مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (٨) العدد (٦) ٢٠٢٤

Tartous University Journal for Research and Scientific Studies –Basic Sciences Series Vol. (8) No. (6) 2024

دراسة فعالية وخصائص مستحضر السيلولاز المُنتج بواسطة فطر *A.nigar*

د. نجوى حداد*

زكريا كمال الزايد**

(تاريخ الإيداع ٢٠٢٤/٨/٢٧ – تاريخ النشر ٢٠٢٤/١٢/٢٢)

□ ملخّص □

السيلولاز أنزيم يقوم بعملية تحليل السيليلوز، ويتم استخدامه في العديد من الصناعات مثل صناعة الورق وغزل النسيج وغيرها. تمّ إنتاج مستحضر أنزيمي يمتلك فعالية السيلولاز في مزارع للفطريات التي تنمو على المواد السيليلوزية مثل فطر *Aspergillus nigar*.

اعتمد كربوكسي ميثيل السيليلوز(CMC) بوصفه ركازة لتحديد فعالية الإنزيم من خلال قياس كمية الجلوكوز المتحرر بفعل تأثير المستخلص المُنتج على جهاز سبكيتروفوتومتر باستخدام كاشف 3,5-ثنائي نترو حمض السالسليك (DNS) عند طول موجة 540nm. وقد تم التوصل الى الشروط المثلى التي يعمل عندها أنزيم السيلولاز في المستحضر وأشارت النتائج أن أفضل نشاط لأنزيم السيلولاز في المستحضر الإنزيمي المنتج من قبل فطر *A. nigar* كان عند درجة حموضة pH=5، حيث بلغت كمية الغلوكوز المتحرر $3500\ \mu mol.L^{-1}$ ، والفعالية الإنزيمية بلغت $233.33 \mu mol.L^{-1}.min^{-1}$. وكانت درجة الحرارة المثلى التي يعمل عندها أنزيم السيلولاز في المستحضر الإنزيمي هي $30\ ^{\circ}C$ حيث بلغت كمية الغلوكوز المتحرر $3900\ \mu mol.L^{-1}$ ، والفعالية الإنزيمية بلغت $475.26 \mu mol.L^{-1}.min^{-1}$. كما تم تحديد البارامترات الحركية للأنزيم وفق علاقة ميكائليس – منتن حيث بلغت قيمة ثابت ميكائليس $K_m = 1.666\ g.l^{-1}$

الكلمات المفتاحية: جلوكوز، سيلولاز، *Aspergillus niger* ، كربوكسي ميثيل السيليلوز ، الفعالية الإنزيمية

* أستاذ مساعد في قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سوريا. najwahaddad@tishreen.edu.sy

** طالب ماجستير في قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين–اللاذقية –سوريا zakarea.alzaid@tishreen.edu.sy.

مجلة جامعة طرطوس للبحوث والدراسات العلمية_ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (٨) العدد (٦) ٢٠٢٤

Tartous University Journal for Research and Scientific Studies –Basic Sciences Series Vol. (8) No. (6) 2024

Study the activity and characteristic of cellulase produced A.niger fungi

Najwa haddad*
Zakarea alzaid**

(Received 27/8/2024.Accepted 22/12/2024)

□ABSTRACT □

Cellulase is an enzyme that breaks down cellulose, and is used in many industries such as papermaking, textile spinning, and others. Preparation enzyme that has the effectiveness of cellulase has been produced in microorganism farms that grow on cellulosic materials using Aspergillus niger. Carboxymethyl cellulose (CMC) was used as a substrate to determine the enzyme activity by measuring the amount of glucose released by the effect of the produced preparation on spectrophotometer by using the 5,3-dinitro salicylic acid (DNS) reagent at a wavelength of 540 nm. The optimum conditions at which the cellulase enzyme works in the preparation were reached. The results showed that the best activity of the cellulase enzyme in the enzyme preparation produced by Aspergillus niger is at a pH=5, where the amount of glucose released was $3500\ \mu mol.\ L^{-1}$and the enzyme activity was $233.33 \mu mol.\ L^{-1}.\ min^{-1}$. The optimum temperature at which the cellulase enzyme works in the enzyme preparation was 30 ℃, where the amount of glucose released was $3900\ \mu mol.\ L^{-1}$ and the enzyme activity was $475.26 \mu mol.\ L^{-1}.\ min^{-1}$and the kinetic parameters of the enzyme were determined according to the Michaelis-Menten relationship, where the value of the Michaelis constant $K_m = 1.666\ g.\ L^{-1}$

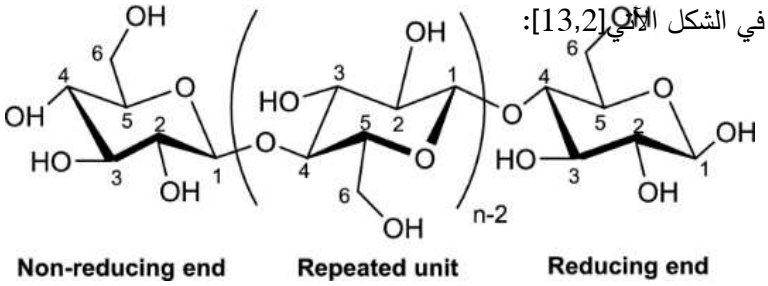
Key words: Glucose, cellulase, *Aspergillus nigar*, Carboxy methyl cellulose, Enzymatic activity.

*** Assistant Professor, Chemistry Department - Faculty of Science - Tishreen University - Lattakia - Syria.** najwahaddad@tishreen.edu.sy

**** Master Student, Department of Chemistry - Faculty of Science - Tishreen University - Lattakia – Syria**. zakarea.alzaid@tishreen.edu.sy

١- المقدمة:

يعد السيليلوز المكون الرئيسي للنباتات وهو من السكريات الأكثر وفرة في الطبيعة والقابلة للتجديد ويشكله النبات من المواد الأولية C وH وO من خلال عملية التركيب الضوئي حيث ينتج حوالي 10^{11} طن سنوياً [1]، ويكوّن حوالي 15–60% من مكونات الجدار الخلوي للنباتات فيكسبها الشكل والقساوة ، ومن الوجهة الكيميائية يعد السيليلوز هو سكاريد متعدد متجانس يملك الصيغة الجزيئية العامة $(C_6H_{10}O_5)_n$ وهو مكون من عدة جزيئات من نمط $\beta - D -$ غلوكوبيرانوز مرتبطة مع بعضها البعض بروابط غليكوزيدية من نمط $(4 - 1\ \beta)$ لتشكل سلسلة بوليميرية كما في الشكل الآتي[13,2]:



الشكل (١) الصيغة البنائية للسيليلوز

يعد السيليلوز من الجزيئات التي لا تذوب في الماء ومعظم المذيبات العضوية وهو مقاوم نسبياً للتحلل المائي ويمكن للروابط الغليكوزيدية التي تمسك بنيته أن تتحلمه في الأوساط الحمضية للوصول الى الغلوكوز وبعض الأجزاء متعددة السكاريد، ومن جهة أخرى يمكن الحصول على الغلوكوز من الحلمهة البسيطة للسيليلوز بوجود الأنزيم النوعي القادر على حلمهة الروابط $-\beta$ غليكوزيدية[3].

الأنزيمات جزيئات من طبيعة بروتينية تنتجها الخلايا الحية، تعمل على تسريع التفاعلات البيوكيميائية المختلفة، وهي محفزات طبيعية نوعية تعمل على ركائز محددة، وتتأثر في شروط الوسط التفاعلي من درجة حموضة ودرجة الحرارة ووجود أو غياب المثبطات والمنشطات[4].

الفطريات كائنات حية حقيقية النواة متعددة الخلايا او وحيدة الخلية، تتنوع في نمط التغذية ما بين الرمية والمتكافلة والطفيلية [5]، تنتشر الفطريات في أماكن تواجد المواد العضوية والتي تمثل غذاء لها، وهي كائنات حية لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة [6]، والفطريات قد تتواجد على الأغلفة الجلدية والأخشاب والقماش وغيرها، وتنتشر أنواع متعددة من الفطريات الحقيقية على أجسام المواد العضوية كما تنمو الهيفات الفطرية على سطح بيئة الوسط المغذي، ومن اهم الفطريات التي تنتج إنزيم السيلولاز فطر الاسبير جيليوس Aspergillus [7].

يعود فطر A.nigerالى الجنس $Aspergillus$ والذي يضم ما يقارب ٢٥٠ نوع [22] وينقسم هذا النوع الى عدة أقسام حسب لون الأبواغ الكونيدية التي تكون إما بلون ابيض او اصفر او اسود او اخضر او بني حسب نوع الفطر[23] ،هو نوع من الفطريات الخيطية ذات هايفات سريعة النمو ،وتنتشر بصورة واسعة في الهواء والتربة فتكون مصدر للتلوث والاصابة ، تتميز بهايفاته المقسمة والتي تتفرع بزاوية $45°$ وتنتج ابواغ كونيدية ذات لون اسود، وصفه لأول مرة Tiehem عام ١٧٦٧ حيث يكون سطح المستعمرات مغطى بتجمعات كثيفة من الكونيدات السوداء ،تتخذ المستعمرة في بداية النمو اللون الأبيض ،ثم تتحول بعد ذلك الى اللون الأصفر ،وعند اكتمال النمو تتحول الى اللون الأسود [24].

تلعب الكائنات الحية الدقيقة المحللة للسيليلوز دوراً هام في إعادة تدوير النفايات الناتجة عن الصناعات المختلفة والتي تؤدي الى تلوث بيئي نتيجة تراكم كميات كبيرة من السكريات. إلا ان عملية تحلل السكريات باستخدام الحموض والقلويات مكلفة بالإضافة الى أن التخلص من الاحماض والقلويات يعتبر مشكلة بيئية كبيرة لذلك استخدمت الإنزيمات من اجل هذه العملية كأحد الحلول البديلة [8].

تعود قدرة الكائنات الحية والمجترات على هضم السيليلوز إلى قدرتها على إنتاج إنزيم السيلولاز Cellulase والذي يعمل على حلمهة الروابط بيتا غليكوزيدية التي تمسك جزيئات الغلوكوز محرراً جزيئات أبسط ليصل في النهاية إلى جزيئات الغلوكوز الذي يعد عنصر طاقة مهم للخلايا[26]. يعد السيلولاز من الأنزيمات الهامة صناعياً، وهو أحد أنزيمات الحلمهة والتي تعمل على حلمهة الألياف ذات الطبيعة السيليلوزية الموجودة في الجدار الخلوي للخلية النباتية وتحويله إلى غلوكوز أو سيليبيوز[9].

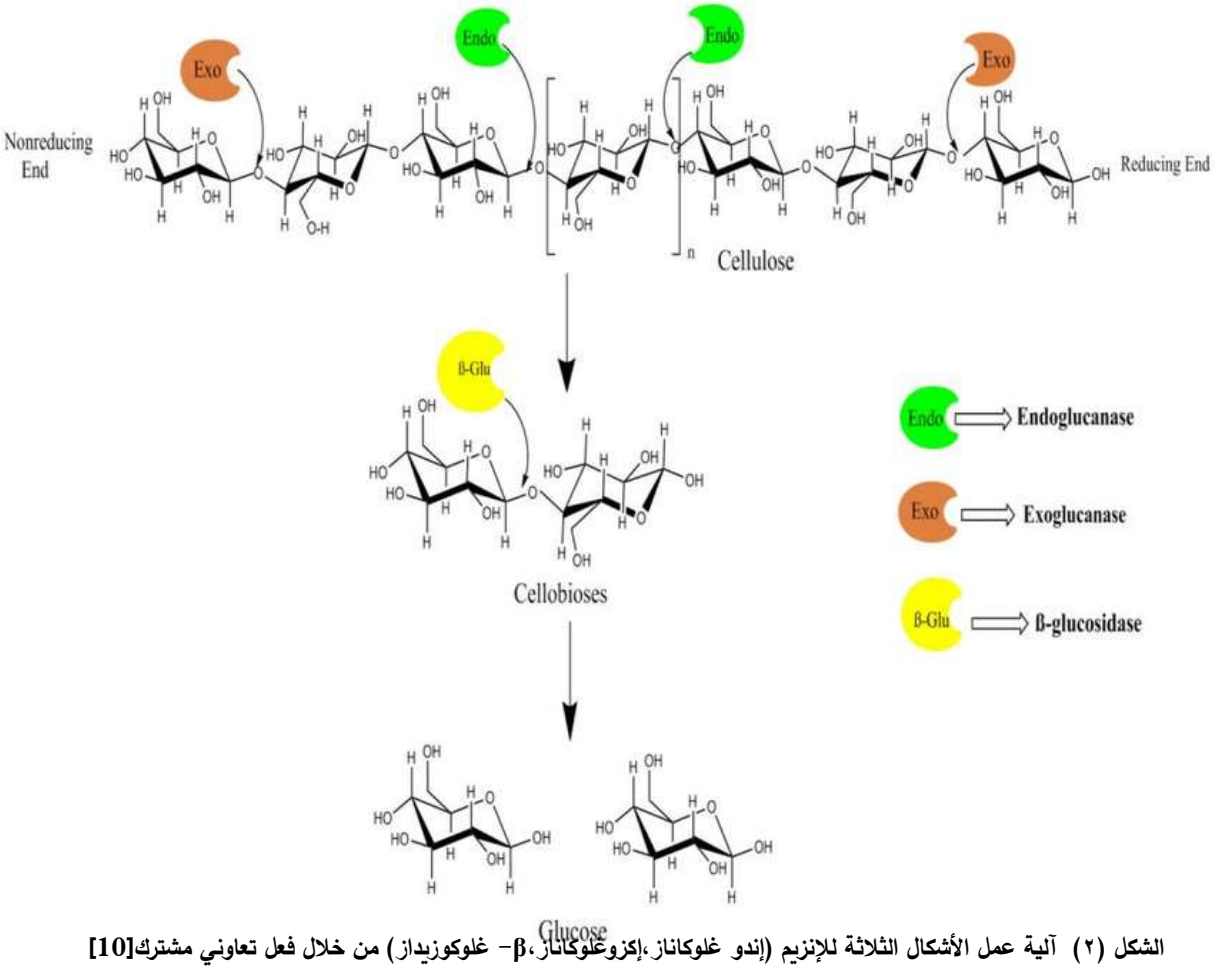
إن هذه العملية معقدة تحتاج إلى عمل مشترك لثلاثة إنزيمات من مجموعة السيلولاز هي:

- **Endo gluconase**: يملك هذا الإنزيم الشيفرة EC. 3.2.1.4 ويقوم بفك الروابط الداخلية للسيليلوز محولاً السيليلوز إلى سلاسل تتضمن نوعين من النهايات منها المختزلة ومنها غير المختزلة [10]
- **Exo gluconase**: يملك هذا الإنزيم الشيفرة EC. 3.2.1.91 ويقوم بتقطيع السلاسل الجديدة ليعطي جزيئات سيليبيوز وهو معقد أنزيمي يتكون من:

- سيلوبيوزهيدرولاز **Cellobiohydrolase**: حيث يحرر هذا الإنزيم السيليبيوز من النهايات المختزلة للسيليلوز.

- غلوكوز– غلوكونوهيدرولاز Glucose gluconohydrolase: حيث يحرر هذا الإنزيم السيليبيوز من النهايات غير المختزلة[9]

- β – Glucosidase: يملك هذا الإنزيم الشيفرة EC. 3.2.1.21 يعمل على حلمهة السيليبيوز وتحويله إلى غلوكوز[10]



الشكل (٢) آلية عمل الأشكال الثلاثة للإنزيم (إندو غلوكاناز،إكزوغلوكاناز،β- غلوكوزيداز) من خلال فعل تعاوني مشترك[10]

٢- أهداف البحث:

حظيت الصناعات الحيوية اهتماماً كبيراً من قبل الباحثين كبديل عن الصناعات الكيميائية بسبب التكلفة الباهضة لهذه الأخيرة واستعمال المواد الكيميائية التي قد تترك أثراً ضاراً بالبيئة، إلى جانب مشكلة التخلص من النفايات، ولذا يهدف البحث إلى:

- التعرف على أحد المصادر المحلية المنتجة لإنزيم السيلولاز
- الحصول على مستحضر إنزيمي يحتوي على إنزيم السيلولاز ودراسة فعاليته الأنزيمية
- تحديد الشروط المثالية لعمل هذا الإنزيم في المستحضر

٣- طرائق البحث ومواده:

٣-١- الأدوات المستخدمة:

- أوراق ترشيح دائرية ذات قطر 15 cm ماركة MACHEREY-NAGEL الألمانية، ورق ألمنيوم.
- زجاجيات المانية الصنع ماركة SCHOTT (بياشر، دوارق حجمية، ماصات وأقماع فصل) ذات سعات مختلفة.
- عبوات زجاجية معقمة سعة 5 ml.
- مايكروبايبيت 10-100 µl.، لواقح معدنية ، بارافيلم ، أطباق بتري بلاستيكية، قطن معقم

٣-٢-المواد المستخدمة:

- ماء ثنائي التقطير
- غلوكوز $C_6H_{12}O_6$ انتاج شركة Qualikems Fine Chemicals Pvt. Ltd., الهندية
- كلوريد البوتاسيوم KCl ، كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ ، كبريتات المغنزيوم $MgSO_4$، كلوريد الأمونيوم NH_4Cl، نترات الصوديوم $NaNO_3$، فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين K_2HPO_4، كربوكسي ميثيل السيليلوز CMC، انتاج شركة HIMEDIA الهندية
- هيدروكسيد الصوديوم NaOH، كبريتات الزنك $ZnSO_4$، كبريتات النحاس المائية $CuSO_4.5H_2O$، كبريتات الحديد $FeSO_4.7H_2O$، كلوريد الكوبالت $CoCl_2$، إنتاج شركة AVONCHEM الإنكليزية
- وسط NUTRIENT AGAR، وسط ببتون انتاج شركة TMMEDIA الهندية

٣-٣- طرائق البحث:

تم تحضير الأوساط الزرعية في مخابر علم الاحياء – كلية العلوم – جامعة تشرين، عزلت العينة من محيط جذور نبات القمح على عمق 5cm وذلك بأخذ 1g من التربة وطحنها ثم وزعت على طبق بتري بوجود مضاد حيوي لمنع نمو البكتريا، ثم حضن الطبق البتري عند درجة حرارة 25°C لمدة ٧ أيام، تم تحديد نوع الفطر باستخدام المجهر الضوئي بالاعتماد على شكل ونوع المستعمرة النامية. ودرست الفعالية الإنزيمية من خلال تحديد كمية الغلوكوز المتحرر عن حلمهة جزيئات من كربوكسي ميثيل السيليلوز CMC تحت تأثير المستخلص الإنزيمي الناتج عن المزارع الفطرية التي جرى إعدادها لهذه الغاية وذلك باستخدام جهاز المطياف الضوئي سبيكتروفوتومتر spectrophotometer في مخبر الكيمياء العضوية – قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين

تم إجراء البحث في الفترة الواقعة بين ٢٠٢٢/٩/١٥ و ٢٠٢٣/٢/٢٨

٣-٣-١- تحضير الأوساط الزرعية:

٣-٣-١-١- تحضير الوسط الصلب:

حُضّر الوسط الزرعي الصلب بحجم 1L عن طريق إضافة المواد الأتية[14]:

المادة	Agar	CMC	$NaNO_3$	$MgSO_4.7H_2O$	KCl	K_2HPO_4	$FeSO_4$
الكمية	20g	10g	2g	0.5g	0.5g	1.0g	0.01g

أذيبت جميع المكونات في الماء المقطر حتى التجانس باستثناء CMC تم إضافتها على دفعات مع التسخين والتحريك باستخدام محرك مغناطيسي ، وعقم الوسط باستخدام الأوتوكلاف عند الدرجة 121°C لمدة ربع ساعة ، بعد تبريد الوسط أضيف لوسط الزرع مضاد بكتيري لمنع نمو البكتريا وزع الوسط الزرعي في أطباق بتري وترك حتى يتصلب الوسط ، ثم أضيف الى الأطباق قرص من المستعمرات الفطرية ، وحضنت الأطباق عند الدرجة 28°C لمدة ٧ أيام مع المراقبة كل يوم.

٣-٣-١-٢- تحضير الوسط السائل:

حُضر الوسط الزرعي السائل بحجم 1L عن طريق إضافة المواد الأتية[17]:

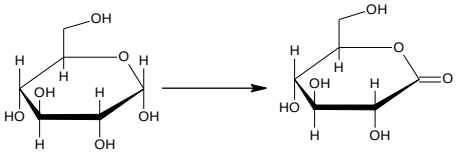
المادة	الكمية
CMC	10g
Pepton	1.0g
$(NH_4)_2SO_4$	1.4g
$ZnSO_4.H_2O$	0.0014g
$MgSO_4.7H_2O$	0.3g
$CaCl_2$	0.3g
KH_2PO_4	2.0g
Urea	0.3g
$CoCl_2$	0.002g
$FeSO_4.7H_2O$	0.005g

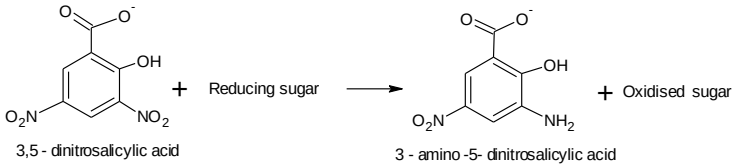
أذيبت جميع المكونات في الماء المقطر باستثناء اليوريا ، ثم تم توزيع المحلول في دوارق سعة 100ml بواقع 25ml في كل دورق ، وعقم الوسط باستخدام الأوتوكلاف عند الدرجة 121°C لمدة ربع ساعة ، بعد تبريد الوسط ثم وضعه في غرفة مزودة بأشعة الـUV ثم أضيف اليه اليوريا المعقم ، ثم أضيف مضاد بكتيري لمنع نمو البكتريا. لقحت الأوساط الزرعية بقرص من المستعمرة الفطرية ، وحضنت الدوارق بعد التلقيح في حاضنة عند الدرجة 28°C لمدة أسبوع ، بعد مضي فترة الحضن جرى ترشيح المحلول من أجل فصل الفطر عن المحلول الإنزيمي، وأضيفت بنزوات الصوديوم الى كل دورق من أجل إيقاف نمو الفطر ، وحفظ المحلول الإنزيمي عند الدرجة 4°C[18].

٣-٣-٢- دراسة العوامل المؤثرة في فعالية إنزيم السيلولاز:

٣-٣-٢-١- قياس كمية الغلوكوز المتحرر:

تم قياس فعالية السيلولاز اعتماداً على قياس كمية الغلوكوز المتحرر في الوسط من CMC تحت تأثير إنزيم السيلولاز. لهذا اعتمدنا في الكشف عن الغلوكوز المتحرر على إرجاع كاشف DNS حيث تعمل زمرة الكربونيل في سكر الغلوكوز على إرجاع للكاشف DNS وفق التفاعل التالي[11,15]:





نتيجة هذا التفاعل يتشكل معقد لوني مع الغلوكوز يمكن تحديد تركيزه على طول موجة 540nm لهذه الغاية جرى تحضير سلسلة عيارية من محلول الغلوكوز بتراكيز متزايدة وفق ما يلي:

$$(0.1 - 0.3 - 0.5 - 0.7 - 0.9 - 1.2)\ g/l$$

أخذ **1ml** من كل محلول وأضيف اليه **3ml** من كاشف **DNS** جرى حضن المحلول في حمام مائي بدرجة الغليان لمدة **10min** جرى تبريد الأنابيب إلى درجة حرارة المخبر وسجلت الامتصاصية الموافقة لكل تركيز.

٣-٣-٢-٢-دراسة تأثير درجة الحموضة pH:

حُضّر محلول مكون من 0.3ml مستخلص إنزيمي مع 1ml من محلول CMC تركيزه 0.25% و 1.7ml من محلول الفوسفات الموقي وقد اعتمد لهذه الغاية سلسلة من المحاليل الموقية امتدت من pH=3 حتى pH=8 وجرى حضن الأنبوب لمدة 15min وتم إيقاف التفاعل باستخدام حمام مائي بدرجة الغليان 100°C وسجلت النتائج الموافقة لفعالية الأنزيم عند كل قيمة pH [21].

٣-٣-٢-٣-دراسة تأثير درجة الحرارةT:

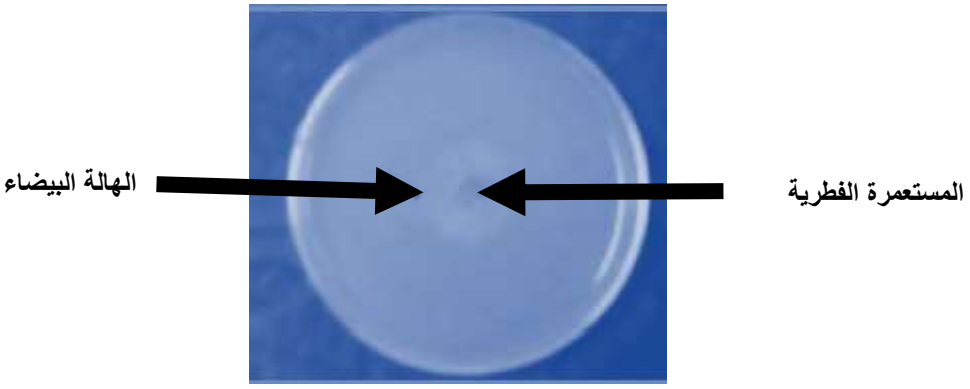
حُضّر محلول مكون من 0.3ml مستخلص إنزيمي مع 1ml من محلول CMC تركيزه 0.25% و 1.7ml من محلول الفوسفات الموقي pH=5 جرى حضن الأنبوب التفاعلي عند درجات حرارة مختلفة وتم ضبط الزمن على15min وتم إيقاف التفاعل باستخدام حمام مائي بدرجة الغليان 100°C وسجلت النتائج الموافقة عند درجات الحضن المعتمدة[21]

٣-٣-٢-٤- دراسة تأثير كمية الركازة:

تم اجراء الدراسة من خلال تحضير محلول مكون من 0.3ml مع المستخلص الإنزيمي و a ml من محلول CMC و b ml من محلول الفوسفات الموقي pH=5 بحيث يصبح حجم المحلول الكلي 3ml وجرى حضن الأنبوب التفاعلي عند درجة حرارة 30°C تم ضبط الزمن على 15min وتم إيقاف التفاعل بوضع أنابيب التفاعل في حمام مائي بدرجة الغليان عند الدرجة 100°C وسجلت النتائج الموافقة للفعالية الإنزيمية عند تراكيز مختلفة من الركازة

٤- النتائج والمناقشة:

تم استخدام أوساط الزرع الصلبة من أجل الكشف عن قدرة *Aspergillius niger* على إنتاج إنزيم السيلولاز تم الاستدلال على إنتاج الإنزيم من خلال ظهور هالة بيضاء حول المستعمرة الفطرية التي تم ملاحظتها بعد فترات من الحضن والتي زاد قطرها باستمرار فترة الحضن والذي يدل على استمرار انتاج الإنزيم خلال فترة الحضن، ان تشكل الهالة البيضاء هو نتيجة تحلل CMC تحت تأثير أنزيم السيلولاز. بالمقارنة مع الدراسة التي أجراها الباحث تامبوريني يعد فطر *Aspergillius nigr* قادر على إنتاج كميات كبيرة من إنزيم السيلولاز[16].

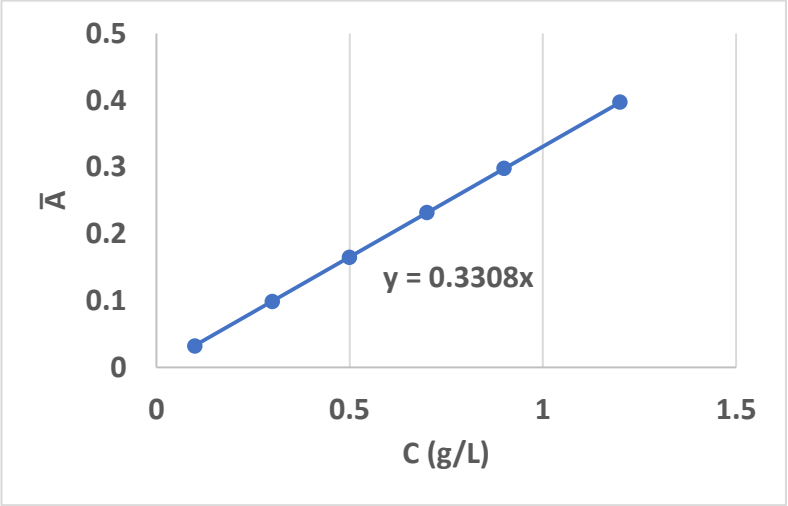


الشكل (٣) الكشف عن إنتاج إنزيم السيلولاز عن طريق تشكل هالة بيضاء حول المستعمرة الفطرية

٤-١- دراسة المنحني العياري:

الجدول(١) قيم الامتصاصية للمنحني العياري للغلوكوز

التركيز $C(g.L^{-1})$	الامتصاصية في التجربة الأولى A_1	الامتصاصية في التجربة الثانية A_2	المتوسط الحسابي للامتصاصية $\overline{A}$
0.1	0.033	0.031	0.032
0.3	0.098	0.098	0.098
0.5	0.165	0.165	0.165
0.7	0.232	0.231	0.2315
0.9	0.2979	0.2978	0.29785
1.2	0.3972	0.3972	0.3972



الشكل (٤) المنحني العياري لسلسلة تراكيز عيارية لمحلول الغلوكوز

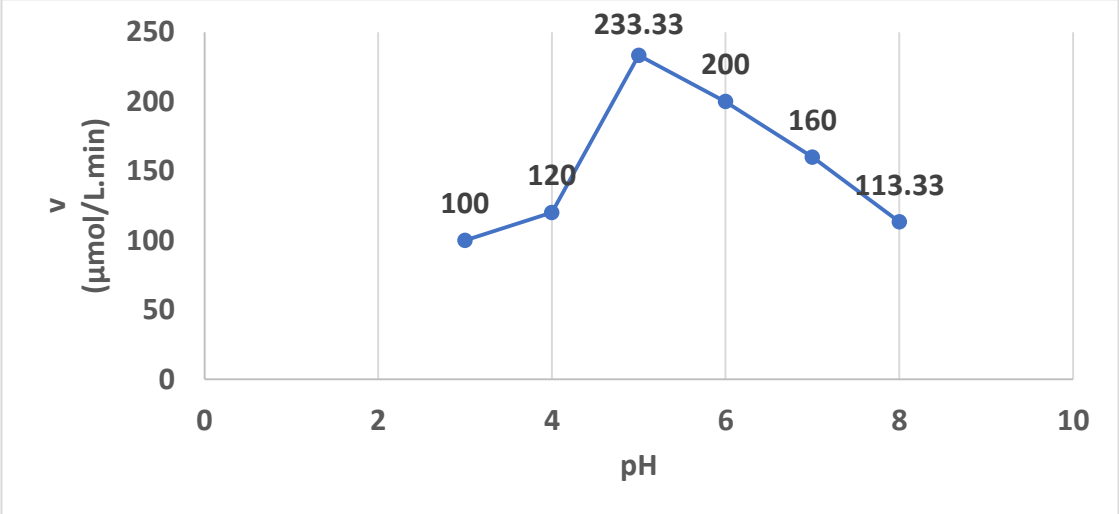
وحسبت كمية الغلوكوز المتحرر من خلال المعادلة $Y = 0.3308X$ حيث Y: الامتصاصية الموافقة و X: تركيز الغلوكوز المتحرر.

٤-٢- دراسة تأثير درجة الحموضة pH:

الجدول التالي قيم الفعالية الإنزيمية عند درجات حموضة مختلفة:

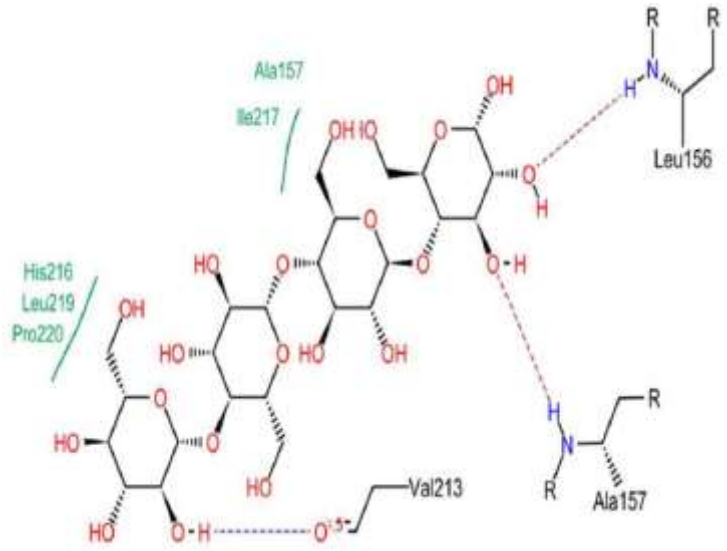
الجدول (٢) قيم الفعالية الإنزيمية عند درجات حموضة مختلفة

pH	تركيز الغلوكوز المتحررة في الوسط التفاعلي $\mu mol.L^{-1}$	$v(\mu mol.L^{-1}.min^{-1})$
3	1500	100.00
4	1800	120.00
5	3500	233.33
6	3000	200.00
7	2400	160.00
8	1700	113.33



الشكل (٥) تأثير درجة الحموضة pH على الفعالية الإنزيمية

نلاحظ من الجدول (٢) والشكل (٥) أن الفعالية الإنزيمية كانت منخفضة عند قيم pH منخفضة (PH=3) ثم بدأت تزداد مع زيادة درجة الحموضة لتبلغ أعلى قيمة لها عند قيمة pH=5 حيث بلغت الفعالية الأنزيمية 233.33µmol\L. min ثم بدأت بالانخفاض وهذا يدل على إن أنزيم السيلولاز يعمل عند ظروف حمضية ضعيفة وهذا يتوافق مع الدراسة [19] حيث ان الوسط الحمضي القوي يسبب حلمهة للبروتين الأنزيمي والوسط القلوي القوي يسبب تخريب في بنية البروتينات ، تؤثر قيم pH على تغير في تأين الزمر الوظيفية الفعالة التي تشارك في الفعل التحفيزي وبالتالي تتأثر بنية البروتين الأنزيمي بسبب احتواء المركز الفعال على زمرة قابلة للتأين والتي تؤثر على قوى التجاذب (الروابط الهيدروجينية) بين الركازة والمركز الفعال حيث تبين الدراسة التي قام بها الباحث khairudin و mazlan أن الزمر الوظيفية الموجودة في المركز الفعال تشكل ٣ روابط هيدروجينية مع الركازة وتتشكل هذه الروابط عن طريق كل من الفالين والليوسين والألانين [12] حيث تبلغ قيمة نقطة التعادل الكهربائي Pi لهذه الاحماض على الترتيب 5.96 , 5.98 .6.00



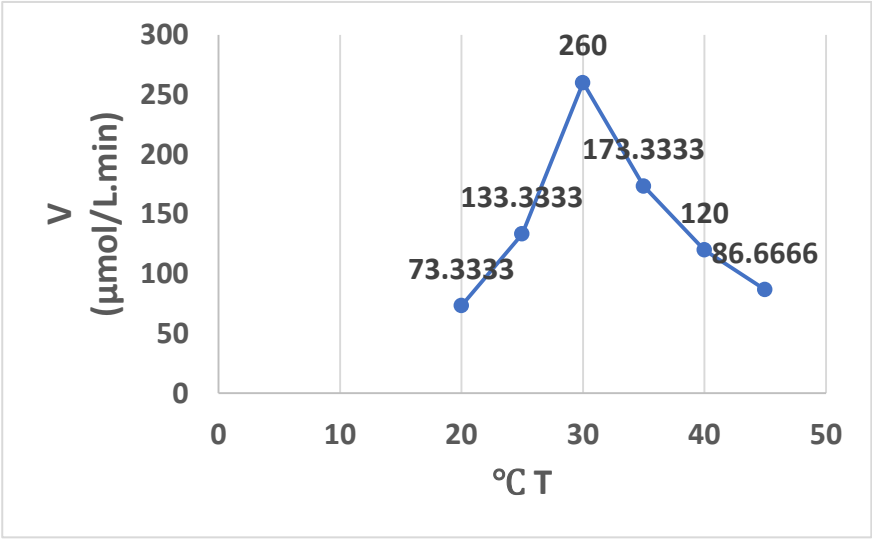
الشكل (٦) شكيل الروابط الهيدروجينية بين مادة التفاعل والزمر الوظيفية الموجودة في المركز الفعال للإنزيم

٤-٣-دراسة تأثير درجة الحرارة T:

يعرض الجدول التالي نتائج دراسة تأثير درجة الحرارة على الفعالية الإنزيمية لإنزيم السيلولاز:

الجدول (٣) تأثير درجة حرارة التفاعل على الفعالية الإنزيمية.

T(°C)	تركيز الغلوكوز المتحرر في الوسط التفاعلي $\mu mol.L^{-1}$	$v(\mu mol.L^{-1}.min^{-1})$
20	1100	142.93
25	2000	241.66
30	3900	475.26
35	2600	312.13
35	1800	217.33
45	1300	161.06



الشكل (٧) يبين تأثير درجة الحرارة T على الفعالية الإنزيمية

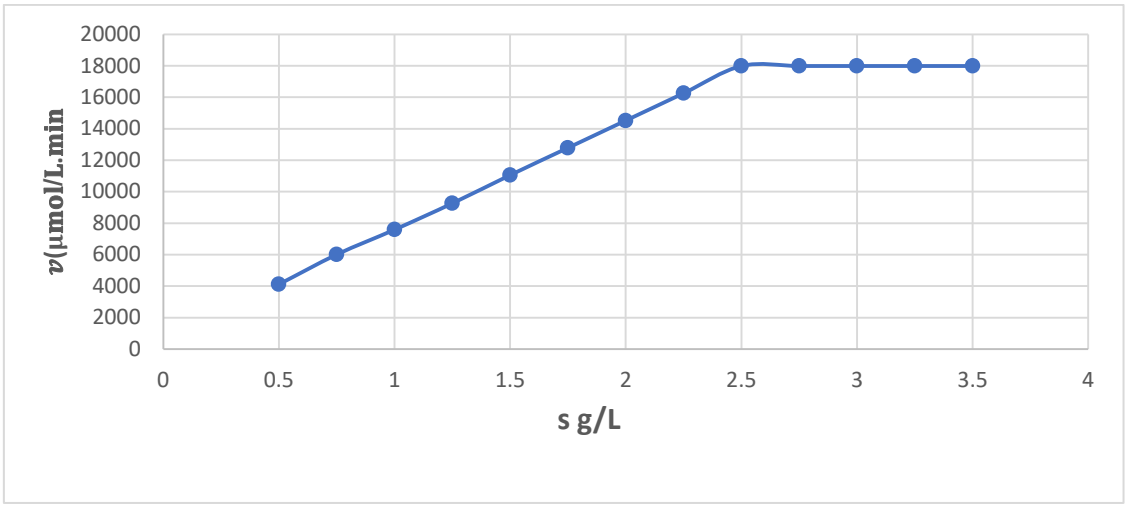
يبدو من النتائج في الجدول (٣) والشكل (٧) ان الفعالية الإنزيمية كانت منخفضة عند الدرجة 20°C حيث تكون الطاقة الحركية للإنزيم ومادة التفاعل منخفضة وبالتالي عدد التصادمات يكون قليل وبدأت الفعالية الإنزيمية تتزايد مع زيادة درجة الحرارة بسبب زيادة تصادمات المادة المتفاعلة مع الإنزيم مما يسبب انخفاض طاقة التنشيط وبالتالي زيادة سرعة التفاعل الإنزيمي حيث تبين ان درجة الحرارة المثلي لعمل الإنزيم بلغت 30°C وبعد بلوغ هذه الدرجة تبدأ الفعالية الإنزيمية في الانخفاض بسبب تخرب البنية الفعالة للإنزيم وبالتالي يقل عدد المراكز الفعالة التي ترتبط فيها مادة التفاعل وبالتالي انخفاض سرعة التفاعل الإنزيمي وانخفاض الفعالية الإنزيمية وبالعودة الى الدراسات المرجعية [20]حيث سجلت قيمة 30°C هي الدرجة المثلى لعمل إنزيم السيلولاز وهذا يتوافق مع الدراسة [20].

٤-٣- دراسة تأثير الركازة:

تتأثر سرعة التفاعلات الإنزيمية بتركيز الركازة التي يعمل عليها الإنزيم في الوسط التفاعلي، يبين الجدول التالي تغيرات الفعالية الإنزيمية بدلالة تركيز مادة التفاعل وهي CMC:

الجدول (٤) تأثير تركيز الركازة على الفعالية الإنزيمية

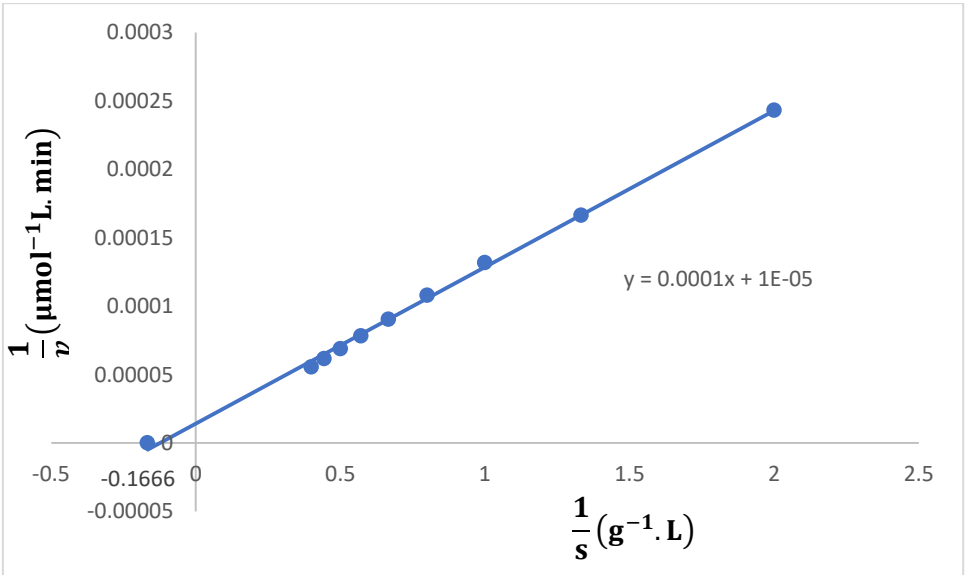
$s(g.L^{-1})$	**كمية الغلوكوز المتحرر في الوسط التفاعلي** $\mu mol.L^{-1}$	$v(\mu mol.L^{-1}.min^{-1})$
0.50	٦١٧٠٠	4113.33
0.75	٩٠١٠٠	6006.66
1.00	١١٣٨٠٠	7586.66
1.25	١٣٨٩٠٠	9260.00
1.50	١٦٥٨٠٠	11053.33
1.75	١٩١٨٠٠	12786.66
2.00	٢١٧٨٠٠	14520.00
2.25	٢٤٣٨٠٠	16253.33
2.50	٢٦٩٨٠٠	17986.66
2.75	٢٦٩٨٠٠	17986.66
3.00	٢٦٩٨٠٠	17986.66
3.25	٢٦٩٨٠٠	17986.66
3.50	٢٦٩٨٠٠	17986.66



الشكل (٨) تأثير الركازة على الفعالية الإنزيمية

يبين الجدول (٤) والشكل (٨) ان سرعة التفاعل الإنزيمي ازدادت بشكل طردي مع ازدياد تركيز الركازة في الوسط حتى وصلت الى عتبة تبدو فيها مستقرة وقد يكون ذلك لعدم كفاية كمية الإنزيم في الوسط التفاعلي او لتأثير عوامل أخرى ويفسر ذلك بأنه عند بداية التجربة تتصادم جزيئات الانزيم مع مادة التفاعل مكونة مركبات وسطية قليلة ومع زيادة تركيز مادة التفاعل يزداد عدد التصادمات وتزداد كمية المركبات الوسطية وتزداد السرعة بشكل طردي في المراحل الأولى من التفاعل (التفاعل من المرتبة الأولى بالنسبة الى مادة التفاعل) ، وعند إضافة كميات إضافية من الركازة يزداد احتمال التصادم بين جزيئات الإنزيم وجزيئات الركازة ويصبح التفاعل من المرتبة المختلطة بالنسبة لمادة التفاعل وباستمرار الإضافة لا تحدث زيادة لسرعة التفاعل وتبقى ثابتة ويصبح التفاعل من المرتبة صفر بالنسبة لمادة التفاعل.

ومن أجل حساب السرعة العظمى V_{max} وثابت ميكائليس منتن K_m نرسم العلاقة العكسية (لانفوير – بيرك):



الشكل (٩) علاقة لانفوير – ويفر

نلاحظ من الشكل (٩) ان السرعة القصوى للإنزيم عند درجة حموضة PH=5 ودرجة حرارة $T = 30C°$ باستخدام حجم ثابت من الإنزيم بلغت $V_{max} = 100000\ \mu mol.L^{-1}.min^{-1}$ وبلغت قيمة ثابت ميكائليس $K_m = 1.666\ g.l^{-1}$ بالمقارنة مع الدراسة المرجعية[17] بلغت قيمة $K_m = 1.8\ g.l^{-1}$ نلاحظ ان قيمة K_m اقل منه

المراجع:

[١] Zhou, J., Wang, Y. H., Chu, J., Zhuang, Y. P., Zhang, S. L. and Yin, P.(2008). *Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of Trichoderma viride T 100-14.Bioresource Technology*, 99: 6826-6833.

[2] Latif, F., Plus, J. and Malik, K. A. (1998). *Effect of alkali pretreatment on enzymatic hydrolysis of plant growing on saline lands. Biomass*., 17: 105-114.

[3] Headon, D. R. and Walsh, G. (1994). The industrial production of enzymes. Biotechnology, 12: 635-646.

[4]Jegannathan,K.R&P.H,Nielsen.(2013).*Environmental assessment of enzyme use in industrial production.* Journal of cleaner production, 42,228-240.

[5] Kilch, M.A. 2002. *Identification of Common Aspergillus Species*. CBC, Utercht,The Netherland.pp:280.

[6] Bennet,J.W.1985. *Taxonomy of Fungi and Biology of the Aspergilli. In:Biology of Industrial Microoganisms.(C.F)Demain*, A.L. and Solomon N.A.,eds.(Menlo Park, California:Benjamin / Cummings Pub.Co.). pp.359-406

[7] de França Passos, D., Pereira Jr., N., de Castro, A.M., 2018. *A comparative review of recent advances in cellulases production by Aspergillus*, Penicillium and Trichoderma strains and their use for lignocellulose deconstruction. Curr. Opin. Green Sustain. Chem. 14, 60–66.

[8] Anwar.Z,M.Gulfraz,M.Irashad.(2014*).Agro industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio- energy:A brief review*. Journal of Radiation Research and Applied Science,7 (2),163–173.

[9] Kim, B. H. and Wimpenny, J. W. T. (1981). *Growth and cellulytic activity of Cellulomonas flavisin.* Canadian Journal of Microbiology, 27: 1260-1266.

[10] Barzkar, N., Sohail, M., 2020. *An overview on marine cellulolytic enzymes and their potential applications. Appl*. Microbiol. Biotechnol. 104 (16), 6873–6892.

[11] Ikram.H&A.Sikander.(2007).*Kinetics Of Invertase Production By Saccharomyces Cerevisiae In Batch Culture. Pak. J*. Bot,39(3),907-912.

[12] N. B. A. Khairudin, N. S. F. *Mazlan, Molecular docking study of β-Glucosidase with cellobiose, cellotetraose and cellotetriose*. Bioinformation. 9(16) (2013) 813-817.

[13] Klemm, D., H.-P. Fink et al., 2005 , *Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material., Angew*, Chem. Int. Ed.,44, 3358 – 3393.

[14] Mandels, M. and Weber, J. (1969) *The production of cellulases and their applications. Adv.* Chem. Ser. 95, 391–414.

[15] Miller, R.G. and Phillips, R.A. (1969) *Separation of cells by velocity sedimentation. J. Cell. Physiol. 73, 191–201*

[16] Tamburini, E. Perito, B. and Mastromi, G. (2004*) Growth phase-dependent expression of an endoglucanase encoding gene (egl s) in Streptomyces rochei A2.* FEMS Microbiol. Lett. 237, 267–272.

[17] Mandels, M. and Strenbery, D.1976,*Recent advances in cellulose technology*. J.Ferment. Technol.54: 267 – 286.

[18] Okagbue, R. N.; Mwenje, T.; Kudange, T.; Siwela, M. and Sibanda,T. 2001,*Isolation of Aureobasidiumpullulans from Zimbabwean sources and glucosidase activities of selected isolates.* South African. J. Botany.67: 157 – 160.

[19] Goma M, Zein GN, Mahmoud RM, Gibriel A, Abouzied *M (1982). Characteristics of cellulolytic enzymes of Aspergillus niger and Aspergillus terreus*. Minufiya J. Agr. Res., 5: 299-317.

[20] Haque UI (1992) *Optimization of Cellulase Synthesis by Locally Isolated Trichoderma species using Agricultural By-products as Substrates (Dissertation*). Punjab University, Lahore, Pakistan.

[21]عبد الهادي ، شمال يونس. ٢٠١١ *تحديد كفاءة بعض العزلات الفطرية المحلية في إنتاج انزيم السليوليز*. مجلة تكريت للعلوم الصرفة. مجلد ١٦.العدد ٢ ،١٦٧-١٧٤.

[22] Kilch, M.A. 2002. *Identification of Common Aspergillus Species*. CBC Utercht , The Netherland.pp:280.

[23] Bennet,J.W.1985. Taxonomy of Fungi and Biology of the Aspergillus In:Biology of Industrial Microoganisms.(C.F)Demain, A.L. and Solomon N.A.,eds.(Menlo Park, California:Benjamin / Cummings Pub.Co.). pp.359-406

[24] Someren, K., H.C.M Kester, R.A. *Samson, and J.Visser.1990 Variations in Pectolytic Enzymes of the Black Aspergilli:A Biochemical and Genetic Approach. In:Modern Concepts im Penicillium and Aspergillus Classification*, Samson,R.A. and J.I.Pitt(Eds.). Plenum Press, New York

[25]Vincenti, B., Paris, E., Carnevale, M., Palma, A., Guerriero, E., Borello, D., Paolini, V., & Gallucci, F. (2022). *Saccharides as Particulate Matter Tracers of Biomass Burning: A Review*. International journal of environmental research and public health. 19(7): 4387.

[26] Srivastava, N., Srivastava, M., Mishra, P., Gupta, V.K., Molina, G., Rodriguez-Couto, S., Manikanta, A., Ramteke, P., 2018. *Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations.* Renew. Sust. Energ. Rev. 82, 2379–2386.

[27]