 .
- Flores, A. ; Chet, I. and Herrera-Estrella, A. (1997) .** Improved biocontrol  
activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the  
proteinase-encoding gene *prb1* . Curr. Genet. , 31: 30-37.
- Fukuda, K. ; Hiraga, M. ; Asakuma, S. ; Arai, I. ; Sekikawa, M. and  
Urashima, T. (2008) .** Purification and Characterization of a Novel  
Exo- $\beta$ -1,3-1,6-glucanase from the Fruiting Body of the Edible  
Mushroom Enoki (*Flammulina velutipes*) . Biosci. Biotechnol.  
Biochem. , 72(12): 3107-3113 .
- Gamayurova, V. S. ; Kotlyar, M. N. ; Shabrukova, N. V. and Khalitov, F. G.  
(1999) .** Synthesis of soluble derivatives of chitin-glucan complex .  
Chemistry and Computational Simulation . Butlerov  
Communications, No. 1, pp. 73-76 .
- Gams, W. and Bissett, J. (1998) .** Morphology and identification of  
*Trichoderma* . in: *Trichoderma and Gliocladium* . vol.1. Basic  
biology, taxonomy and genetics, Edited by Kubicek, C.P. and  
Harman, G.E. Taylor & Francis Ltd . , London.

- Ghanem**, K. M. ; Al-Garni, S. M. and Al-Makishah, N. H. (2010) . Statistical optimization of cultural conditions for chitinase production from fish scales waste by *Aspergillus terreus* . African Journal of Biotechnology , 9(32): 5135-5146 .
- Giambattista**, R. D. ; Federici, F. ; Petruccioli, M. and Fenice, M. (2001) . The chitinolytic activity of *Penicillium janthinellum* P9: purification, partial characterization and potential applications . Journal of Applied Microbiology , 91: 498-505 .
- Goodrich**, T. D. and Morita, R. Y. (1977) . Incidence and Estimation of Chitinase Activity Associated with Marine Fish and Other Estuarine Samples . Marine Biology , 41: 349 .
- Gooday**, G. W. (1995) . Diversity of Roles for Chitinases in Nature . in: Chitin and Chitosan: The Versatile Environmentally Friendly Modern Materials . edited by Zakaria, M.B. ; Muda, W.M.W. and Abdullah, Md.P. Universiti Kebangsaan Malaysia : no. 28 .
- Govindsamy**, V. ; Gunaratna, K. R. and Balasubramanian, R. (1998) . properties of extracellular chitinase from *Myrothecium verrucaria*, an antagonist to the groundnut rust *Puccinia arachidis* . Can. J. Plant Pathol. , 20: 62-68 .
- Graham**, L. S. and Sticklen, M. B. (1994) . Plant Chitinase . Can. J. Bot. , 72: 1057-1083 . (Cited from Duo-Chuan ,2006) .
- Grenier**, J. ; Potvin, C. and Asselin, A. (1993) . Barley Pathogenesis-Related Proteins with Fungal Cell Wall Lytic Activity Inhibit the Growth of Yeasts . Plant Physiol. , 103: 1277-1283 .
- Grosch**, R. ; Lottmann, J. ; Rehn, V. N. C. ; Rehn, K. G. ; Mendonca-Hagler, L. ; Smalla, K. and Bery, G. (2007) . Analysis of antagonistic interaction between *Trichoderma* isolates from Brazilian Weeds and

the soil-borne pathogen *Rhizoctonia solani* . Journal of Plant Diseases and Protection , 114(4): 167- 175 .

**Haggag**, W. M. (2002) . Induction of hyperproducing chitinase *Trichoderma* mutants for efficient biocontrol of *Botrytis cinerea* on tomato and cucumber plants growing in plastic houses . Arab J. Biotech. , 5(2): 151-164.

**Haggag**, W. M. ; Kansoh, A. L. ; and Aly, A. M. (2006) . Proteases From *Talaromyces flavus* and *Trichoderma harzianum* : Purification , Characterization and Antifungal Activity Against Brown Spot Disease on Faba Bean. Plant Pathol. Bull. , 15: 231-239 .

**Haq**, I.-U. ; Mukhtar, H. and Umer, H. (2006) . Production of Protease by *Penicillium chrysogenum* Through Optimization of Environmental Conditions . J. Agri. Soc. Sci. , 2(1): 23-25 .

**Harman**, G. E. (2006) . Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology , 96: 190-194 .

**Harman**, G. E. ; Hayes, C. K. ; Lorito, M. ; Broadway, R. M. ; Di Pietro, A. ; Peterbauer, C. and Tronsmo, A. (1993) . Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum* : Purification of Chitinobiosidase and Endochitinase . Phytopathology , 83: 313-318 .

**Harman**, G. E. ; Howell, C. R. ; Viterbo, A. ; Chet, I. and Lorito, M. (2004) . *Trichoderma* species-opportunistic , avirulent plant symbionts . Nature Reviews Microbiology , 2: 43-56 .

**Harvey**, L. M. and McNeil, B. (2008) . The Design and Preparation of Media for Bioprocesses . in Practical Fermentation Technology . Edited by McNeil, B. and Harvey, L. M. , John Wiley and Sons , Ltd.

- Hong, T.-Y. ; Cheng, C.-W. ; Huang, J.-W. and Meng, M. (2002) .** Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3- $\beta$ -glucan . *Microbiology* , 148: 1151-1159 .
- Howell, C. R. (2003) .** Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts . *Plant Disease* , 87(1): 4-10 .
- Jayalakshmi, S. K. ; Raju, S. ; Usha, R. S. ; Benagi, V. I. and Sreeramulu, K. (2009) .** *Trichoderma harzianum* L1 as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* . *Australian Journal of Crop Science* , 3(1): 44-52 .
- Jian-yi, S. ; Wei-fen, L. ; Zi-rong, X. and Sai-hong, G. (2002) .** Purification and some properties of a  $\beta$ -glucanase from a strain, *Trichoderma reesei* GXC . *Journal of Zhejiang University Sciences* , 3(1): 106-112.
- Jijakli, M. H. ; and Lepoivre, P. (1998) .** Characterization of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples . *Phytopathology* , 88: 335-343 .
- Johansson, L.(2006).** Structural analyses of (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucan of oats and barley (dissertation). EKT series 1354. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology . 85 pp.
- Joo, H.-S. ; Kumar, C. G. ; Park, G.-C. ; Kim, K. T. ; Paik, S. R. and Chang, C.-S. (2002) .** Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii* . *Process Biochemistry* , 38: 155-159 .

- Jung**, H. S. ; Son, J. W. ; Ji, H. S. and Kim, K. (1999) . Effective Production of Chitinase and Chitosanase by *Streptomyces griseus* HUT 6037 using Colloidal Chitin and Various Degrees of Deacetylation of Chitosan . *Biotechnol. Bioprocess Eng.* , 4: 26-31 .
- Jwanny**, E. W. ; El-Sayed, S. T. ; Salem, A. M. and Shehata, A. N. (2001) . Characterization and Antifungal Evaluation of Chitinase and Laminarinases from Sugar Beet Leaves . *Pakistan Journal of Biological Sciences* , 4(3): 271-276 .
- Kabir**, K. E. ; Hirowatari, D. ; Watanabe, K. and Koga, D. (2006) . purification and Characterization of a Novel Isozyme of Chitinase from *Bombyx mori* . *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , 70(1): 252-262.
- Kalaiarasi**, K. and Sunitha, P. U. (2009) . Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil . *African Journal of Biotechnology*, 8(24): 7035-7041.
- Kang**, S. C. ; Park, S. and Lee, D. G. (1999) . Purification and Characterization of a Novel Chitinase from the Entomopathogenic Fungus, *Metarhizium anisopliae* . *Journal of Invertebrate Pathology*, 73: 276-281.
- Karlsson**, E. Ryden, L. and Brewer, J. (1998) . Ion exchange chromatograph . In : *Introduction To Protein Purification* (ed. Wiley . Liss) A John Wiley and Sons , INC . Publication . (Cited from Mukran ,2003) .
- Kawachi**, I. ; Fujieda, T. ; Ujita, M. ; Ishii, Y. ; Yamagishi. K. ; Sato, H. ; Funaguma, T. and Hara, A. (2001) . Purification and Properties of Extracellular Chitinases from the Parasitic Fungus *Isaria japonica* . *Journal of Bioscience and Bioengineering* , 92(6): 544-549 .

- Kemal Al-Deen, Z. N. A.** (2008) . Effect of Intraction between *Trichoderma harzianum* Rifai and *Aspergillus niger* Van Tieghem to protection Tomato from infection *Fusarium oxysporum f.sp.lycopersici* . MSc. Thesis , Agriculture College , University of Kufa .
- Kim, K.-J. ; Yang, Y.-J. and Kim, J.-G.** (2003) . Purification and Characterization of Chitinase from *Streptomyces* sp. M-20 . Journal of Biochemistry and Molecular Biology , 36(2): 185-189 .
- Kitamoto, Y. ; Kono, R. ; Shimotori, A. ; Mori, N. and Ichikawa, Y.** (1987) . Purification and Some Properties of an Exo- $\beta$ 1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* . Agric. Biol. Chem. , 51: 3385-3386 .
- Klein, D. and Eveleigh, D. E.** (1998) . Ecology of *Trichoderma* . in: *Trichoderma and Gliocladium* . Vol.1. Basic biology, taxanomy and genetics, Taylor & Francis Ltd. , London.
- Klis, F. M. ; Mol, P. ; Hellingwerf, K. and Brul, S.** (2002) . Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* . FEMS Microbiology Reviews , 26: 239-256 .
- Koga, D.** (1995) . Chitinase for Self-Defense in Plant . in: Chitin and Chitosan: The Versatile Environmentally Friendly Modern Materials . edited by Zakaria, M.B. ; Muda, W.M.W. and Abdullah, Md.P. Universiti Kebansaan Malaysia : no. 28 .
- Konagaya, Y. ; Tsuchiya, C. and Sugita, H.** (2006) . Purification and characterization of chitinases from *Clostridium* sp. E-16 isolated from the intestinal tract of the South American sea lion (*Otaria flavescens*) . Letters in Applied Microbiology , 43: 187-193 .
- Kopecny, J. and Hodrova, B.** (1998) . Chitinolytic Enzymes in the Rumen Microbial Ecosystem . Scientific Symp. " Animal Microbiology " , Domzale, Slovenia , 72: 85-93 .



- Kredics, L. ; Antal, Z. ; Manczinger, L. ; Szekeres, A. ; Kevei, F. and Nagy, E. (2003) . Influence of Environmental Parameters on *Trichoderma* Strains with Biocontrol Potential . Food Technol. Biotechnol. , 41 (1): 37-42 .**
- Kredics, L. ; Manczinger, L. ; Antal, Z. ; Penzes, Z. ; Szekeres, A. ; Kevei, F. and Nagy, E. (2004) . *In vitro* water activity and pH dependence of mycelial growth and extracellular enzyme activities of *Trichoderma* strains with biocontrol potential . Journal of Applied Microbiology, 96: 491-498 .**
- Kucuk, C. and Kivanc, M. (2003) . Isolation of *Trichoderma* Spp. and Determination of Their Antifungal, Biochemical and Physiological Features . Turk J. Biol. , 27:247-253 .**
- Kucuk, C. and Kivanc, M. (2004) . *In Vitro* Antifungal Activity of Strains of *Trichoderma harzianum* . Turk J. Biol. , 28: 111-115 .**
- Kucuk, C. and Kivanc, M. (2008) . Mycoparasitism in the biological control of *Gibberella zeae* and *Aspergillus ustus* by *Trichoderma harzianum* Strains . Journal of Agricultural Technology , 4(2): 49-55 .**
- Kulminskaya, A. A. ; Thomsen, K. K. ; Shabalin, K. A. ; Sidorenko, I. A. ; Eneyskaya, E. V. ; Savelev, A. N. and Neustroev, K. N. (2001) . Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Trichoderma viride* . Eur. J. Biochem. , 268: 6123-6131 .**
- Kumar, M. N. V. R. (2000) . A review of chitin and chitosan applications . Reactive & Functional Polymers , 46: 1-27 .**
- Laroche, C. and Michaud, P. (2007) . New Developments and Prospective Applications for  $\beta$  (1,3) Glucans . Recent Patents on Biotechnology, 1: 59-73.**

- Lee, Y. G. ; Chung, K.-C. ; Wic, S. G. ; Lee, J. C. and Bae, H.-J. (2009) .**  
Purification and properties of a chitinase from *Penicillium sp.* LYG 0704 . *Protein Expression and Purification* , 65: 244-250 .
- Leelasuphakul, W. ; Sivanunsakul, P. and Phongpaichit, S. (2006) .**  
Purification, characterization and synergistic activity of  $\beta$ -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight .*Enzyme and Microbial Technology* , 38: 990-997.
- Leger, R. J. S. ; Joshi, L. and Roberts, D. (1998) .** Ambient pH Is a Major Determinant in the Expression of Cuticle-Degrading Enzymes and Hydrophobin by *Metarhizium anisopliae* . *Applied and Environmental Microbiology* , 64(2): 709-713 .
- Lesage, G. and Bussey, H. (2006) .** Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae* . *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 70(2): 317-343 .
- Li, D.-C. ; Zhang, S.-H. ; Liu, K.-Q. and Lu, J. (2004) .** Purification and partial characterization of a chitinase from the mycoparasitic fungus *Trichothecium roseum* . *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50: 35-39 .
- Li, S. ; Zhao, Z.-A. ; Li, M. ; Gu, Z.-R. ; Bai, C. and Huang, W.-D. (2002) .**  
Purification and Characterization of a Novel Chitinase from *Bacillus brevis* . *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* , 34(6): 690-696 .
- Lilley, G. and Bull, A. T. (1974) .** The Production of  $\beta$ -1,3 Glucanase by a Thermophilic Species of *Streptomyces* . *Journal of General Microbiology* , 83: 123-133 .
- Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) .** The determination of enzyme dissociation constants . *J. Am. Chem. Soc.* , 56: 658-666 .

- Liu, B.-L.** ; Kao, P.-M. ; Tzeng, Y.-M. and Feng, K.-C. (2003) . Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation . *Enzyme and Microbial Technology* , 33:410-415 .
- Liu, D.** ; Cai, J. ; Xie, C.-C. ; Liu, C. and Chen, Y.-H. (2010) . Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* sub sp. *colmeri*, and its biocontrol potential . *Enzyme and Microbial Technology* , 46: 252-256 .
- Lopez, R. C.** and Gomez-Gomez, L. (2009) . Isolation of a new fungi and wound-induced chitinase class in corms of *Crocus sativus* . *Plant Physiology and Biochemistry* , 47: 426-434 .
- Lorito, M.** ; Hayes, C. K. ; Pietro, A. D. ; Woo, S. L. and Harman, G. E. (1994) . Purification , Characterization, and Synergistic Activity of a Glucan 1,3- $\beta$ -glucosidase and an N-acetyl - $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum* . *Phytopathology* , 84: 398-405 .
- Mahadevan, B.** and Crawford, D. L. (1997) . Properties of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108 . *Enzyme and Microbial Technology* , 20: 489-493 .
- Mahata, M. E.** ; Dharma, A. ; Ryanto, I. and Rizal, Y. (2008) . Characterization of Extracellular Chitinase from Bacterial Isolate 99 and *Enterobacter* sp. G-1 from Matsue City, Japan . *Microbiology* , 2(1): 34-38 .
- Maj, A.** ; Witkowska, D. and Robak, M. (2002) . Biosynthesis and Properties of beta-1,3-Glucanases of *Trichoderma hamatum* . *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities , Biotechnology* , 5 (2) .
- Marcello, C. M.** ; Steindorff, A. S. ; da Silva, S. P. ; Silva, R. do N. ; Bataus, L. A. M. and Ulhoa, C. J. (2010) . Expression analysis of the exo- $\beta$ -

1,3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum* . Microbiological Research , 165: 75-81 .

**Mario**, F. D. ; Rapana, P. ; Tomati, U. and Galli, E. (2008) . Chitin and chitosan from Basidiomycetes . International Journal of Biological Macromolecules , 43: 8-12 .

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

**Matsumoto**, K. S. (2006) . Fungal chitinases . Advances in Agricultural and Food Biotechnology , 289-304 .

**Matsumoto**, Y. ; Saucedo-Castañeda, G. ; Revah, S. and Shirai, K. (2004) . Production of  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer . Process Biochemistry, 39: 665-671.

**Mauch**, F. ; Hadwiger, L. A. and Boller, T. (1988) . Antifungal Hydrolases in Pea Tissue . Plant Physiol. , 87: 325-333 .

**Mejía-Saulés**, J. E. ; Waliszewski, K. N. ; Garcia, M. A. and Cruz-Camarillo, R. (2006) . The Use of Crude Shrimp Shell Powder for Chitinase Production by *Serratia marcescens* WF . Food Technol. Biotechnol. , 44(1): 95-100 .

**Mellor**, K. J. ; Nicholas, R. O. and Adams, D. J. (1994) . Purification and characterization of chitinase from *Candida albicans* . FEMS Microbiology Letters , 119 : 111-118 .

- Merzendorfer**, H. and Zimoch, L. (2003) . Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases . The Journal of Experimental Biology , 206: 4393-4412 .
- Mohamed**, H. A. A. ; Haggag, W. M. and Attallah, A. G. (2010) . Genetic enhancement of *Trichoderma viride* to overproduce different hydrolytic enzymes and their biocontrol potentiality against root rot and white mold diseases in bean plants . Agric. Biol. J. N. Am. , 1(3): 273-284 .
- Molina**, M. ; Cenamor, R. ; Sanchez, M. and Nombela, C. (1989). Purification and Some Properties of *Candida albicans* Exo-1,3- $\beta$ -glucanase . Journal of General Microbiology , 135: 309-314 .
- Monte**, E. and Llobell, A. (2003) . *Trichoderma* in Organic Agriculture . Actas V Congreso Mundial del Aguacate , pp. 725-733 .
- Morihara**, K. (1974). Comparative specificity of microbial Proteinase . Adv. Enzymol. , 41: 179-243 .(Cited from Al-Douri , 2003) .
- Mukran**, S. A. (2003) . Production, Purification and Characterization of Asparaginase 11 from local isolate of *E. coli* . ph.D. Thesis , College of Science , University of Baghdad .
- Mustafa**, M. ; Ramli, S. ; Ithnin, N. and Tohfah, N. F. (2005) . Purification and Characterization of  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichodenna harzianum* BIO 10671 . Pertanika J. Trop. Agric. Sci. , 28(1): 23-31.
- Nampoothiri** , K. M. ; Baiju, T.V. ; Sandhya, C. ; Sabu, A. ; Szakacs, G. ; Pandey, A. (2004) . Process optimization for antifungal chitinase production by *Trichoderma harzianum* . Process Biochemistry , 39: 1583-1590 .

- Narayana, K. J. P. and Vijayalakshmi, M. (2009)** . Chitinase production by *Streptomyces sp.* ANU 6277 . Brazilian Journal of Microbiology , 40: 725-733 .
- Neale, A. D. ; Wahleithner, J. A. ; Lund, M. ; Bonnett, H. T. ; Kelly, A. ; Meeks-Wagner, D. R. ; Peacock, W. J. and Dennis, E. S. (1990)** . Chitinase,  $\beta$ -1,3-Glucanase, Osmotin, and Extensin Are Expressed in Tobacco Explants during Flower Formation . The Plant Cell , (2): 673-684 .
- Nguyen, T. H. ; Fleet, G. H. and Rogers, P. L. (1998)** . Composition of the cell walls of several yeast species . Appl. Microbiol. Biotechnol. , 50: 206-212 .
- Noronha, E. F. ; Kipnis, A. ; Junqueira-Kipnis, A. P. and Ulhoa, C. J. (2000)** . Regulation of 36-kDa  $\beta$ -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzianum* . FEMS Microbiology Letters , 188: 19-22 .
- Noronha, E. F. ; Ulhoa, C.J. (2000)** . Characterization of a 29-kDa  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* . FEMS Microbiology Letters , 183: 119-123 .
- Nuero, O. M. (1995)** . Production of Chitinase by *Fusarium* species . Current Microbiology , 30: 287-289 .
- Ogawa, K. ; Yoshida, N. ; Kariya, K. ; Ohnishi, C. and Ikeda, R. (2002)** . Purification and characterization of a novel chitinase from *Burkholderia cepacia* strain KH2 isolated from the bed log of *Lentinus edodes*, Shiitake mushroom . J. Gen. Appl. Microbiol. , 48: 25-33 .
- Omumasaba, C. A. ; Yoshida, N. and Ogawa, K. (2001)** . Purification and characterization of a chitinase from *Trichoderma viride* . J. Gen. Appl. Microbiol. , 47: 53-61 .

- Pal, K. K. and Gardener, B. M. (2006) . Biological Control of Plant Pathogens . The Plant Health Instructor .**
- Palpandi, C. ; Shanmugam, V. and Shanmugam, A. (2009) . Extraction of chitin and chitosan from shell and operculum of mangrove gastropod *Nerita (Dostia) crepidularia* Lamarck . International Journal of Medicine and Medical Sciences , 1(5): 198-205 .**
- Pang, Z. ; Otaka, K. ; Suzuki, Y. ; Goto, K. and Ohnishi, M. (2004) . Purification and characterization of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Arthrobacter* sp. J. Biol. Macromol. , 4 (2): 57-66 .**
- Park, R.-D. ; Kim, k.-S. and Cho, M.-J. (1992) . Purification and Characterization of Ethylene- induced  $\beta$ -1,3-Glucanase from Soybean [ *Glycine max* (L.) ] Leaves . Korean Biochem. J. , 25(7): 597-603 .**
- Park, S. H. ; Lee, J.-H. and Lee, H. K. (2000) . Purification and Characterization of Chitinase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027 . The Journal of Microbiology , 38(4): 224-229 .**
- Pedraza-Reyes, M. and Lopez-Romero, E. (1989) . Purification and Some Properties of Two Forms of Chitinase from Mycelial Cells of *Mucor rouxii* . Journal of General Microbiology, 135: 211-218 .**
- Prajanban, J. ; Thongkhib, C. and Kitpreechavanich, V. (2008) . Selection of High  $\beta$ -Glucanase Produced *Aspergillus* Strain and Factors Affecting the Enzyme Production in Solid State Fermentation . Kasetsart J. (Nat. Sci.) , 42:294-299 .**
- Qadar, S. A. U. ; Shireen, E. ; Iqbal, S. and Anwar, A. (2009) . Optimization of protease production from newly isolated strain of *Bacillus* sp. PCSIREA-3 . Indian Journal Biotechnology , 8: 286-290 .**

- Qing, F.** ; Shiping, T. ; Haibo, L. and Yong, X. (2002) . Production of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase of two biocontrol agents and their possible modes of action . Chinese Science Bulletin , Vol. 47, No. 4 .
- Rajendiran, R.** ; Jegadeeshkumar, D. ; Sureshkumar, B.T. and Nisha, T. (2010) . *In vitro* assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens . Journal of Agricultural Technology , 6(1): 31-35 .
- Ramada, M. H. S.** ; Lopes, F. Á. C. ; Ulhoa, C. J. and Silva, R. do N. (2010) . Optimized microplate  $\beta$ -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. Screening . Journal of Microbiological Methods , 81: 6-10 .
- Rana, D. S.** ; Théodore, K. ; Naidu, G. S. N. and Panda, T. (2003) . Stability and kinetics of  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* . Process Biochemistry , 39: 149-155 .
- Rhodes, A.** and Fletcher, D. L. (1966) . Principles of industrial microbiology . 1<sup>st</sup> ed. Pergamon Press , Oxford .
- Rinaudo, M.** (2006) . Chitin and chitosan: Properties and applications . Prog. Polym. Sci. , 31: 603-632 .
- Romsomsa, N.** ; Chim-anagae, P. ; Jangchud, A. (2010) . Optimization of silk degumming protease production from *Bacillus subtilis* C4 using Plackett-Burman design and response surface methodology . ScienceAsia , 36: 118-124 .
- Saad, M. M. S.** and Nawar, L. S. (2001) . chitinase formation by *Trichoderma harzianum* isolates . J. Agric. Sci. Mansoura Univ. , 26(1): 537-549 .



- Sahi, I. Y. and Khalid, A. N. (2007).** *In vitro* biological control of *Fusarium oxysporum* causing wilt in *Capsicum annuum* . Mycopath. , 5(2): 85-88.
- Sakai, K. ; Yokota, A. ; Kurokawa, H. ; Wakayama, M. and Moriguchi, M. (1998)** . Purification and Characterization of Three Thermostable Endochitinases of a Noble *Bacillus* Strain, MH-1, Isolated from Chitin-Containing Compost . Applied and Environmental Microbiology , 64(9): 3397-3402 .
- Samuels, G. J. (2006).** *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology , 96: 195-206 .
- Sanchez, M. ; Nombela, C. ; Villanueva, J. R. and Santos, T. (1982)** . Purification and Partial Characterization of a Developmentally Regulated 1,3- $\beta$ -Glucanase from *Penicillium italicum* . Journal of General Microbiology , 128: 2047-2053 .
- Sandhya, C. ; Adapa, L. K. ; Nampoothiri, K. M. ; Binod, P. ; Szakacs, G. ; Pandey, A. (2004)** . Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation . J. Basic Microbiol. , 44(1): 49-58 .
- Santos, T. ; Villanueva, J. R. and Nombela, C. (1977)** . Production and Catabolite Repression of *Penicillium italicum*  $\beta$ -Glucanases . Journal of Bacteriology , 129(1): 52-58 .
- Saravanan, R. ; Devi, V. P. ; Shanmugam, A. and Kumar, D. S. (2007)** . Isolation and Partial Purification of Extracellular Enzyme (1,3) - $\beta$ -D Glucanase from *Trichoderma reesei* (3929) . Biotechnology , 6(3): 440-443 .
- Shalini, S. and Kotasthane, A. S. (2007)** . Parasitism of *Rhizoctonia solani* by Strain of *Trichoderma* spp. EJEAFChe. , 6 (8): 2272-2281 .

- Shanmugaiah, V. ; Mathivanan, N. ; Balasubramanian, N. and Manoharan, P.T. (2008) . Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil . African Journal of Biotechnology , 7(15): 2562-2568 .**
- Sharaf, E. F. (2005) . A Potent Chitinolytic Activity of *Alternaria alternata* Isolated from Egyptian Blach Sand. Polish Journal of Microbiology, 54(2): 145-151 .**
- Sharma, N. ; Sharma, K. P. ; Gaur, R. K. and Gupta, U. K. (2011) . Role of Chitinase in Plant Defense . Asian Journal of Biochemistry , 6(1): 29-37 .**
- Shin, K.-S. ; Kwon, N.-J. ; Kim, Y. H. ; Park, H.-S. ; Kwon, G.-S. and Yu, J.-H. (2009) . Differential Roles of the ChiB Chitinase in Autolysis and Cell Death of *Aspergillus nidulans* . Eucaryotic Cell , 8(5): 738-746 .**
- Singh, G. ; Sharma, J. R. and Hoondal, G. S. (2008) . Chitinase Production by *Serratia marcescens* GG5 . Turk J. Biol. , 32: 231-236 .**
- Singh, A. K. ; Ghodke, I. and Chhatpar, H.S. (2009a). Pesticide tolerance of *Paenibacillus* sp. D1 and its chitinase . Journal of Environmental Management , 91: 358-362 .**
- Singh, A.K. ; Mehta, G. and Chhatpar, H.S. (2009b) . Optimization of medium constituents for improved chitinase production by *Paenibacillus* sp. D1 using statistical approach . Letters in Applied Microbiology , 49: 708-714 .**
- Singh, P. P. ; Shin, Y. C. ; Park, C. S. and Chung, Y. R. (1999) . Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria . Phytopathology , 89: 92-99 .**

- Sivan, A.** and Chet, I. (1989) . Degradation of Fungal Cell Walls by Lytic Enzymes of *Trichoderma harzianum* . Journal of General Microbiology , 135: 675-682 .
- Souza, R.F.** ; Gomes, R.C. ; Coelho, R.R.R. ; Alviano, C.S. and Soares, R.M.A. (2003) . Purification and characterization of an endochitinase produced by *Colletotrichum gloeosporioides* . FEMS Microbiology Letters , 222: 45-50 .
- Stahmann, K.-P.** ; Pielken, P. ; Schimz, k.-L. and Sahn, H. (1992) . Degradation of Extracellular  $\beta$ -(1,3) (1,6) -D- Glucan by *Botrytis cinerea* . Applied and Environmental Microbiology , 58(10): 3347-3354 .
- Stahmann, K.-P.** ; Schimz, k.-L. and Sahn, H. (1993) . Purification and characterization of four extracellular 1,3- $\beta$ -glucanases of *Botrytis cinerea* . Journal of General Microbiology , 139: 2833-2840 .
- Stanbury, P. F.** and Whitaker, A. (1984) . Principles of fermentation technology . 1<sup>st</sup> ed. Pergamon Press , Oxford .
- Sun, H.** ; Yang, J. ; Lin, C. ; Huang, X. ; Xing, R. and Zhang, K.-Q. (2006) . Purification and properties of a  $\beta$ -1,3-glucanase from *Chaetomium sp.* that is involved in mycoparasitism . Biotechnology Letters , 28: 131-135 .
- Suzuki, M.** ; Horii, T. ; Kikuchi, R. and Ohnishi, T. (1987) . Purification of Laminarinase from Antractic Krill *Euphausia superba* . Nippon Suisan Gakkaishi , 53(2): 311-317 .
- Szilagyi, M.** ; Kwon, N.-J. ; Dorogi, C. ; Pocsil, I. ; Yu, J.-H. and Emri, T. (2010) . The extracellular  $\beta$ -1,3-endoglucanase EngA is involved in autolysis of *Aspergillus nidulans* . Journal of Applied Microbiology, 109: 1498-1508 .

- Taechowisan**, T. ; Peberdy, J. F. and Lumyong, S. (2003) . Chitinase production by endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and its antagonism against phytopathogenic fungi . *Annals of Microbiology* , 53 (4): 447-461 .
- Taira**, T. ; Toma, N. and Ishihara, M. (2005) . Purification , Characterization, and Antifungal Activity of Chitinases from Pineapple (*Ananas comosus*) Leaf . *Biosci. Biotechnol. Biochem.* , 69(1): 189-196 .
- Tangarone**, B. ; Royer, J. C. and Nakas, J. P. (1989) . Purification and Characterization of an Endo-(1,3)- $\beta$ -D-Glucanase from *Trichoderma longibrachiatum* . *Applied and Environmental Microbiology* , 55(1): 177-184.
- Terra**, W. R. and Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* , 109B: 1-62 . (Cited from Allardyce and Linton ,2008) .
- Tikhonov**, V. E. ; Lopez-Llorca, L. V. ; Salinas, J. and Jansson, H.-B. (2002). Purification and Characterization of Chitinases from the Nematophagous Fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium* . *Fungal Genetics and Biology* , 35: 67-78 .
- Tsujibo**, H. ; Minoura, K. ; Miyamoto, K. ; Endo, H. ; Moriwaki, M. and Inamori, Y. (1993) . Purification and Properties of a Thermostable Chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 . *Applied and Environmental Microbiology* , 59(2): 620-622 .
- Tweddell**, R. J. ; Jabaji-Hare, S. H. and Charest, P. M. (1994) . Production of Chitinases and  $\beta$ -1,3-Glucanases by *Stachybotrys elegans*, a Mycoparasite of *Rhizoctonia solani* . *Applied and Environmental Microbiology* , 60(2): 489-495 .

- Ueda, M.** ; Kotani, Y. ; Sutrisno, A. ; Nakazawa, M. and Miyatake, K. (2005). Purification and Characterization of Chitinase B from Moderately Thermophilic Bacterium *Ralstonia sp. A-471* . Biosci. Biotechnol. Biochem. , 69(4): 842-844 .
- Ulhoa, C. J.** and Peberdy, J. F. (1991) . Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum* . Journal of General Microbiology , 137: 2163-2169 .
- Vaidya, R. J.** ; Shah, I. M. ; Vyas, P. R. and Chhatpar, H. S. (2001) . Production of chitinase and its optimization from a novel isolate *Alcaligenes xylosoxydans* : potential in antifungal biocontrol . World Journal of Microbiology and Biotechnology , 17: 691-696 .
- Vazquez-Garciduenas, S.** ; Leal-Morales, C. A. and Herrera-Estrella, A. (1998). Analysis of the  $\beta$ -1,3-Glucanolytic System of the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology , 64(4): 1442-1446 .
- Verburg, J. G.** and Huynh, Q. K. (1991). Purification and Characterization of an Antifungal Chitinase from *Arabidopsis thaliana* . Plant Physiol. , 95: 450-455 .
- Verma, M.** ; Brar, S. K. ; Tyagi, R. D. ; Surampalli, R. Y. and Valero, J. R. (2007) . Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp. : Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal , 37: 1-20 .
- Vieira, F. A.** ; da Cunha, M. ; Klein, D. E. ; Carvalho, A. de O. and Gomes, V. M. (2006). Purification and Characterization of  $\beta$ -1, 3-Glucanase from the Secretion of *Simira glaziovii* Colleters (Rubiaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology , 49(6): 881-888 .

- Vinale, F.** ; Sivasithamparam, K. ; Ghisalberti, E. L. ; Marraa, R. ; Woo, S. L. and Lorito, M. (2008) . *Trichoderma*–plant–pathogen interactions . *Soil Biology & Biochemistry* , 40: 1-10 .
- Vyas, S. P. & Dixit, V. K.** (2009) . *Pharmaceutical Biotechnology* . CBS Publishers & Distributors PVT. LTD. New Delhi. Bangalore. Pune. Cochin. Chennai (India) .
- Wang, L.** ; Ridgwaya, D. ; Gua, T. and Moo-Young, M. (2005) . Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations . *Biotechnology Advances* , 23: 115-129 .
- Wang, S.-L.** ; Lin, B.-S. ; Liang, T.-W. ; Wang, C.-L. ; Wu, P.-C. and Liu, J.-R. (2010) . Purification and Characterization of Chitinase from a New Species Strain, *Pseudomonas sp.* TKU008 . *J. Microbiol. Biotechnol.* , 20(6): 1001-1005 .
- Wang, S.-L.** ; Lin, T.-Y. ; Yen, Y.-H. ; Liao, H.-F. and Chen, Y.-J. (2006) . Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase . *Carbohydrate Research* , 341: 2507-2515 .
- Wang, S.-L.** and Chang, W.-T. (1997) . Purification and Characterization of Two Bifunctional Chitinases/Lysozymes Extracellularly Produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium . *Applied and Environmental Microbiology* , 63(2): 380-386 .
- Wanjun, T.** ; Cunxin, W. and Donghua, C. (2005) . Kinetic studies on the pyrolysis of chitin and chitosan . *Polymer Degradation and Stability*, 87: 389-394 .

- Wasli**, A. S. ; Salleh, M. M. and Illias, R. M. (2006) . Production and Characterization of crude chitinase from *Trichoderma virens* . Petroleum and Natural Resources Process .
- Watanabe**, R. ; Ogasawara, N. ; Tanaka, H. and Uchiyama, T. (1988) . Effect of Fungal Lytic Enzymes and Non-ionic Detergents on the Actions of Some Fungicides against *Pyricularia aryzae* . Agric. Biol. Chem., 52: 895-901.
- Watanabe**, T. ; Kasahara, N. ; Aida, K. and Tanaka, H. (1992) . Three N-Terminal Domains of  $\beta$ -1,3-Glucanase Al Are Involved in Binding to Insoluble  $\beta$ -1,3-Glucan . Journal of Bacteriology , 174(1): 186-190 .
- Whitaker**, J. R. (1972) . Principles of Enzymology For The Food Science . Marcel Dekker , Inc. New York .
- Woo**, C.-J. and Park, H.-D. (2003) . An extracellular *Bacillus* sp. chitinase for the production of chitotriose as a major chitinolytic product . Biotechnology Letters , 25: 409-412 .
- Woo**, C.-J. ; Yun, U.-J. and Park, H.-D. (1996) . Isolation of Chitin-utilizing Bacterium and Production of Its Extracellular Chitinase . Journal of Microbiology and Biotechnology , 6(6): 439-444 .
- Yanai**, K. ; Takaya, N. ; Kojima, N. ; Horiuchi, H. ; Ohta, A. and Takagi, M. (1992) . Purification of Two Chitinases from *Rhizopus oligosporus* and Isolation and Sequencing of the Encoding Genes . Journal of Bacteriology , 174: 7398-7406.
- Yi**, H. ; Xiong, S. ; Du, M. and Zhang, L. (2008) . Purification and partial characterization of  $\beta$ -glucanase produced by *Trichoderma viride* TP09 isolated from sewage of beer-making . Eur. Food Res. Technol. , 227: 821-826 .

- Yong, T. ; Hong, J. ; Zhangfu, L. ; Li, Z. ; Xiuqiong, D. ; ke, T. ; Shaorong, G. and Shigui, L. (2005) . purification and characterization of an extracellular chitinase produced by bacterium C4 . Annals of Microbiology , 55(3): 213-218 .**
- Zarain-Herzberg, A. ; and Arroyo-Begovich, A. (1983) . Chitinolytic Activity from *Neurospora crassa*. Journal of General Microbiology, 129: 3319-3326.**
- Zarei, M. ; Aminzadeh, S. ; Zolgharnein, H. ; Safahieh, A. ; Ghoroghi, A. ; Motallebi, A. ; Daliri, M. and Lotfi, A. S. (2010) . *Serratia marcescens* B4A chitinase product optimization using Taguchi approach . Iranian Journal of Biotechnology , 8 (4) .**
- Zhang, Z. ; Yuen, G. Y. ; Sarath, G. ; and Penheiter, A. R. (2001) . Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. Phytopathology , 91: 204-211 .**
- Zhu, X.-f. ; Zhou, Y. and Feng, J.-l. (2007) . Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5 . J. Zhejiang Univ. Sci. B, 8(11): 831-838 .**



## Summary

This study was carried out to investigate the optimal conditions for Chitinase and  $\beta$  1-3 glucanase production from the local isolate *Trichoderma fertile* , being the essential enzymes responsible for fungal cell wall lysis of pathogenic fungi (which consists mainly of chitin and  $\beta$  1-3 glucan) .

The study also included a partial purification of both enzymes and characterization of some important properties , and the results showed the following :

- 1- 25 fungal isolates belong to different genes were screened for both enzymes production . Out of these isolates , an isolate identified as *Trichoderma fertile* AH1 was the most efficient in both enzymes production , and to be used in this study .
- 2- The optimal condition for both enzymes production from the selected isolate in this study were using medium composed of baker's yeast at concentration 1.5 % supplemented with 0.1 % from each of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  , at initial pH 4.0 with an inoculum size of one disc ( $2.5 \times 10^6$  spore / ml) , and incubated at 30 °C on a rotary shaker at 125 rpm for 96 h.
- 3- Chitinase and  $\beta$  1-3 glucanase , from culture filtrates of *T. fertile* AH1 , were partially purified by dialysis , precipitation with (20-70)% ethanol and DEAE-Cellulose ion exchange chromatography . Two Chitinase forms (A and B) were detected after ion exchange chromatography , while only one was detected for  $\beta$  1-3 glucanase .

4- The two Chitinase forms (A and B) and  $\beta$  1-3 glucanase were characterized . The results showed the following :

A- The  $K_m$  and  $V_{max}$  values for the two Chitinase form (A and B) , using pNP-GlcNAc as substrate , were (0.4 and 0.37) mM and (1.5 and 1.4)  $\mu\text{mol/ml/min}$  , respectively . While the  $K_m$  and  $V_{max}$  values for  $\beta$  1-3 glucanase , using laminarin as substrate , were (111)  $\mu\text{g/ml}$  and (0.09)  $\mu\text{mol/ml/min}$  , respectively too .

B- The optimum pH for the two Chitinase forms (A and B) and  $\beta$  1-3 glucanase activity were pH (5.0 , 5.5 and 4.5) , respectively , and were stable in the pH range of (3.5-7.5) , (4.5-7.5) and (3.5-7.0) , respectively too .

C- The two Chitinase forms (A and B) showed heat stability at (20-40)  $^{\circ}\text{C}$  and (20-55)  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min , respectively . While the heat stability for  $\beta$  1-3 glucanase was (20-45)  $^{\circ}\text{C}$  for the same period of time .

D- Some of the metal ions and chemicals at (1 and 5) mM concentration showed different inhibition percentages on the two Chitinase forms (A and B) and  $\beta$  1-3 glucanase activity. While manganese chloride had stimulated effect for both enzymes activity as well as iron chloride , which had also stimulated effect , but only for the two Chitinase forms activity .

5- This study also indicated the role of enzymatic mechanism in inhibition growth of plant pathogenic fungi such as *Fusarium solani* , *Fusarium oxysporum* , *Rhizoctonia solani* and *Aspergillus flavus* (Aflatoxin producer) , by using crude filtrate for Chitinase and  $\beta$  1-3 glucanase with different concentrations and the results showed that both enzymes had clear inhibition activity against mentioned fungi by 100 % at concentration (1 : 1) (enzyme : media) .

*Production and Characterization of Chitinase  
and  $\beta$  1-3 Glucanase from Trichoderma fertile  
Local Isolate*

*A Thesis Submitted to*  
*the College of Science – University of Kerbala*  
*in Partial Fulfillment of the Requirement for the*  
*Degree of Master of Science in Biology*



*By*

**Hawraa A. Haider**

*B.SC. Kerbala university*

*2008*

Supervised by

Asst. Prof. Dr.

**Ali Abdul Kadhm jasim**

*April 2011*