جامعة دمشق
كلية الهندسة الزراعية
قسم علوم الأغذية

وزارة التعليم العالي
الهيئة العامة للتقانة الحيوية

إنتاج إنزيم Polygalacturonase بالتخمير من أنواع فطرية مسببة لعفن الثمار، واختباره في صناعة العصائر

Production of Polygalacturonase by fermentation from fungal species causing fruit rots, and application in juice industry

رسالة أعدت لنيل درجة الدكتوراه في الهندسة الزراعية
(تخصص علوم الأغذية)

إعداد المهندسة
رشا عطا داود

المشرف العلمي
أ. د. محمد خير طحلة
كلية الهندسة الزراعية
قسم علوم الأغذية – جامعة دمشق

المشرف المشارك
أ. د. محمد فواز العظمة
الهيئة العامة للتقانة الحيوية

2017 م

تصريح

أصرح بأن هذا البحث **"إنتاج إنزيم Polygalacturonase بالتخمير من أنواع فطرية مسببة لعفن الثمار، واختباره في صناعة العصائر"** لم يسبق أن قُبل لأي شهادة، ولا هو مُقدّم حالياً للحصول على أية شهادة أخرى.

المرشحة

رشا عطا داود

Declaration

I hereby declare that this work "**Production of Polygalacturonase by fermentation from fungal species causing fruit rots, and application in juice industry**" has not been accepted for any degree, nor submitted concurrently for any other degree.

The Candidate

Rasha Ata Daoud

شهادة

نشهد أن العمل الموصوف في هذه الرسالة "**إنتاج إنزيم Polygalacturonase بالتخمير من أنواع فطرية مسببة لعفن الثمار، واختباره في صناعة العصائر**" هو نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة رشا عطا داود بإشراف الأستاذة الدكتور محمد خير طحلة (قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة دمشق)، والدكتور محمد فواز العظمة (الهيئة العامة للتقانة الحيوية)، وإن الاستعانة بأعمال باحثين آخرين قد تم توثيقها في النص وفي قائمة المراجع.

المرشحة	الإشراف	
رشا عطا داود	**أ.د. محمد خير طحلة**	**أ.د. محمد فواز العظمة**

Certification

It is hereby certified that the work described in this **thesis "Production of Polygalacturonase by fermentation from fungal species causing fruit rots, and application in juice industry"** is a result of Ms. Rasha Ata Daoud own investigations under the supervision of Professor Dr. **Mohammad.Kher. Tahla** (Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University) and Dr. **Mohammad Fawaz. Azmeh** (National Commission for Biotechnology), References to other researchers works have been fully acknowledged in the text and in the reference list.

The Candidate

Rasha Ata Daoud

Supervisors

Prof. Dr. Mohammad.Kher. Tahla **Prof. Dr. Mohammad Fawaz. Azmeh**

قُدّمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الدكتوراه في قسم علوم الأغذية في كلية الزراعة، جامعة دمشق، وأجيزت من قبل لجنة الحكم.

This thesis has been submitted as a partial fulfillment of the requirements for the Ph. D. degree in Food Science Department, Faculty of Agriculture, Damascus University. The thesis has been approved by referee committee.

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2017 / 9 /20

لجنة الحكم:

أ.د. محمد خير طحلة

أ.د. عبد الوهاب مرعي

أ.د. عبد الحكيم عزيزية

أ.د. صباح يازجي

د. شيم سليمان

كلمة شكر

بعد الشكر والامتنان لإلهي على إتمام هذا البحث، تحتار الحروف ولا تدري كيف تسطر كلمات الشكر التي تفي بحق من ساعدني وتعبر عن مدى امتناني لوقوفهم إلى جانبي . . .

بدايةً أتقدم ببالغ الشكر التقدير والاحترام إلى أستاذيّ الفاضلين (الدكتور محمد خير طحلة والدكتور محمد فواز العظمة) على ما بذلاه معي من جهد وما قدماه لي من نصائح وتوجيهات صائبة . . .

كما أتوجه بالشكر إلى كلية الزراعة وقسم علوم الأغذية رئيساً وأساتذة وأخص بالشكر الدكتور جهاد سمعان الذي ساعدني في إتمام الدراسة الإحصائية بكل نبل وإنسانية .

وبفيض من الحب والتقدير أتقدم بخالص الشكر والامتنان إلى عائلتي الثانية الهيئة العامة للتقانة الحيوية التي أنجزت بحثي في مخابرها ، وأخص بالشكر الأستاذ الدكتور عصام قاسم المدير العام لهيئة التقانة الحيوية .

واعترافاً بالجميل أتقدم ببالغ الشكر والإمتنان إلى الدكتورة سهى حبيب التي لم تتوانى في تقديم أي معلومة علمية بصدرها الرحب وابتسامتها المعهودة . وشكري الكبير لزملائي في الهيئة العامة للتقانة الحيوية وبشكل خاص الزميلة بثينة سلامة وللدكتورة لينة الأمير على كل ماقدموه لي من معونة أو نصيحة عن طيب خاطر،

كما أتقدم بخالص الشكر والتقدير لأعضاء لجنة الحكم لقبولهم تحكيم ومناقشة هذه الرسالة وعلى ماقدموه لي من ملاحظات قيمة أغنت بحثي .

آمل ألا يكون هذا العمل الشاطئ الأخير الذي بلغته وأتمنى أن تتجدد المعرفة . . . .

الإهداء

إلى قوتي . . . .فرحي . . . .سر نجاحي . . . .رفيق دربي في لحظات حياتي . . .

.....إلهي.....

يامن كبرت تحت رعايته وعنايته . . ولم اشعر أني كبرت

ويامن أُغرقني ببحر حنانه منذ نعومة أظفاري..

يامن غمرني بفيض دلاله وحبه الـــدائم

ويامن فرش دربي بالورود لماضٍ حكيم ومستقبل مشرق

الغائب عني جسداً لكن روحه تلازمني وذكراه في قلبي مؤبداً

أبـــــــــي رحمه الله

إلى أطهر وأنقى روح

إلى من علمتني كيف تزهر الأحلام بالتضحية

وكيف تزهو الأيام بالعمل والنجاح

إلى شاطئ الأمان الذي تلجأ إلية أشرعتي حين تشتد العواصف

إليك يا ست الحبايب

أمـــــي

إلى نجوم تسطع في سماء حياتي

إلى القلوب التي تخفق مع خفقات قلبي

الى من قضيت معهم كل لحظاتي الحلوة والمرة

إلى من لا تكتمل سعادتي إلا بوجودهم . . . . .

إخوتي

أنا إن نسيت لن أنسى أذكركم . . . معكم أملي ولكم قلبي

وهبتموني حياةً لست آلفها وقلوباً محبة

وإن كتبت . . . لا يكفيه مداداً . . . . ولا نهراً ولا بحراً . . .

أصدقائـــي.....

إلى قدوتي ونبراسي الذي ينير دربي

إلى من رفعت رأسي عالياً افتخاراً به

إلى من كان لي عوناً وسنداً

إلى رفيق دربي زوجي الحبيب

الدكتور لؤي الطربوش

فهرس المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
1- المقدمة	**1**
2-الدراسة المرجعية	**3**
2-1-تعريف الإنزيمات	3
2-1-1-وحدة قياس النشاط الإنزيمي	3
2-1-2-تصنيف الإنزيمات وتسميتها	4
2-1-3-آلية عمل الإنزيمات	4
2-2- المواد البكتينية وصلابة الثمار	5
2-3- إنزيمات البكتيناز **(Pectinolytic Enzymes)**	6
2-3-1-إنزيم **Polygalacturonase(PG)**	7
2-3-1-1-مصادر إنزيم **Polygalacturonases**	7
2-4-فطريات عفن الثمار	8
2-4-1-جنس ***Trichoderma***	9
2-5- العوامل المؤثرة على إنتاج إنزيم **polygalactyronase**	11
2-5-1- درجة الحرارة	11
2-5-2- درجة الحموضة**pH**	12
2-5-3- فترة الحضانة	12
2-5-4-سرعة التهوية	13
2-5-5-تركيز مادة التفاعل	13
2-6- طرائق إنتاج إنزيم **Polygalacturonase**	14
2-6-1-طرائق التخمير **Types of Fermentation**	15
2-6-1-1-تخمر البيئات السائلة **Submerged Fermentation**	15
2-6-1-2-تخمر المواد الصلبة **Solid Substrate Fermentation**	15
2-7- تقدير فعالية إنزيم **Polygalacturonase**	16
2-8- العوامل المؤثرة على النشاط الإنزيمي وسرعة التفاعل	17
2-8-1- درجة الحرارة:	17
2-8-2-درجة حموضة الوسط**pH**	18
2-8-3- تأثير تركيز الإنزيم على سرعة التفاعل	18
2-8-4- تأثير تركيز مادة التفاعل في سرعة التفاعل	19
2-8-5-تأثير وجود المثبطات أو العوامل المنشطة	19
2-9- تنقية الإنزيمات **Enzymes Purification**	20
2-9-1- طرائق تركيز الإنزيمات	21

2-9-2- طرائق الفصل المعتمدة على الشحنة	22
2-10- استخدامات إنزيم **Polygalacturonases**	25
3- المواد والطرائق	**28**
3-1-جمع العينات	29
3-2-عزل الفطور	29
3-4-تحديد الفطور	30
3-5-غربلة العزلات الفطرية لإنتاج إنزيم **Polygalacturonase**	30
3-5-1-الغربلة الأولية للعزلات الفطرية	30
3-5-2-الغريلة الثانوية التالية للعزلات الفطرية	31
3-6-اختيار الركيزة الأمثل لأنتاج إنزيم **polygalacturonase**	32
3-7-أمثلة ظروف إنتاج إنزيم **polygalacturonase** بطريقتي التخمير المغمورة والصلبة	33
3-7-1-طريقة التخمير المغمور	33
3-7-2-طريقة التخمير الصلب	33
3-7-3- تصميم التجربة	34
3-8-دراسة الصفات الفيزيوكيميائية لإنزيم **polygalacturonase** الخام المنتج من الفطر بالطريقة المغمورة	37
3-9-التنقية الجزئية لإنزيم **polygalacturonase** المنتج من ***Tri 4*** بطريقة التخمير المغمور	39
3-9-1-الحصول على محلول الإنزيم الخام	39
3-9-2-ترسيب البروتينات	39
3-9-2-1-المعاملة بالحرارة	39
3-9-2-2-الترسيب بالاسيتون	39
3-9-3-تقنية الترشيح **Gel –Filtration** باستخدام عمود الـــ **Sephacryl S-200**	40
3-9-4-الرحلان الكهربائي للبروتين على هلامة عديد الاكريلامايد **SDS-PAGE gel**	42
3-10-ترويق عصير التفاح باستخدام إنزيم **polygalacturonase** المنتج من الفطر ***Tri 4***	46
4-النتائج والمناقشة	**48**
4-1-نتائج تصنيف الفطور	48
4-2-اختبار قدرة العزلات الفطرية على إنتاج إنزيم **Polygalacturonase**	52
4-2-1-نتائج الغربلة الأولية للعزلات	52
4-2-2-نتائج الغربلة الثانوية للعزلات الفطرية	56
4-3- اختيار الركيزة الأمثل لأنتاج إنزيم **polygalacturonase**	57
4-4-نتائج أمثلة ظروف إنتاج إنزيم **polygalacturonase** بطريقتي التخمير المفمورة والصلبة:	58
4-4-1-طريقة التخمير المغمور	58
4-4-2-طريقة التخمير الصلب	68
4-5-دراسة الصفات الفيزيوكيميائية لإنزيم **polygalacturonase** الخام المنتج من الفطر ***Tri 4***	75

بالطريقة المغمورة	
4-6-نتائج التنقية الجزئية لإنزيم **polygalacturonase** المنتج من ***Tri 4*** بطريقة التخمير المغمور	81
4-7-الفصل بالرحلان الكهربائي للبروتين باستخدام **SDS-PAGE**	84
4-8-نتائج ترويق عصير التفاح باستخدام إنزيم **polygalacturonase** المنتج من الفطر ***Tri4***	87
5- الاستنتاجات CONCLUSION	**89**
6-التوصيات RECOMMENDATIONS	**91**
7-المراجع	**92**

فهرس الجداول

عنوان الجدول	رقم الصفحة
الجدول(1)محتوى البكتين في الفواكه والخضروات المختلفة	6
الجدول (2) الطرائق المختلفة لتنقية إنزيم Polygalacturonase المنتج من أنواع قطرية مختلفة والأوزان الجزيئية المتباينة للإنزيم	24
الجدول (3) الأجهزة المستخدمة في البحث	28
جدول(4) نوع وعدد العينات المدروسة	29
جدول (5)تركيب وسط إنتاج إنزيم Polygalacturonase	31
جدول(6) تصميم التجربة لأمثلة ظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase بالخمير المفمور	35
جدول(7) تصميم التجربة لأمثلة ظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase بالخمير الصلب	36
جدول(8) مكونات هلامة الفصل وهلامة الرص	44
جدول(9) الأجناس الفطرية الناتجة في العينات المدروسة	48
الجدول(10)العزلات الفطرية وأجناسها ومصادرها وأقطار الهالات الشفافة المتشكلة	53
جدول(11)متوسط قطر الهالة الشفافة المتشكلة من تنمية الفطر ***Tri 4***على ثلاث أنواع من المخلفات	57
جدول(12) الفعالية الإنزيمية في المعاملات المدروسة بالطريقة المغمورة	59
جدول(13)تحليل التباين لفعالية الإنزيم بالطريقة المغمورة	60
جدول(14) الفعالية الإنزيمية في المعاملات المدروسة بالطريقة الصلبة	62
جدول(15) تأثير العوامل المدروسة في فعالية إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير الصلب	68
جدول(16)تحليل التباين لفعالية الإنزيم بالطريقة الصلبة	69
جدول (17) تأثير بعض الشوارد المعدنية(بتركيز 1mM)في فعالية إنزيم polygalacturonase الخام	71
جدول(18) مراحل التنقية لإنزيم polygalacturonase(PG)	80
جدول(19) تأثير كل من درجة الحرارة وزمن التحضين في الترويق الإنزيمي لعصير التفاح معبراً عنه بالنفاذية الضوئية على 650 نانومتر	84
جدول(20) تأثير تراكيز من إنزيم polygalacturonase والجيلاتين في ترويق عصير التفاح معبراً عنه بالنفاذية الضوئية على 650 نانومتر	88

فهرس الأشكال

عنوان الشكل	رقم الصفحة
الشكل (1)معادلة ارجاع الـــ DNS	17
شكل(2) المنحني القياسي للبروتين (BSA) باستخدام ألبومين المصل البقري	42
شكل (3) الجنس الفطري *Aspergillus* تحت المجهر الضوئي	49
شكل(4) الجنس لفطري *Penicillium* تحت المجهر الضوئي	49
شكل (5) الجنس الفطري *Mucor* تحت المجهر الضوئي	50
شكل(6) الجنس الفطري *Moniliella* تحت المجهر الضوئي	50
شكل (7) الجنس الفطري *Trichoderma* تحت المجهر الضوئي	51
شكل (8) الجنس الفطري *Alternaria* تحت المجهر الضوئي	51
شكل(9) الجنس الفطري *Botrytis* تحت المجهر الضوئي	52
الشكل(10) الهالة الشفافة الناتجة عن تفكك البكتين في الوسط لأفضل العزلات الفطرية المدروسة	52
الشكل(11) يبين المنحني القياسي لحمض د -غالاكتيورونيك	56
الشكل (12) الفعالية الإنزيمية للعزلات الفطرية المدروسة	57
الشكل (13) الظروف المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير المغمور من الفطر *Tri* 4 باستخدام قشور البرتقال كركيزة بواسطة البرنامج الإحصائي RSM	63
شكل (14) درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة	64
شكل (15) درجة الحموضة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة	65
شكل (16) فترة الحضانة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة	66
شكل (17) سرعة التهوية المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة	67
شكل (18) التركيز الأمثل للركيزة(قشور البرتقال) لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور	67

الشكل (19) الظروف المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير الصلب من الفطر *Tri* 4 باستخدام قشور البرتقال كركيزة بواسطة البرنامج الإحصائي RSM	72
شكل (20) درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة	72
شكل (21) درجة الحموضة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة	73
شكل (22) مدة التحضين المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة	74
شكل (23) سرعة التهوية المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة	74
شكل (24) نسبة الرطوبة الأولية المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة	75
شكل (25) تأثير درجة الحرارة في الفعالية الإنزيمية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4*	76
شكل (26) تأثير زمن الحضن في الثباتية الحرارية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4* عند درجات حرارة مختلفة	77
شكل(27) تأثير درجة الحموضة في الفعالية الإنزيمية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4*	78
شكل (28) تأثير زمن الحضن في الثباتية الحمضية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4* عند درجات حموضة مختلفة	79
شكل(29) تأثير تركيز الركيزة polygalacturonic acid (PGA) في فعالية الإنزيم الخام	81
الشكل(30) نتائج تنقية PG باستخدام هلامة Sephacryl S-200	83
شكل (31) نتائج الرحلان الكهربائي للأجزاء الناتجة عن مراحل التنقية	85
الشكل(32) المنحني القياسي الناتج عن الرحلان الكهربائي للبروتينات المعروفة الوزن على هلامة SDS-PAGE	86

قائمة المختصرات

الاختصار	الاسم الكامل
CMC	Carboxymethyl cellulose
PDA	potato dextrose agar
SMF	Submerged Fermentation لتخمير بالحالة السائلة
SSF	Solid-State Fermentation التخمير بالحالة الصلبة
DNSA	Dinitrosalicylic acid
pH	الرقم الحمضي
PG	Polygalacturonase
PGA	Polygalacturonic acid
MW	Molecular Weight الوزن الجزيئي
RSM	Response Surface Methodology تصميم التجارب المتقدم
BSA	البومين المصل البقري
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
BME	β-Mercaptoethanol
APS	Ammonium Per Sulsat
TEMED	Tetramethylendiamin
ddH2o	Doble dialized water
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology

الملخص

اختبرت 80 عزلة فطرية محلية من ثمار الفاكهة والخضار والبصل المتعفن وأفرع المشمش للكشف عن إنزيمات البكتيناز Pectinases، شملت هذه العزلات أجناساً فطرية مختلفة (*Mucor-Botrytis –Trichoderma-Alternaria- –Aspergillus –Penicillium Monilinia*). أجريت الغربلة الأولية للعزلات المدروسة بتنميتها على وسط Czabek-DoxAgar المحور باستبدال السكروز بالبكتين كمصدر وحيد للكربون للتأكد من قدرتها على إنتاج إنزيمات البكتيناز وانتخبت أفضل 15 عزلة فطرية وذلك بقياس قطر الهالة الشفافة المتشكلة حول كل مستعمرة. ثم أجريت غربلة ثانوية لهذه العزلات بطريقة حمض دينتروساليسيليك (DNSA)، وتم انتخاب العزلة Tri4 التابعة للجنس *Trichoderma* كأفضل منتج لإنزيم Polygalacturonase (فعالية إنزيمية 157u/ml)، تليها مباشرة العزلة Asp1 التي تعود للنوع *Aspergillusniger* (فعالية إنزيمية 131u/ml).

استخدمت ثلاث أنواع من المخلفات (قشور برتقال–قشورالموز–تفل التفاح) كركيزة لنمو *Tri4*وتبين أن أعلى فعالية إنزيمية للعزلة Tri4 كانت عند استخدام قشور البرتقال

كما حددت الشروط المثلى لظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير المغمورة من الفطر *Trichoderma* باستخدام قشور البرتقال كركيزة هي درجة الحرارة 30^0c، pH5=، سرعة التهوية 150 دورة/دقيقة، تركيز الركيزة 3%، مدة التحضين 5أيام. بينما كانت الشروط المثلى لإنتاج الإنزيم بالتخمير الصلب: الحرارة 28^0c، pH 5= سرعة التهوية 150 دورة/دقيقة،نسبة الرطوبة الأولية65%، مدة التحضين 4 أيام.

درست الصفات الفيزيوكيميائية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من الفطر *Trichoderma* بالطريقة المغمورة فكانت أفضل درجة حرارة لفعالية الأنزيم 55^0c حيث يعطي فعالية 330 U./Ml، كما احتفظ الإنزيم بـــ 95% من فعاليته بعد تسخينه على درجة حرارة 55^0س لمدة ساعة واحدة،وأفضل رقم حموضة pH5 حيث كانت الفعالية 360.4U./mL، كما لعبت شوارد Ag^{+2} و Mn^{+2} دور منشطاً لعمل الإنزيم حيث أدت لإضافتها إلى زيادة الفعالية بنسبة 37 و 10% على التوالي، أما شوارد الحديد فقد لعبت دوراً مثبطاً حيث أدت إلى انخفاض الفعالية بنسبة 21%، كما كان لحمض الليمون أثر منشط لعمل الإنزيم حيث ارتفعت الفعالية بنسبة 41% لدى إضافته بتركيز 1mM.

نقي الإنزيم باستخدام الترسيب بالحرارة والاسيتون المبرد وهلامة Sephacryl S-200، حيث كانت الحصيلة الإنزيمية للإنزيم المنقى **20.7%** وبلغت عدد مرات التنقية 4.7مرة، كما تم تعيين الوزن الجزيئي لبروتين PG باستخدام SDS-PAGE وبلغ 29 كيلو دالتون.

– عولج عصير التفاح أنزيمياً بواسطة إنزيم polygalacturonase فكانت أفضل درجة ترويق عند درجة حرارة 50^0c بعد 5 ساعات تحضين و بالتركيز 2.5% من الإنزيم وبوجود الجيلاتين بتركيز 0.015%

Abstract

Eighty fruit local rot fungal isolates were obtained from fruits, vegetables, molded onions,and apricot branches, and they were tested for their ability to produce Pectinases. These isolates were identified to the genus level and they belonged to different fungal genera (*Penicillium- Aspergillus- Mucor-Botrytis - Trichoderma-Alternaria-Monilinia*). Isolates were screened primarily for their ability to produce pectinases using modified Czabek-Dox Agar medium containing pectin instead of sucrose as the only carbon source, and the best 15 isolates were selected according to the diameters of clear zones formed around colonies. Secondary screening for these isolates was performed using DNSA method, and the isolate Tri4 was selected as the best for Polygalacturonase production (enzymatic activity 157 u/ml, followed by Asp1 belonged to *Aspergillusniger* (enzymatic activity 131 u/ml).

Three substrates include 3 types of remnants (orange peel, banana peel, apple dips) were used and it was found that orange peel was the best for higher enzymatic activity formTri4.

Optimal parameters for the production of polygalacturonase by Tri4 on orange peel substrate using submerged fermentation were identified; results showed that they were 30°c, pH 5, ventilation speed 150 rpm, 3% substrate concentration and incubation for 5 days. While optimal parameters for the production of polygalacturonase using solid state fermentation were 28°c, pH 5, ventilation speed 150 rpm, 65% primary moisture and incubation for 4 days.

Physiochemical properties of crude polygalacturonase produced by Tri4 were studied in submerged method,the temperature 55°c gave the highest enzymatic activity330 u/ml, and the enzyme PG was thermally stable at 55°c for one hour with 95% of its enzymatic activity. The optimal pH value for enzyme activation was 5 giving 360.4 u/ml. Ions of $Mn^{+2}$and Ag^{+2}ions and citric acid concentration 1mM had positively affected the enzymatic activity which it was increased 37%, 10% and 41% respectively, while Fe^{+2} ions had negatively affected the enzymatic activity which it was reduced 21%.

Enzyme was purified using heating and cooled acetone precipitation and SephacrylS-200 gel, so that the enzymatic yield for purified enzyme was 20.7% and purification times were 4.7. Molecular weight of PG was dertermined by SDS-PAGE and it was 29 KDa.

Polygalacturonasewas used for apple juices clarification and the best result obtained after 5 hours at 50°c and 2.5% enzyme concentration with 0.015% gelatin.

1- المقدمة:

اكتشفت منذ بداية القرن السابع عشر مواد من شأنها أن تسرع التفاعلات الكيميائية عرفت باسم الإنزيمات، وهي مواد توجد في الخلية، وتعتبر عوامل مساعدة بروتينية تعمل داخل الأنظمة الحيوية والبعض منها له القدرة على العمل خارج الأنظمة الحية. تنتج بعض الإنزيمات على نطاق تجاري بكميات كبيرة سنوياً لتستعمل في العديد من الاستعمالات الطبية والصناعية وأغراض أخرى، وقد عرف تأثير الإنزيمات في مجال الأغذية منذ القدم وخاصةً في صناعة الخبز والمعجنات والحلويات وصناعة الألبان والأجبان وتطرية اللحوم وغيرها من الصناعات.

استخلصت الإنزيمات في الماضي من النباتات والحيوانات إلا أن إنتاجها بواسطة الكائنات الحية الدقيقة ازداد بسرعة كبيرة بسبب سرعة نموها وتكاثرها وتوفر المواد الأولية اللازمة لتنميتها، فضلاً عن إمكانية تحسين إنتاجها من خلال التحكم في الظروف الزرعية للوصول إلى الظروف البيئية والتغذوية المثلى للإنتاج، ورغم محدودية الأحياء الدقيقة المستخدمة في الإنتاج الصناعي للإنزيمات إلا أن التوجه يزداد يوماً بعد يوم لاستغلال التطورات الهائلة التي تشهدها حقول التقانة الحيوية لإنتاج إنزيمات بمواصفات وكميات تلبي احتياجات الأسواق العالمية منها.

تشغل الإنزيمات المحللة للبكتين المنتجة من الأحياء الدقيقة مكانة هامة حيث أن إنتاجها على نطاق تجاري قد قطع شوطاً واسعاً، إلا أن التحري عن عزلات جديدة منتجة لها وبمواصفات خاصة وعلى نحو أكثر وفرة يبقى مجالاً مفتوحاً للبحث العلمي، ومن هنا جرى التفكير في دراسة إنتاج أحد الإنزيمات المحللة للبكتين وهو إنزيم Polygalacturonase نظراً لأهمية هذا الإنزيم في المجالات الصناعية المتعددة، وخاصة الصناعات الغذائية منها، وتطوير إنتاجه محلياً وتسليط الضوء على مصادر غير مدروسة مثل الفطور المسببة لعفن الثمار، وذلك باستخدام ركائز رخيصة الثمن كالمخلفات الزراعية ومخلفات مصانع الأغذية وبالتالي حماية البيئة والتقليل من تلوثها من خلال الاستفادة من هذه المخلفات وتصنيعها وإعادة تدويرها وإقامة الكثير من الصناعات عليها.

مبررات البحث:

نظراً لأهمية أنزيم polygalacturonase في المجالات الصناعية المتعددة، وخاصة الصناعات الغذائية منها. وللاستغناء عن استيراد هذا المركب الحيوي الهام، فإنه من الضروري إنتاجه محلياً وتسليط الضوء على إنتاجه من فطريات عفن غير مدروسة وذلك باستخدام ركائز رخيصة الثمن كالمخلفات الزراعية ومخلفات مصانع الأغذية وبالتالي حماية البيئة والتقليل من تلوثها من خلال الاستفادة من هذه المخلفات وتصنيعها وإعادة تدويرها وإقامة الكثير من الصناعات عليها

أهداف البحث:

- عزل وانتخاب فطريات عفن منتجة لإنزيم polygalacturonase .
- أمثلة ظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase بطريقتي التخمير المغمورة والصلبة من الفطور باستخدام بعض المخلفات الغذائية كمصدر وحيد للكربون.
- تنقية جزئية لإنزيم polygalacturonase.
- دارسة استخدام إنزيم polygalacturonase في بعضصناعة العصائر.

2-الدراسة المرجعية:

2-1-تعريف الإنزيمات:

تعتبر عوامل مساعدة حيوية تعمل على تسريع معدلات التفاعلات الكيميائية، وهي ذات تركيب بروتيني عالي الوزن الجزيئي، و كغيرها من البروتينات فإن الإنزيم يتألف من اتحاد عدد كبير من الأحماض الأمينية تكون فيما بينها سلسلة أو أكثر من عديد الببتيد، وتوجد الأحماض الأمينية في هذه السلاسل وفق تتابع معين خاص بكل إنزيم مما يؤدي في النهاية إلى تركيب فراغي محدد يمكن الإنزيم من القدرة على تسريع حدوث تفاعل خاص به.

الإنزيم هي كلمة لاتينية تعني في الخميرة (in yeast) حيث اكتشفت أولا في عملية تخمير الغلوكوز إلى كحول بواسطة الخميرة. (Sudheer *et al*, 2010)

تتشابه الإنزيمات في فعلها مع العوامل المساعدة الكيميائية الأخرى. إذ أنها تشارك في التفاعل دون أن تغير من نتيجته، أي أنها تعود في نهاية التفاعل إلى وضعها الأصلي الذي كانت عليه قبل بدء التفاعل مما يمكنها من المشاركة بتفاعل جديد وهذا ما يسمح لكميات قليلة من الإنزيم بالمشاركة لفترة زمنية طويلة في التفاعل، لكنها تمتاز عن العوامل المساعدة الأخرى بكفاءتها العالية. كما تمتاز عن العوامل المساعدة الأخرى بالدرجة العالية من التخصص التي تتمتع بها حيال المادة المتفاعلة ونوع التفاعل. فكل إنزيم يختص بمادة متفاعلة واحدة يطلق عليها الركيزة Substrate، وقد يختص الإنزيم بمجموعة محددة من المواد المتشابهة في التركيب.

والأمثلة على اختلاف الإنزيمات باختلاف الركيزة عديدة يذكر منها تفكك الرابطة الغليكوسيدية أو الرابطة الإسترية أو الرابطة الببتيدية في جزيئات الكربوهيدرات والدهون والبروتين على التوالي. (David *et al*, 2008)

يتم في جميع هذه التفاعلات يتم كسر الرابطة بإضافة جزيء من الماء حيث تضاف مجموعة هيدروكسيل OH– إلى إحدى الذرتين بينما تضاف ذرة هيدروجين H- إلى الذرة الأخرى. (Rehman and Qader, 2012).

2-1-1-وحدة قياس النشاط الإنزيمي:

تعرف وحدة الفعالية الانزيمية بأنها كمية الإنزيم اللازمة لتحويل 1 ميكرومول من مادة التفاعل إلى نواتج في الدقيقة الواحدة عند الظروف المثلى لعمل الإنزيم (درجة الحرارة –

الاس الهيدروجيني –تركيز مادة التفاعل) أما النشاط النوعي للإنزيم فهو عدد وحدات الإنزيم الموجودة في الميلي غرام بروتين.

(Akhter *et al*, 2011).

2-1-2-تصنيف الإنزيمات وتسميتها:

عندما عرفت الإنزيمات أعطيت أسماء بسيطة مشتقة من طبيعة عملها أو مكان وجودها، مثل إنزيم الببسين الهاضم للبروتين ثم اشتق اسم الإنزيم من الركيزة مع إضافة (آز) (ase) مثل إنزيم الليباز(lipase) الذي يعمل على الليبيدات (lipid) إنزيم اليورياز الذي يفكك اليوريا إلى امونيا وغاز ثاني لأكسيد الكربون وبسبب اكتشاف المزيد من الإنزيمات ووجود أكثر من إنزيم للهدف الواحد وضع الاتحاد الدولي للكيمياء الحيوية والبيولوجيا الجزيئية IUBMB نظاماً خاصاً للتسمية حيث قسمت الإنزيمات الى 6 أصناف حسب نوع التفاعل ويقسم كل قسم منها الى أجزاء فرعية مرقمة الى 4 أرقام لكل إنزيم:

الرقم الاول يدل على الصنف (1-6)

الرقم الثاني يدل على المجموعات التي تضاف أو تحذف

الرقم الثالث يدل على المرافق الإنزيمي أو المجموعة المستقبلة للمواد .

الرقم الرابع يدل على نوع مادة التفاعل (Elgin *et al.*, 2005; Dolan, 2008).

2-1-3-آلية عمل الإنزيمات:

تنتج الخلايا الحية الإنزيمات وتؤدي هذه عملها عن طريق تعديل الجزيئات الأخرى حيث تتحد مع الجزيئات المعدلة لتكوين تركيب جزيء يحدث فيه التفاعل الكيميائي ثم ينفصل الإنزيم بدون أن يحدث له تغييراً ناتجاً عن التفاعل، وتعتمد آلية عمل الإنزيمات باتصاله من خلال الموقع النشط Active site بجزيء المادة الخاضعة (مادة التفاعل) Substrate بحيث يكون معقد الإنزيم والمادة الخاضعة . ويوجد في جسم الكائن الحي آلاف الإنزيمات لكل منها ماده خاضعة خاصة تتناسب معها تماماً، لذلك فأن الإنزيمات تؤدي الى التحفيز، ويمكن لجزيء إنزيم واحد أن يؤدي عمله كاملا مليون مره في الدقيقة ويحدث التفاعل بوجود الإنزيم بسرعة تفوق سرعة حدوثه بدون الإنزيم بآلاف وحتى ملايين المرات. (Gomes *et al*, 2011)

2-2- المواد البكتينية وصلابة الثمار:

تلعب المواد البكتينية دوراً هاما في صلابة الثمار حيث أن الصفيحة الوسطى middle lamella تتكون فقط من مواد بكتينية، أما الجدار الأولي فيحتوي على المواد البكتينية بالإضافة إلى السيلولوز وهيميسيلولوز والبروتينات والليبيدات ، يلي الجدار الأولى الجدار الثانوي لخلايا الثمار فيحوى القليل من المواد البكتينية ويكون المكون الأساسي هو السيلولوز. وعند نضج الثمار تحدث التغيرات في الصفيحة الوسطى والجدار الأولي بينما لا يحدث أي تغيير في الجدار الثانوي وما يحدث في الصحيفة الوسطى والجدار الأولي ما هو إلا تحلل بكتات الكالسيوم الغروية اللاحمة بين الخلايا إلى مركبات تذوب في الماء فينتهي دورها اللاحم وتلين على أثره تلك الثمار فيصبح نزع القشرة عن الثمرة سهلاً . (Agrios, 2005) تتكون المواد البكتينية في الصفيحة الوسطى والجدار الثانوي من وحدات متكررة من حمض غلاكتورونيك مرتبطة بروابط غلوكوزيدية 1,4 -α ومجموعات ميثانول وتشمل على كل من:

- حمض البكتيك الذي يتكون من أربع وحدات حمض غلاكتورونيك بالإضافة إلى سكر خماسي هو ارابينوز وأخر سداسي هو غالاكتوز وهو يماثل سابقه بالإضافة إلى اتحاد الميثيل بدلا من ذرة هيدروجين على مجموعة الكربوكسيل ليكون مثيل استر.

- البكتين يتكون من 25 وحدة حمض بكتيك و البكتينات هي الصورة المعقدة المرتبطة بالكالسيوم أو السكريات أو بروابط هيدروجينية لتكون مركباً ذا وزن جزئي مرتفع ويؤدى إلى صلابة الثمار وتختلف نسبة المواد البكتينية تبعاً لنوع الثمار فهي تمثل 35% من وزن قشرة الليمون، 17% من وزن قشرة التفاح، 3% من قشرة البندورة كما موضح في الجدول(1)، ويوجد تناسب بين الميثلة في البكتين وصلابة الثمار فكلما نقصت الاسترة نقصت الصلابة .ويلعب الكالسيوم الدور الأساسي فى تحديد مدى صلابة الثمار حيث أن اتحاده مع البكتين و الأحماض البكتينية يسبب الصلابة وعند تحرره بواسطة إنزيم البكتيناز تفقد الثمرة صلابتها. (Kashyap *et al*, 2001).

الجدول(1)محتوى البكتين في الفواكه والخضروات المختلفة

فاكهة / خضار	مادة بكتينية (%)
التفاح الطازج	0.5-1.7
الموز الطازج	0.7-1.2
الخوخ الطازج	0.1-0.9
الفريز الطازج	0.6-0.7
الكرز الطازج	0.3-0.5
البازلاء الطازجة	0.9-1.4
الجزر المادة الجافة	6.9-18.6
لب البرتقال المادة الجافة	12.4-28
البطاطا المادة الجافة	1.8-3.3
البندورة المادة الجافة	2.4-4.6
قصب السكر المادة الجافة	10-30

المصدر: (Kashyap *et al*, 2001; Cho and Lee, 2001)

2-3- الإنزيمات المحللة للبكتين (Pectinolytic Enzymes):

تشمل أنزيمات البكتيناز مجموعة من الأنزيمات التي تحلل المواد البكتينية ويؤدي إلى ليونة الثمار وهي ذات أهمية كبيرة في الصناعة

تقسم إلى ثلاث مجموعات كالتالي:(Sakai, 1992; Palomaki and Saarilahti, 1997)

- Protopectinase(PPases): تحطم البروتوبكتين غير القابل للذوبان وتحوله إلى بوليمر بكتين قابل للذوبان.

$$\text{Protopectin (Insoluble)} + H_2O \longrightarrow \text{PP Pectin (soluble)}$$

وهذه الإنزيمات تقسم إلى قسمين:

A-PPases : يعمل على المواقع الداخلية أي على البولي غالاكتورونيك داخل البروتوبكتين.

B-PPases : يعمل على مواقع أخرى من البروتوبكتين أي على البولي سكرايد التي تربط البولي غالاكتورونيك مع مكونات جدار الخلية.

- Esterases(PE): تخفض درجة أسترة البكتين وذلك من خلال كسر رابطة الميثيل استر فى حمض البكتينيك و البروتوبكتين.
- Depolymerases: تعمل على التحلل المائي للروابط الغلوكوزيدية (α1-4) التي تربط وحداتD–غلوكورونيك أسيد مع بعضها مما يعمل على تقصير سلسلة جزيء البكتين. ومنها:

- إنزيم Lyase(PL) الذي يعمل على البكتاتPGL(polygalacturonatelyase) والبكتيناز PMGL(polymethylgalacturonatelyase)، ويعطي مركبات حلقية تحوي روابط مرجعة (Albersheim *et al*, 1960; Codner, 2001)

Polygalacturonate $\xrightarrow{PGL}$ 5 unsaturated D4 galacturonates

Polymethylgalacturonate $\xrightarrow{PMGL}$ unsaturated methyloligogalacturonates

- وأخيراً إنزيم Polygalacturonase(PG) الذي يحفز حلمهة سلسلة حمض غالاكتورونيك المتعدد وتنتج كميات من السكر المرجع وهي إنزيمات هامة في الصناعات الغذائية.

2-3-1-إنزيم Polygalacturonase(PG):

وهو من الإنزيمات المحللة للبكتين يأخذ الرقم(EC: 3.2.1.15) ينتج من النباتات خلال فترة نضج الثمار، كما تنتجه بعض البكتريا والفطور، يعمل هذه الإنزيم على حلمهة سلسلة حمض غالاكتورونيك المتعدد ينتج كميات من السكر المرجع من خلال تحطيم الروابط الغلوكوزيدية في السلسلة. وهي إنزيمات هامة في العديد من الصناعات وخاصةً الغذائية منها.(Jones *et al*, 1972; Lang and Dornenburg, 2000)

2-3-1-1-مصادر إنزيم Polygalacturonases:

تعد النباتات والأحياء الدقيقة المصدرين الرئيسيين لإنزيمات البكتيناز ولكن وجهة النظر الاقتصادية والتقنية تشير إلى ان المصادر الميكروبية للبكتيناز أصبحت وبسرعة كبيرة الأهم من بين المصادر الأخرى (Narie *et al*, 2002; Nazneen *et al*, 2011) وتعد الأحياء

الدقيقة التي تمتلك فعالية لتحليل البكتين واسعة الانتشار، فهي موجودة في التربة والفواكه والخضار التالفة والأوراق المصابة والخشب (Jayani *et al*, 2005).

عزل مؤخراً عدد كبير من الأحياء الدقيقة من مواد مختلفة تتميز بقدرتها على تحطيم السكريات المتعددة الموجودة في الفواكه والخضار المنتجة لإنزيم polygalacturonase (Dalvi and Anthappan, 2006).

هناك أنواع كثيرة من السلالات البكتيرية والخمائر والأعفان المنتجة لإنزيم، وتركيب الإنزيمات المحللة للبكتين متنوع مابين الأحياء الدقيقة(Narie *et al*, 2002; Nazneen *et al*, 2011)، ومن الأنواع البكتيرية المنتجة للإنزيم هي *Bacillus* spp –*Clostridium* spp، أما الفطريات فتعتبر مصدر هام لهذه الإنزيمات ولاسيما الفطريات المسببة لعفن الثمار التابعة للانواع التالية: *Aspergillus* spp–*Mucor spp*– *Rhizopus* spp- *Sclerotinia* – *Trichoderma* – *Fusarium* spp–*Penicillium* spp (Vibha, 2010).

أكدت العديد من الدراسات على استخدام الإنزيمات الفطرية في العمليات التصنيعية ذلك لأن فطور العفن فعالة جداً في إنتاج الإنزيمات المحللة للبكتين وخصوصاً فطر *Aspergillusniger* الأكثر استخداما لكونه فطراً مصنفاً عالمياً كفطر أمن (GRAS) من قبل الادارة الأمريكية للغذاء والدواء والمصرح باستخدامه في تصنيع الأغذية (Bruhlmaum *et al*, 1994; Adriana *et al*, 2002; Cao *et al*, 1992; Ladjama *et al*, 2007). وكذلك فطر *Trichoderma* الذي يعتبر من المصادر الهامة لإنزيمي Polygalacturonase و Cellulase (Saleh *et al*, 2006)

يعد البكتيناز الفطري إنزيماً حامضياً مما يجعله أكثر ملائمة للاستخدامات في الصناعات الغذائية لاسيما صناعة العصائر والمعاجين بأنواعها. (Muhammad *et al*, 2011).

2-4-فطريات عفن الثمار:

تسبب فطريات عفن الثمار خسائر كبيرة في ثمار الفاكهة والخضار بعد الجني ، حيث تحصل الإصابة في الحقل أو أثناء عمليات الجني أو التعبئة والتخزين والتسويق أو خلال الخزن أو أثناء العرض للبيع وحتى بعد وصولها إلى المنازل، وفي تقرير صادر عن منظمة الأمم المتحدة للأغذية والزراعة قدرت أن ثلث الطعام المنتج في جميع أنحاء العالم للاستهلاك البشري

يضيع بعد الحصاد (Gastavsson *et al*, 2011) . كما تزداد هذه الخسائر بشكل كبير في الدول النامية التي تفتقر و بشكل كبير إلى الاهتمام بعمليات التداول والتخزين حتى وصولها إلى المستهلك . تبدأ الإصابة غالبا في الجروح الحاصلة أثناء الجني و التداول حيث تصاب الثمار في مرحلة ما بعد الجني بعدد من الفطريات التي تسبب لها التعفن مثل *Penicillium expansum* و *Botrytis cinerea* و *Alternaria alternata* و *Rhizopus stolonifer* و *Mucor piriformis* و*Phytophthora cactorum* و *Monilinia fracticola* و *Colletotrichum dematum* و وإن كل من *P. expansum* و *B. cinerea* و *sp. Alternaria* تسبب خسائر هامة في إيطاليا. كما يسبب الفطر *P.expansum* تعفنات شديدة في ثمار التفاح و الأجاص وهو يصيب الثمار من خلال الجروح التي تحصل أثناء الجني و العمليات التي تجرى في أماكن التعبئة.(Atanda *et al*. 2011; Elad *et al*, 2015)

إن ثمار الفاكهة و الخضار من المنتجات الزراعية القابلة للتلف بدرجة عالية، ولاسيما خلال مرحلة ما بعد الجني، إذ تحصل بسبب الكائنات الدقيقة المسببة للتعفن خسائر كبيرة في هذه المرحمة تصل إلى أكثر من 25 % من الثمار المقطوفة (Hodges *et al*, 2011)

وفي دراسة أجريت على بعض الفاكهة والخضار للكشف عن الفطريات الملوثة لها وجد كل من *Fusarium moniliforme* و*Rhizopus* spp في ثمار البندورة المخزنة، بينما لوحظ الفطر *Aspergillus niger* و*Fusarium moniliforme* و*Cladosporium* على الباميا وبعض الفاكهة(Iwuagwu *et al*, 2014)

كما وجد ان الفطر *Alternaria* يصيب ثمار البندورة ويسبب *Alternaria porri* العفن الارجواني على البصل (Salau and Shehu, 2015)، بينما يسبب *Botrytis cinerea* يسبب العفن الرمادي على ثمار الفاكهة والخضار (Romanazzia *et al*, 2016).

ويعد الجنس الفطر *Trichoderma* من مسببات عفن الثمار حيث أنه يصيب ثمار البندورة والذرة والكرز والفريز (Feliziani *et al*, 2013).

2-4-1-جنس *Trichoderma*:

يوجد جنس *Trichoderma* في التربة، وعلى بقايا النباتات، والأخشاب المتحللة، وبعض أنواعه توجد في الطبقات السطحية للتربة، وبعضها تفضل محيط المجموع الجذري للنبات

حيث تملك القدرة على النمو وتشكيل مستعمرات على جذور النباتات حتى لو كان عمق الجذور 1متر تحت سطح التربة أو أكثر. لذا تستخدم الأنواع التي تملك هذه الخاصية في مجال المكافحة الحيوية، حيث بمجرد إضافتها إلى التربة أو البذور تتلامس مع الجذور وتشكل مستعمرات على الجذور أو اللحاء ويمكن أن تستمر فترة طويلة قد تصل إلى 18 شهر تقريباً وتشكل حماية لها من مهاجمة الأنواع المسببة للأمراض (Jaklitsch, 2009)

يتميز بإنتاج العديد من الإنزيمات التي تحلل السكريات العديدة مثل السلولاز، والهيمي سلولاز، والبكتيناز، والاستراز وغيرها ، يتبع هذا الجنس لصف الفطريات الناقصة حيث تتكاثر معظم أنواعه لاجنسياً بالأبواغ الكونيدية. ومع ذلك فإن بعض أنواعه تمر بطور تكاثر جنسي ينتمي للفطور الاسكية الزقية. جميع السلالات المدروسة تقريباً من هذا الجنس متعددة النوى وبعضها يحوي أعداد كبيرة جداً من النوى في الخلية الواحدة في حين أن بعضها وحيدة النوى هي الأنواع المستخدمة في مجال المكافحة الحيوية (Harman and Hayes, 1993).

تنمو معظم أنواعه عادةً بسرعة عند درجة حرارة تتراوح بين 25–30°C ولكن بعض الأنواع تنمو عند درجة 45°C وبعضها بطيئة النمو، تبدو المستعمرات شفافة عند تنميتها على وسط آغار دقيق الذرة و الدكستروز (CMD) أو تتكون الكونيديات في غضون أسبوع وتبدأ بإعطاء لون أخضر فاتح أو أصفر أو أبيض وذلك على وسط آغار البطاطا والدكستروز (PDA)، كما تنتج بعض الأنواع صبغة بلون أصفر على وسط PDA، وأنواع أخرى تنتج رائحة زكية تشبه رائحة جوز الهند. تتميز أنواع جنس *Trichoderma* بامتلاكها مشيجة مقسمة بحواجز عرضية، وبوجود الحوامل الكونيدية التي تكون غالباً خضراء اللون و نادراً شفافة، ومقسمة غالباً تكون رفيعة نسبياً تظهر عليها فروع بشكل سواري أو دواري منتظم غالباً ثنائية أو ثلاثية التفرع. تحمل الحوامل الكونيدية في نهاية تفرعاتها خلايا قارورية مولدة للأبواغ (فياليدات) قصيرة تشبه عمودية عددها غالباً 2–3 على الفرع الواحد وقد تصل حتى 5 في بعض الأنواع . تحمل الفياليدات في نهايتها أبواغ مكورة أو بيضوية ذات جدر ملساء خضراء اللون (Bissett,1992)

و أهم الأنواع التابعة لهذا الجنس *Trichoderma koningii, Trichoderma viride Trichoderma harzianum, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma ressei* و *Trichoderma pseudokoningii*.

2-5- العوامل المؤثرة في إنتاج إنزيم polygalactyronase :

2-5-1- درجة الحرارة:

تحدث التفاعلات الحيوية مدى حراري بيولوجي من خلاله، حيث تؤثر درجة الحرارة في مختلف العمليات الحيوية في الخلية ، لذلك فإن تكون منتجات الاستقلاب في الأحياء الدقيقة يعتمد بشكل كبير على درجة الحرارة، تنمو معظم الفطريات في درجة الحرارة المتوسطة بشكل كثيف وذلك لأن هذه الدرجة تعتبر مثالية لنمو الفطر حيث أنها لاتؤثر في نشاط الإنزيمات وكذلك لاتؤثر على البروتين الخلوي لذا سوف يعطي الفطر أفضل نمو بينما ينخفض نمو الفطر عند درجة الحرارة المنخفضة وذلك لأن الدرجة المنخفضة تؤثر على النشاط الإنزيمي للفطر حيث أنها تؤثر على إنزيمات التنفس فلا تتم عملية التنفس وبالتالي لاينتج عنها طاقة اللازمة لعمليات النمو والأيض المختلفة وبالتالي لايحدث نمو وإذا كانت درجة الحرارة منخفضة جداً قد تؤدي إلى وقف النمو، أما بالنسبة لدرجة الحرارة المرتفعة عند درجة 50c° فلا يستطيع الفطر النمو وذلك لأن الدرجة العالية من الحرارة تؤثر على البروتينات الداخلة في تركيب الخلايا الفطرية حيث أن غشاء الخلية الفطرية يتكون من طبقتين من البروتينات فعند ارتفاع درجة الحرارة يحصل تخثر للبروتين وبالتالي تتغير طبيعته وهذا سوف يؤثر على نفاذية الغشاء الخلوي وبالتالي على جميع العمليات الحيوية مما يؤدي إلى وقف نمو الفطر أو قتله. (Hande *et al*, 2012).

أثبت كثير من الباحثين أن درجة الحرارة المثلى لنمو الأحياء الدقيقة ليس من الضروري أن تكون ذاتها المثلى للتحولات الاستقلابية لتلك الأحياء، وتختلف درجة الحرارة المثلى والملائمة لثبات الإنزيم ونشاطه حسب مصدر هذا الإنزيم، فقد بينت بعض الدراسات أن درجة الحرارة المثالية لإنتاج إنزيم PG من فطر *T. harzianum* و *T. virnes* هي 30C° باستخدام قشور الشمام والبطيخ كركيزة لإنتاج الإنزيم (Saleh *et al*, 2013) ، كما كانت أفضل درجة حراة لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر *Aspergillus fumigatus* بالتخمير الصلب هي 33^0c (Wong and Zuhainis, 2017)، بينما كانت أفضل درجة حراة لإنتاج هذا الإنزيم من بكتيريا *Bacillus subtilis* C4 حرارة 28^0c (Kusuma and Reddy, 2014)، بينما أنتج إنزيم polygalacturonase من الفطر *Aspergillus .foetidus* بحرارة 55^0م (Yannam *et al*, 2014)

2-5-2- درجة الحموضة pH:

يلعب pH الوسط دوراً مهماً في نمو الكائنات الحية الدقيقة لما له من علاقة بتوفر العناصر المهمة للفطر بصورة ذائبة وبالتالي يستطيع الكائن الدقيق أن يمتصها ويستفيد منها كما أن الـــpH تؤثر على نفاذية الخلية وبالتالي تستطيع الايونات الضرورية للميكروب أن تمر خلال الغشاء وتستفيد منها الخلية، كما تؤثر تأثيراً مباشراً في نشاط الإنزيمات الخارجية وفي التمثيل الغذائي للكائن الحي الدقيق. ويمكن أن يختلف رقم الحموضة المثالي لإنتاج الإنزيم عن رقم الحموضة المثالي للنمو وبصفة عامة تناسب البيئة المائلة للحموضة نمو الفطريات ، بينما يناسب الوسط المائل للقلوية نمو معظم أنواع البكتريا (Siddiqui *et al*, 2012)

تختلف درجة الحموضة المثالية لإنتاج إنزيم polygalacturonase ذو المنشأ الفطري من جنس لآخر ومن نوع لآخر ضمن الجنس الواحد، حيث أظهرت الدراسات التي تمت على إنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطريات على أن أفضل درجة حموضة لإنتاجه من الفطر *trichoderma* هي 5.5 (Yannam *et al*, 2014)، ومن الفطر *Aspergillus niger* كانت عند pH 4.1 (Martos *et al*, 2009)، بينما كانت أفضل درجة حموضة لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر *Aspergillus fumigatus* هي pH 5 (Wong and Zuhainis, 2017)، في حين أن درجة الـــ pH المثالية لإنتاج إنزيم polygalacturonase من بكتيريا *Bacillus subtilis* C4 هي pH =10 (Kusuma and Reddy, 2014)،

2-5-3- فترة الحضانة:

تؤثر مدة التحضين على مستوى نمو الكائن الحي الدقيق وانتاجه للإنزيمات، و تختلف الفترة المثلى لأنتاج الإنزيمات باختلاف الكائن الحي الدقيق ونوع الوسط الزرعي، كذلك تختلف الفترة اللازمة للوصول إلى الفعالية العظمى لإنزيم polygalacturonase تبعا لمصدر إنتاجه، ففي دراسة أجريت على إنتاج إنزيم polygalacturonase بالطريقة الصلبة من فطر *Trichoderma harzianum* و *T. virnes* كانت مدة التحضين المثالية هي 5 أيامعند رطوبة 50-65% (Saleh *et al*, 2013) ، من فطر *Aspergillus niger* أعطى أعلى فعالية إنزيمية عند التحضين لمدة **4** أيام بينما بدأ نشاط الإنزيم بالإنخفاض تدريجياً بعد ذلك

(Martos *et al*, 2009) ،في حين أعطت بكتيريا *Bacillus subtilis* **C4** أعلى فعالية للإنزيم عند فترة تحضين لوسط إنتاج الإنزيم 24ساعة (Kusuma and Reddy, 2014).

2-5-4-سرعة التهوية:

تعتمد التخمرات الهوائية بشكل اساسي على عمليتي التهوية والتحريك حيث أن تأمين الأوكسجين اللازم لنمو الكائنات الحية الهوائية ضروري لإتمام عملية التخمر، أما التحريك فهو ضروري لأنه يزيد من فعالية التهوية من خلال وظيفتين أساسيتين زيادة نسبة الأوكسجين المنحل وبالتالي زيادة معدل النمو وإنتاج الإنزيمات وتبادل غاز ثنائي أكسيد الكربون والحرارة وبخار الماء والمكونات المتطايرة المتكونة خلال عملية الإستقلاب، ففي دراسة أجريت لإنتاج إنزيم PG من *Trichoderma* استخدموا فيها سرعات تهوية مختلفة تراوحت بين100-300 دورة/دقيقة كانت سرعة التهوية المثالية 150دورة/الدقيقة. (Arijit *et al*, 2013)

ولدى إنتاج إنزيم polygalactyronase من *Aspergillus niger* لوحظ أن الفعالية الإنزيمية المثالية كانت عند سرعة 100 دورة/دقيقة(Naderi *et al*, 2012). وفي دراسة تأثير سرعات تهوية مختلفة تراوحت بين (100-250) دورة / الدقيقة في فعالية هذا الإنزيم من *Streptomyces* sp GHBA10 أن سرعة التهوية المثالية 150 دورة /الدقيقة(Arijit *et al*, 2013).

بينما وجد Oncu وزملاؤه عام 2007 في دراسة أجريت على إنتاج إنزيم polygalactoronase من الفطر *Aspergillus sojae* أن افضل سرعة دوران لإنتاج الإنزيم كانت 500 دورة/ دقيقة حيث اعطت اكبر قدر من الكتلة الحيوية(Oncu *et al*, 2007)

2-5-5-تركيز مادة التفاعل:

وجد انه كلما زاد تركيز مادة التفاعل زاد النمو الفطري إلى أن يصل إلى التركيز الأمثل حيث يحدث عنده أفضل نمو فطري هذا ما يؤثر على نتائج العمليات الاستقلابية ، وبعد هذا التركيز نجد أنه كلما زاد التركيز يقل النمو الفطري والسبب في ذلك هو أن زيادة الركيزة تعمل على زيادة الضغط الإسموزي حيث يكون ضغط الوسط أعلى من ضغط الخلية لذلك سوف يكون معدل خروج الماء من الخلية أسرع من معدل دخوله إليها مما يؤدي إلى حدوث تجفيف

لبروتوبلازم الخلية نتيجة لخروج الماء فينكمش البروتوبلازم وهذا يؤدي إلى حدوث بلزمة للخلايا. ويمثل مصدر الكربون خلال التخمرات الميكروبية مصدراً هاماً للطاقة وعنصراً رئيسياً في بناء وتركيب متعدد السكاريد، ويؤثر استقلاب الكربون في عملية التكوين الحيوي، وفي إنتاج مستقلبات أولية وثانوية . تستخدم ركائز بكتينية مختلفة لإنتاج إنزيمات البكتيناز ففي البدايات اعتمدت ركائز بكتينية نقية مثل حمض البولي غالاكتيورونيك و مادة البكتين النقي كما استخدمها Rehman وزملاؤه بتركيز 1% في إنتاج إنزيم polygalacturonase من بكتيريا *Bacillus licheniformis* (Rehman *et al*, 2012)، وكذلك استخدم البكتين كركيزة بنسبة 2% في تنمية مستعمرات من فطر *Aspergillus niger* بهدف أنتاج هذا الإنزيم(Martos *et al*, 2009)، ولكن ارتفاع اسعار هذه المواد جعل من عملية إنتاج إنزيمات polygalacturonase عملية مكلفة جداً لذا اقتصر استخدامها على النطاق المخبري وبدأ التوجه نحو استخدام ركائز رخيصة الثمن فكان الحل الأمثل استخدام المخلفات البكتينية الناتجة عن الزراعة ومخلفات مصانع الأغذية. حيث يوجد العديد من الدراسات حول إنتاج إنزيم polygalacturonase باستخدام أنواعاً مختلفة من المخلفات فقد استخدم Sudheer وزملاؤه قشور المانجا كمصدر لبكتين في إنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر *Fusarium moniforme* بالتخمير الصلب بتركيز 6.5% وزن/ حجم (Sudheer *et al*, 2010)، كما استخدمت قشور البرتقال كركيزة لتنمية *Aspergillus sojae* بهدف انتاج إنزيم polygalacturonase(Hande *et al*, 2012).

2-6- طرائق إنتاج إنزيم Polygalacturonase:

ينتج إنزيم Polygalacturonase من الفطريات من خلال عملية التخمر التي تعرف على انها عملية الأكسدة الغير تامة بواسطة الكائنات الحية الدقيقة للكربوهيدرات، فتتكون مواد مختلفة لها أهمية اقتصادية(Zhong *et al*, 2017). يطلق عليها اسم المركبات النشطة بيولوجياً bioactive compounds حيث تملك نشاطاً بيولوجياً ولها أهمية اقتصادية وصناعية كبيرة، إذ تستخدم في العديد من الصناعات كصناعة المستحضرات الصيدلانية والمواد الغذائية (Rodriguez and Sanroman, 2005) لاسيما في مجال إنتاج الـ prebiotics وإنتاج الإنزيمات (Wang, 2009).

بدأت الأنظار تتجه إلى أهمية الدور الذي تلعبه الأحياء الدقيقة لإنتاج هذه المواد منذ الدراسات التي بدأها باستور عن التخمرات في القرن التاسع عشر . ثم حدث التطور الأساسي في هذا المجال خلال القرن العشرين عندما استخدمت البكتيريا لإنتاج الأسيتون والبيوتانول خلال الحرب العالمية الأولى، واستخدام الفطريات والاكتينوميسيتات لإنتاج المضادات الحيوية خلال الحرب العالمية الثانية، ثم ما تلى ذلك من تطور كبير في الميكروبيولوجيا الصناعية أو ما يسمى بالصناعات التخمرية. (Campbel , 2010)

2-6-1-طرائق التخمير Types of Fermentation

2-6-1-1-تخمر البيئات السائلة Submerged Fermentation :

استخدمت تخمرات الحالة السائلة في العديد من الصناعات ولاسيما انتاج الإنزيمات الميكروبية حيث تم إنتاج إنزيم polygalacturonase من إجناس فطرية مختلفة مثل *Aspergillus- Trichoderma- Penecillium- Mucor* وغيرها من خلال تنمية هذه الفطور على مخلفات زراعية وصناعية كمصادر كربونية بطريقة التخمير المغمور (Martins *et al*, Subramaniyam and Vimala, 2012; Saleh *et al*, 2007; Nihan *et al*, 2015; 2006).

يمكن تنمية الأحياء الدقيقة المستخدمة في التخمرات الصناعية في مزارع سطحية أو على دفعات أو مزارع غاطسة أو في مزارع مستمرة (Tortora *et al, 2010*).

2-6-1-2-تخمر المواد الصلبة Solid Substrate Fermentation

تعتمد هذه الطريقة في تنمية الميكروب على مواد عضوية صلبة معقدة التركيب (مثل حبوب النجيليات، بذور البقوليات، المخلفات النباتية والمخلفات الصناعية) في غياب الماء أو في وجود كميات ضئيلة منه. وتستخدم هذه التقنية في العديد من دول شرق آسيا لإنتاج بعض الأدوية العشبية المتخمرة ، كما تستخدم في زراعة الأنواع التجارية من فطريات عش الغراب. تعتبر التخمرات على المواد الصلبة هوائية تسمح بتبادل الغازات وفي مجملها ينتج عنها الكمبوست. استخدمت تخمرات الحالة الصلبة لتنمية البكتريا أو الفطريات لغرض إنتاج العديد من الإنزيمات كالإنزيمات Amylase, β-Galactosidase ,Celluase والإنزيمات المحللة للبكتين، حيث انتج إنزيم polygalacturonase من الفطر *Aspergillus sojae*

باستخدام نخالة القمح كركيزة (Hande and Canan_, 2014)، كما أنتج من الفطر *Aspergillus awamori* بهدف استخدامه في ترويق عصير التفاح(Tapati *et al*, 2014). بينما أنتج من *Trichoderma harzianum* من خلال تنمية الفطر على قشور البرتقال كركيزة (Saleh *et al*, 2009)

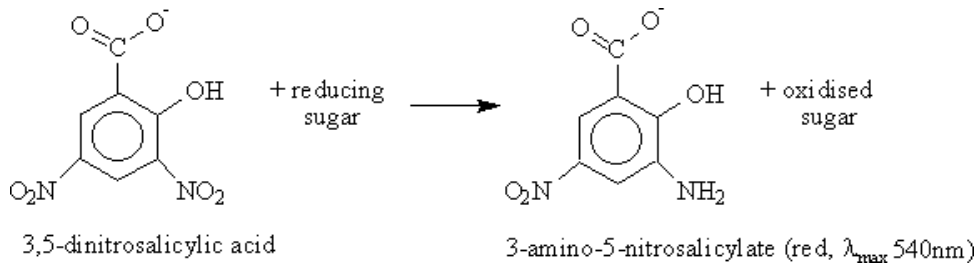
تتميز تقنية التخمرات الصلبة في إنتاج الإنزيمات بتقليل تكاليف التخلص من الفضلات نتيجة المحتوى المنخفض من الماء كما يكون المنتج مركزاً مما يسهل عملية التنقية اللاحقة ويساهم في تخفيض تكاليف الإنتاج بالاضافة لإمكانية تجفيف وسط التخمر بوجود الإنزيم بعد الانتهاء من عملية التخمر، بتعريضه لدرجة حرارة الغرفة بعد معاملته بالكحول الاثيلي**10** % أو بوساطة الفرن الحراري بدرجة 40^0c مع الاحتفاظ بفعاليته الإنزيمية لمدة سنة كما نلاحظ في التخمرات الصلبة عدم حصول تغاير في المزارع البكتيرية في مقارنة بتخمرات المزارع المغمورة، وهناك إمكانية استخدام نظام ثنائي من الإنزيمات للحصول على تحلل كامل وسريع للنشأ مقارنة بالمزارع المغمورة التي لا يمكن استخدام سوى نظام الإنزيم المفرد ، و قلة حصول التلوث مقارنة بالمزارع السائلة أو المغمورة. (Subramaniyam and Vimala, 2012)

2-7- تقدير فعالية إنزيم Polygalacturonase

يعتبر تقدير فعالية إنزيم Polygalacturonase عاملاً هاماً في دراسة هذه الإنزيمات حيث يشرح خصائصها وكفاءتها، وبما أن إنزيم Polygalacturonase يعمل على كسر الروابط بين وحدات حمض الغالاكتورونيك المتعدد في جزيء البكتين محولاً إياها إلى وحدات منفصلة من الحمض لذا يعتمد تحديد نشاط Polygalacturonase على تحديد تركيز الإنزيم اللازم لإنتاج كمية معينة من حمض غالاكتورونيك في دقيقة واحدة ويعبر عن وحدة الفعالية الإنزيمية بكمية الإنزيم اللازمة لتحرير 1ميكرومول من حمض الغلاكتورونيك في الدقيقة تحت ظروف التجربة(Miller, 1959).

حيث تعتمد طريقة (Miller ,1959) على استخدام كاشف الـ 3,5 DiNitroSalicylic DNS Acid (3-5 دي ـ نيترو حمض السالسليك) الذي يعمل على إيقاف التفاعل بين الإنزيم والركيزة. لونه أصفر ويتحول إلى اللون البرتقالي نتيجة إرجاعه إلى 3-amino-5-nitrosalicylatوأكسدة زمرة الكربونيل في حمض الغالاكتورونيك الناتج إلى كربوكسيل كما هو موضح في الشكل (1) ، ويتم حساب الأمتصاصية وتقدير فعالية الإنزيم باستخدام جهاز

السبيكتروفوتوميتر الذي يقرأ امتصاصية المحلول عند طول موجة 540nm بالمقارنة مع الشاهد الذي يعامل نفس المعاملة تماماً باستبدال الإنزيم بالمحلول الموقي. وبالإسقاط إلى المنحني القياسي نحصل على تركيز حمض غالاكتورونيك الموافق و منها تحسب فعالية الإنزيم.



الشكل (1) معادلة ارجاع الـــ DNS. (Ikram and Sikander, 2007)

2-8- العوامل المؤثرة على النشاط الإنزيمي وسرعة التفاعل

2-8-1- درجة الحرارة:

لكل إنزيم درجة حرارة يكون عندها أكثر نشاطا وتسمى هذه الدرجة بدرجة الحرارة المثلى (temperature Optimum) ،حيث تتراوح درجة الحرارة المثلى لمعظم الإنزيمات بين 20 الى 40 درجة مئوية ويقل نشاط الإنزيم تدريجياً كلما زادت درجة الحرارة عنها إلى أن تصل إلى درجة حرارة يقف عندها نشاط الإنزيم تماماً، وهذه الدرجة هي التي يتغير فيها التركيب الطبيعي له ويفقد نشاطه ، أما في حالة انخفاض درجة الحرارة عن الدرجة المثلى فان نشاطه ينخفض أيضاً إلى أن يصل درجة حرارة دنيا يكون عندها أقل نشاط للإنزيم، ولكن في حالة رفع الحرارة من جديد فيعود للإنزيم نشاطه. يتم حفظ الإنزيم لمدة طويلة مبرداً على درجة حرارة ($-20c^0$) وعندما يراد استخدامه مرة ثانية فإن نشاط الإنزيم يعود من جديد عند رفع درجة حرارته إلى درجة الحرارة المناسبة للتفاعل الإنزيمي (Gomes *et al*. 2011).

ففي دراسة أجريت على إنزيم polygalacturonase من *Rhizomucor pusillus* لوحظ انه قد بقي ثابتاً عند تحضينه لمدة 120 دقيقة على درجة حرارة 50^0c ثم انخفضت ثباتيته بعد 60^0c. (Siddiqui *et al*, 2012). بينما وجد Rajendran وزملاؤه أن هذا الإنزيم احتفظ بفعاليته حتى درجة حرارة 48^0c (Rajendran *et al*, 2011)، وفي دراسة أجريت لإنتاج إنزيم polygalacturonase من *Trichoderma harzianum* كانت الحرارة المثالية

لفعالية النزيم هي 40^0c كما بقي مستقرا عند تحضينه على درجة حرارة 30^0لمدة 60 دقيقة (Saleh *et al*, 2006)

2-8-2-درجة حموضة الوسطpH:

لكل إنزيم درجة حموضة pH مناسبة يكون نشاطه عندها أكبر ما يمكن ويقل نشاطه إذا تغيرت درجة PH ارتفاعاً أو انخفاضاً وذلك عندما يطرأ على الإنزيم أي تغير وذلك لتغيير شحنة الأحماض الامينية المكونة لسلسلة البروتين والتي تشارك في ربط المواد المتفاعلة بمركز نشاط الإنزيم. إن قيمة الأس الهيدروجيني المثلى لمعظم الإنزيمات يتراوح بين 5 الى 9 ولكن هناك بعض الإنزيمات تتطلب درجة حموضة أعلى مثل إنزيم الببسين وإنزيمات أخرى تتطلب وسط قاعدي مثل إنزيم الفوسفاتيز القاعدي . (Gomes *et al*, 2011).

ففي دراسة أجريت لأنتاج إنزيم polygalacturonase من *Trichoderma harzianum* المنماة على قشور البرتقال كان الـــ pH المثالي لعمل الإنزيم عند pH =3.5-7(Salehe *et al*, 2009)، بينما كانت درجة الحموضة المثالية لعمل الإنزيم هي 5 لدى انتاجه من الفطر *Penicillium janthinellum sw09* وكان أكثر استقراراً في نطاق درجة الحموضة pH 4-8 (Yuping *et al*, 2016)

2-8-3- تأثير تركيز الإنزيم على سرعة التفاعل:

توجد علاقة طردية بين سرعة التفاعل وزيادة تركيز الإنزيم بوجود زيادة من المادة المتفاعلة فإن زيادة نسبة الإنزيم يزيد من سرعة التفاعل، وذلك بشكل مطلق طالما وجدت مادة التفاعل. ففي دراسة اجريت بهدف ترويق عصير اتفاح باستخدام إنزيم polygalacturonase كان أفضل تركيز للإنزيم هو 1.7% وحدة دولية(Thamer, 2013)، بينما أظهرت النتائج من دراسة أخرى أن التركيز الأمثل للإنزيم المستخدم في ترويق عصير الأنانس هو 1% (Arotupin *et al*, 2012). وعند ترويق عصير المانجا باستخدام polygalacturonase المنتج من الفطر *Aspergillus awamori* اختبر فيها فعالية استخدام عدة تراكيز من الإنزيم تتراوح ما بين 0.5-1.5 وحدة/مل كان التركيز الامثل هو 1.5 وحدة / مل (Anuradha *et al*, 2016).

2-8-4- تأثير تركيز مادة التفاعل في سرعة التفاعل:

تزداد سرعة التفاعل طرداً بزيادة تركيز المواد المتفاعلة حتى تصل إلى سرعة معينة لا تزيد بعدها مهما زاد تركيز المواد المتفاعلة وتسمى هذه السرعة بالسرعة القصوى. في دراسة تمت بهدف انتاج وتنقية وتوصيف إنزيم polygalacturonase بينت النتائج أن أفضل ركيزة لمادة التفاعل polygalacturonic acid هو 1% حيث أعطت أعلى فعالية لعمل الإنزيم (Niketan *et al*, 2012)، بينما كان أفضل تركيز لـــ polygalacturonic acid هو 0.1% عند دراسة فعالية الإنزيم المنتج من الفطر *Mucor circinelloides* (Thakur *et al*, 2010).

2-8-5-تأثير وجود المثبطات أو العوامل المنشطة:

يقصد بالعوامل المنشطة بالمواد الكيميائية اتي تضاف بكميات قليلة للتفاعل الكيميائي بهدف تسريعه دون أن تتغير خواصها الكيميائية كما هو الحال في بعض الشوارد المعدنية التي تحفز نشاط الإنزيم وتزيد من فعاليته من خلال زيادة قدرة الإنزيم على الاتحاد بمادة التفاعل ضمن الوسط ففي دراسة أجريت لأنتاج إنزيم polygalacturonase من *Bacillus subtilis C4* لوحظ تحفيز لعمل الإنزيم عند اضافة شوارد Ca^{+2} و Mg^{+2} بتركيز 10 Mm (Kusuma and Reddy, 2014)، كما وجد El-Batal وزملاؤه أن فعالية هذا الإنزيم قد ازدادت بإضافة 1mM من شوارد Mg^{+2} و Zn^{+2} لدى انتاجه من *Penicillium citrinum* (El-Batal *et al*, 2013). كما وجد Amin وزملاؤه في دراسة أجروها لأنتاج إنزيم polygalacturonase من بعض السلالات الفطرية أنه قد ازدادت فعالية الإنزيم بوجود بعض المواد ككربونات الكالسيوم والمنغنيز و (NH4) 2SO4، واللاكتوز كمصادر غذائية منشطة لعمل الإنزيم (Amin *et al*, 2017)

ومن جهة أخرى هناك مركبات يترتب على وجودها انخفاض في نشاط الإنزيم وفي بعض الأحيان توقف نشاط الإنزيم كلية. ومنها لها تأثير مؤقت على النشاط الإنزيمي حيث يستعيد الإنزيم نشاطه بعد زوال المثبط، وهناك مواد لها تأثير دائم على الإنزيم فلا يستعيد الإنزيم نشاطه بزوال تأثير المثبط.

ففي دراسة أجريت لأنتاج إنزيم polygalacturonase من *Trichoderma harzianum* كان لوجود بعض الشوارد المعدنية اثر تثبيطي على فعالية الإنزيم (– Ni^{+2} –Cu^{+2} -Zn^{+2}

(Ca^{+2}) بينما منعت شوارد Hg^{+2} الإنزيم من العمل تماماً (Saleh *et al*, 2009). كما كان لشوارد النحاس والباريوم اثر تثبيطي لفعالية هذا الإنزيم المنتج من الفطر *Aspergillus niger* حيث انخفضت الفعالية 50% عما كانت عليه بغياب هذه الشوارد، كما انخفضت بمقدار 12% عند اضافة مادة EDTA إلى الوسط.(Sopuruchukwu and Vinking, 2016).

2-9- تنقية الإنزيمات Enzymes Purification

توجد عدة طرائق لتنقية المنتجات الحيوية مثل الإنزيمات والبروتينات وغيرها. تعرف التنقية بانها مجموعة متسلسلة من الخطوات يتحقق من خلالها مجتمعة تنقية الإنزيم او البروتين او المنتجات الحيوية الاخرى بصورة سريعة وكفوءة واقتصادية. حيث يتم تنقية الإنزيمات للاغراض التالية:

1- تشخيص وتوصيف الإنزيم ويقصد به التحديد الدقيق لصفاته التركيبية والحركية والية التفاعل.

2- التخلص من الإنزيمات التي تتداخل مع فعالية الإنزيم المطلوب مثل البروتيزات الاخرى التي تتواجد بنفس المستخلص المحتوي على البروتيز القاعدي .

3- التخلص من الالوان والصبغات والروائح في المنتوج الحيوي مثلا الإنزيمات المايكروبية المستعملة في صناعة الجبن والاميلزات المستعملة في تحسين الخبز.

4- انتاج الإنزيمات النقية للاغراض التحليلية مثل التحليلات السريرية وتحليلات الاغذية.

1- المقارنة بين صفات الإنزيم المستخلص من كائنات حية مختلفة وخاصة في دراسات التطور الجزيئي. (Morton, 1950)

تعرف الفعالية النوعية للإنزيم على أنها قدرة الإنزيم على تحفيز تفاعل ما ، وتقدر بقسمة فعالية الإنزيمية على تركيز العينة من البروتين الكلي (وحدة فعالية / ميكروغرام بروتين) (Basha *et al*, 2009)

كما يعرف عدد مرات التنقية لمرحلة معينة من إحدى مراحل التنقية بقسمة الفعالية النوعية للإنزيم النقي على الفعالية النوعية للإنزيم الخام(Morton, 1950).

2-9-1- طرائق تركيز الإنزيمات:

تبرز أهمية تركيز المحلول الإنزيمي بالتخلص من اكبر قدر ممكن من الماء لزيادة تركيز الإنزيم وغالبا ما يتحقق من خلال خطوة التركيز زيادة درجة النقاوة بنسب متفاوتة نتيجة لاختلاف صفات البروتينات. ومن اهم طرائق تركيز الإنزيمات:

1- **الترسيب بفعل الاملاح** Salting out

تستخدم الأملاح في ترسيب البروتينات والإنزيمات مثل كلوريد المغنيسيوم و كبريتات الأمونيوم و كبريتات الصوديوم وكلوريد الصوديوم ، وتعد كبريتات الأمونيوم اكثرها شيوعاً حيث يحدث الترسيب بملح كبريتات الأمونيوم للبروتينات بسبب الخلل Disruption الذي تحدثه الايونات الملحية بطبقة جزيئات الماء المحيطة بالبروتين أي خفض درجة الانحلال عن طريق تكوين أملاح بين ايونات الملح والسلاسل الجانبية للأحماض الأمينية المتأينة للبروتين التي تكون اقل انحلالية من البروتين لوحده. (Celestino *et al*, 2006)

2- الترسيب بفعل المذيبات العضوية:

تعتمد هذه الطريقة على استعمال مذيبات عضوية قابلة للمزج بالماء ذات ثابت فصل كهربائي أقل من الماء بكثير مما يؤدي الى انخفاض كبير في قيمة هذا الثابت وارتفاع في قيمة القوة التي تجذب الجزيئات الى بعضها البعض وتكوين كتلاً تترسب من المحلول (Rajendran *et al*, 2011)

3- الترشيح الفائق **Ultrafiltration**:

تعد من الطرائق المستعملة على نطاق واسع على المستويات المخبرية والصناعية وخاصة في تنقية الإنزيمات الميكروبية . تعتمد هذه الطريقة على استخدام مرشحات جزيئية ذات مسامات محددة تسمح بمرور جزيئات باوزان جزيئية معينة وتمنع الجزيئات الاكبر من المرور، اذ تصنف المرشحات على اساس Molecular weight cut-off أي الوزن الجزيئي الذي يمكنه المرور بين 1000 الى 1000000 . (Jacob *et al*, 2008; Sameh *et al*, 2014).

4- **تركيز المنتجات الحيوية بوساطة المواد ذات القابلية العالية على امتصاص الماء:**

تتميز هذه الطريقة بأنها طريقة مفيدة جداً لتركيز الإنزيمات الحساسة للأملاح والمذيبات العضوية كما تتميز بكفائتها في تركيز المحاليل ذات الحجوم الصغيرة نسبياً التي لا تتجاوز اللتر. و من أهم المواد المستخدمة لهذا الغرض:

Polyethylene Glycol (MW 6000 – 20,000 : PEG 6000-20,000) و Sephadex G-100; G-150; G-200 (El-Batal *et al*, 2013)

2-9-2- طرائق الفصل المعتمدة على الشحنة

1- **كروموتوغرافيا التبادل الايوني Ion-Exchange Chromatography**

يعتمد الفصل بهذه الطريقة على الفروقات في كثافة الشحنة و الفروقات في توزيع الشحنة، وتقسم أنواع المبادلات الأيونية إلى:

1- المبادلات الأيونية الموجبة الشحنة مثل (CM-Cellulose) حيث يمتلك المبادل شحنة سالبة ويفصل البروتينات ذات الشحنة الموجبة.

2- المبادلات الأيونية السالبة الشحنة مثل (DEAE -Cellulose) حيث يمتلك المبادل شحنة موجبة ويفصل البروتينات ذات الشحنة السالبة. (Lima *et al*, 2010; Klug *et al*, 2006)

2- الترحيل الكهربائي **Electrophoresis**

يعتمد الفصل على كثافة الشحنة ونوعها أو على شكل الجزيئة أوتبعاً للوزن الجزيئي، المواد المستعملة في الفصل هي هلام الاغاروز لفصل الجزيئات الكبيرة مثل DNA ويستعمل هلام البولي اكريلامايد لتحديد مدى كفاءة التنقية من خلال فصل البروتينات وقطع DNA المهضومة بإنزيمات التقييد وذات الأوزان الجزيئية الصغيرة. ويتم الفصل في مجال كهربائي وتستعمل هذه الطريقة لفصل جزيئات الـــ DNA وفحصه كذلك تستعمل لدراسة خواص البروتينات مثل تحديد الوزن الجزيئي و معرفة درجة نقاوة البروتين ومعرفة اذا كان البروتين مكون من أكثر من سلسلة واحدة من متعدد الببتيد وذلك بالاعتماد على الترحيل الكهربائي بوجود مادة ماسخة للبروتين مثل SDS (Sodium Dodecyl Sulfate).(Laemmli, 1970)

كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel Filtration Chromatography

أساس هذه الطريقة هو استعمال مواد ذات مواصفات محددة بهيئة حبيبات كروية Beads ذات مسامات Pores متجانسة الأقطار تسمح بمرور أوزان جزيئية محددة خلالها ويتم الفصل أساسا بتأثير متداخل بين حجم الجزيئة أي وزنها الجزيئي وشكل الجزيئة. واهم أنواع مواد الترشيح الهلامي هي Sephadex ; Sephacryl; Sepharose . (Siddiqui *et al*, 2012; El-Batal *et al*, 2013)

كروموتوغرافيا الالفة Affinity Chromatography

تعتمد الطريقة على تخصص الإنزيمات والبروتينات الفعالة بيولوجياً كأساس الفصل (Wayne *et al*, 2010)

والجدول (2) يبين مراحل تنقية Polygalacturonase المنتج من بعض الأجناس الفطرية .

جدول(2) الطرائق المختلفة لتنقية إنزيم Polygalacturonase المنتج من أنواع فطرية مختلفة والأوزان الجزيئية المتباينة للإنزيم

Polygalacturonase المنتج من	مراحل عملية التنقية	الوزن الجزيي (كيلو دالتون)	المرجع
Aspergillus niger	ترسيب بالايتانول 60**%** Sephacryl S-200	106	Shashi *et al*, 2013
Rhizomucor pusillus	Sephacryl **و** sephadex G200 S100	32	Siddiqui *et al*, 2012
Penicillium citrinum	بسلفان الامونيوم **75%** ثم ديلزة ثم عمود sephadex G100	29	El-Batal *et al*, 2013
Penicillium janthinellum sw09	ammonium sulfate (20-100%) ثم ديلزة ثم Sepharose CL-6B gel filtration	66.2	Yuping *et al*, 2016
Trichoderma harzianum	تركيز بالتجفيد ديلزة DEAE-Sepharose Sephacryl S-200	29	Saleh *et al*, 2009
Trichoderma harzianum	DEAE-Sepharose and Sephacryl S-200	31	Saleh *et al*, 2006
Paecilomyces variotii	DEAE-Fractogel **و** Sephadex G-100	77	Lima *et al*, 2010
Mucor circinelloides	ترسيب بالايتانول 60**%** Sephacryl S-100	66	Akhilesh *et al*, 2010
Thermoascus aurantiacus	ديلزة تجفيد Sephadex G-75 SP Sepharose	29.3	Martins *et al*, 2013

2-10- استخدامات إنزيم Polygalacturonases :

- صناعات غذائية :

ترويق العصير:

تعد عملية ترويق عصائر الفاكهة من أقدم وأهم العمليات التي استخدمت فيها الإنزيمات المحللة البكتين، حيث أن عصير الفاكهة الطازج المتحصل عليه عن طريق عمليات الكبس يكون لزجاً وعكراً، وإن استخدام الإنزيمات المحللة للبكتين يؤدي إلى انخفاض سريع في اللزوجة والعكارة وبعد ذلك فإن الأجزاء المتبقية والمتسببة في العكارة تتجمع وتترسب ولذلك فإن ترشيح المنتج أو عمل طرد مركزي له يؤدي إلى الحصول على عصير رائق(Kashyap *et al*, 2001; Bennamoun *et al*, 2016; Kumar, 2015).

استخلاص الزيوت من قشور الحمضيات:

تستخدم إنزيمات البكتين في تمزيق الجل بغرض المساعدة في استحلاب الزيوت من الحمضيات حيث يعامل القشر بالإنزيمات المحللة للبكتين مما يجعل عملية استخلاص الزيوت سهلة ويزيد من محصول الزيت وخصوصاً من قشر الليمون والبرتقال. (Alkorta *et al*, 1998)

إنتاج أغذية الأطفال بطريقة النقع(Maceration):

وهي عملية هامة تستخدم في إنتاج أغذية الأطفال الرضع من الخضار والفاكهة حيث تكون أنسجة الفاكهة أو الخضار المعد منها الغذاء على شكل خلايا فردية مهشمة مما يسهل خروج العصارة أو السوائل الخلوية

زيادة مردود إنتاج عصير الفاكهة:

تستخلص عصائر الفاكهة بصفة عامة عن طريق عمليات الكبس ويتم تسهيل تلك العمليات بمعالجة اللباب إنزيمياً حيث يؤدي ذلك إلى تحليل جزئي للبكتين وبالتالي زيادة محصول العصير زيادة معنوية(Anuradha *et al*, 2016)، (Adesola *et al*, 2011) ، (Bennamoun *et al*, 2016). كما يستخدم في تخمير الشاي والقهوة.

صناعات أخرى:

- معالجة مياه مخلفات الصناعات الغذائية الحاوية على البكتين
- صناعة أعلاف الحيوانات
- صناعة الورق
- معالجة وحفظ الأخشاب وتأثير المعالجة بإنزيمات البكتين هو أن تجعل الخشب الغض الذي يكون عرضة للهجوم الميكروبي والتحلل أكثر قابلية للمعالجة بمثل هذه المواد الحافظة
- تعطين الأخشاب بهدف صناعة الألياف والأنسجة بالتعطين والتي تستخدم في صناعة الألياف والأنسجة من نباتات الكتان والقنب والجوت هي تطبيق عملي لإنزيمات البكتين حيث تستخدم الميكروبات التي تحلل البكتين الذي يوجد في الصفائح الوسطى لألياف هذه النباتات فيما يعرف بعملية التعطين التي تكون نتيجتها تفكك الألياف والحصول عليها أسهل من خلال تحلل البكتين.

(Dunleavyand Fogarty, 1971; Kuhad *et al*, 2011; Jayani *et al*, 2005).

القسم العملي

3- المواد والطرائق :

نفذ هذاالبحث في مخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومختبرات قسم علوم الأغذية بكلية الزراعة في جامعة دمشق عام 2013 إلى 2016.

يبين الجدول (3) أهم الأجهزة المستخدمة عند إجراء البحث ومنشأ كل جهاز من هذه الأجهزة:

الجدول (3) الأجهزة المستخدمة في البحث:

اسم الجهاز		الشركة المصنعة
مقياس الرقم الهيدروجيني	(pH-meter)	Hanna – Romania
ميزان حساس	Sensitive balance	Mettler Toledo – Taiwan
جهاز تثفيل مبرد	Cooling centrifuge	Heraeus – Germany
حاضنة	Incubator	Lab Tech – Koria
حاضنة هزازة	Rotary shaker	New Brunswick Scientific – U.S.A
حمام مائي	Water bath	Memmert- Germany
جامع الأجزاء	Fractions collector	صناعة محلية
جهاز المؤصدة (المعقم)	Autoclave	Shenan LDZX -50 FB- China
مازج أنابيب	Vortex	Stuart- China
فرن كهربائي	Oven	Grad- Russian
جهاز تقطير الماء		G F L – Germany
حوض رحلان كهربائي عمودي		Cleaver- UK
مجهر ضوئي	Microscope	Olympus – Philippines
مسخن مع محرك مغناطيسي	Heater Magnetic stirrer	Boeco – Germany
خزان رحلان كهربائي	Electrophoresis tank	Cleaver- UK
مضخة تفريغ	Vacuum pump	Rocker- India
مطياف ضوئي	Spectrophotometer UV/visible	Biochrom Libra S12
غرفة عزل مزودة بالأشعة فوق البنفسجية	Laminar hood	Bio Air - Italy

3-1-جمع العينات:

جمعت 80 عينة من خضار وفاكهة تالفة من محافظتي دمشق وريفها بهدف عزل أجناس مختلفة من الفطريات النامية عليها، وضعت العينات في أكياس معقمة محكمة الإغلاق. والجدول (4) يبين نوع العينات وعددها.

جدول(4) نوع وعدد العينات المدروسة

نوع العينة	عدد العينات
عنب	10
رمان	4
تفاح	6
أجاص	4
دراق	4
برتقال	5
ليمون	4
يوسفي	5
كرز	4
فريز	4
أفرع مشمش	5
بندورة	7
بطاطا	4
بصل	5
فليفلة خضراء	5
ذرة	4

3-2-عزل فطور العفن:

أخذت خزعات من كل عينات الخضار والفاكهة المتعفنة ولقحت على وسط آغار البطاطا والدكستروز(Potato Dextrose Agar (PDA الذي حضر بإضافة 39 غ من مسحوق الوسط الغذائي (Himedia) إلى ليتر من الماء المقطر وعقم الوسط بالصاد الموصد (الأوتوكلاف) على درجة حرارة 121^0c ولمدة20 دقيقة (McGinnis، 1980)، وحضنت لمدة 5 أيام على درجة حرارة 25^0c

وتمت عملية استزراع الفطريات على وسط آغار البطاطا والدكستروز. وحفظت عزلات نقية من الفطور الناتجة في أنابيب مائلة على نفس الوسط في البراد.

3-4-تحديد هوية فطريات العفن:

تم التعرف على الفطور على مستوى الجنس مجهرياً بالتحميل بالنشر في صبغة لاكتوفينول الأزرق(أزرق تريبان) وصنفت اعتماداً على شكل الحوامل البوغية وصفات الأبواغ (الحجم، الشكل، اللون، التوضع..) بالإضافة إلى مظهر المستعمرة الفطرية(اللون-القوام-الحواف....). (Samson *et a*l،2000).

3-5-غربلة العزلات الفطرية لإنتاج إنزيم Polygalacturonase:

تحضير معلق الأبواغ:

لقح وسط PDA بالتخطيط بخزعات الفطر ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 30^0c لمدة 5 أيام، وبعد التحضين تمت إضافة5ml من الماء المقطر المعقم الحاوي على Tween(1%) 80إلى كل طبق وحرك رحوياً ثم نقل السائل إلى أنابيب معقمة، ووحفظت الأنابيب في البراد على درجة حرارة 4^0c . (Venkateshand Girija, 2009).

3-5-1-الغربلة الأولية للعزلات الفطرية:

استخدم لذلك وسط Czapek- Dox Agar(30غ نترات الصوديوم و10غ فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين و 0.5 غ كبريتات المغنيزيوم المائية ، 0.01غ كبريتات الحديد المائية، 30غ سكروز و15غ آجار، في ليتر ماء مقطر) المعدل باستبدال السكروز كمصدر الكربون بالبكتين التجاري بنسبة 10غ/ل. وعقم الوسط وصب في أطباق بتري وعمل فيه حفرة مركزية في كل طبق باستخدام ثاقب الفلين بقطر 4 سم ولقحت الأطباق بـــ 0.2 مل من معلق الأبواغ في كل حفرة (تركيز المعلق10^6بوغ/مل)، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 30^0c مدة 5أيام.

قيس قطر الهالة الشفافة المتكونة الناتجة عن تحلل البكتين في الوسط وذلك بغمر سطح الطبق بمحلول اليود اليودي Logules ٬Iodine Solution، حيث يعمل محلول يود البوتاسيوم على ترسيب المواد البكتينية السليمة غير المتفككة بينما لاتترسب السكريات الأحادية الناتجة عن التفكك الإنزيمي لهذه المواد مما يسمح بظهور هالات شفافة حول المستعمرات الفطرية حيث تفككت المواد البكتينية بفعل الإنزيم الناتج ، وتم انتخاب العزلات الفطرية وفق أقطار الهالات

الشفافة المتشكلة، حيث أخذ متوسط قراءة 3 مكررات(أطباق) لكل عزلة. ;Reda et al, 2008 Simb, 2009).

تركيب محلول اليود اليودي:

Iodine	1غ
Potassium Iodide	5غ
H2O	330مل

3-5-2-الغريلة الثانوية التالية للعزلات الفطرية:

أجريت الغربلة الثانوية للعزلات بتنميتها على وسط التخمير(وسط اختبار الفعالية الإنزيمية) المركب ممايلي جدول(5)

جدول (5)تركيب وسط إنتاج إنزيم Polygalacturonase

المادة الكيميائية	الكمية المستخدمة منها
يوريا	0.3 غ/ل
كبريتات الأمونيوم	1.4 غ/ل
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين	2 غ/ل
كلوريد الكالسيوم	0.4غ/ل
كبريتات المغنزيوم	0.3 غ/ل
ببتون	0.75 غ/ل
مستخلص خميرة	0.25 غ/ل
كبريتات الحديدي المائية	5 مع/ل
كبريتات المنغنيز المائية	1.6مغ/ل
كبريتات الزنك المائية	1.4مغ/ل
كلوريد الكوبالت	20مغ/ل
بكتين تجاري	10غ/ل

وضبط الوسط على pH حسب التصميم الإحصائي للتجربة، ثم وزع على دوارق (سعة 250مل) بحجم 50مل في كل دورق، وعقمت الدوارق بالأوتوكلاف.

لقح كل دورق بـــ 1مل من المعلق البوغي(10^6×1بوغ/مل) لكل عزلة فطرية مأخوذ من مستعمرة عمرها 7أيام، ثم حضنت الدوارق في حاضنة هزازة على درجة حرارة 30^0c

وسرعة دوران 150د/د لمدة 5 أيام، بعدها أجريت عملية طرد مركزي لفصل المشيجة الفطرية والأبواغ للحصول على محلول الإنزيم الخام.(Suresh andViruthagir, 2010).

قدرت فعالية الإنزيم الناتج عن كل عزلة فطرية بطريقة DNSA (3,5-Di Nitro Salicylic acid) تبعاً لـــ (Miller، 1959). وبمعدل 3 مكررات لكل عينة.إذ يضاف 500 ميكروليتر من السائل الطافي من كل عزلة إلى 500ميكروليتر من محلول مادة التفاعل (0.5% حمض غلاكتورونيك متعدد Polygalacturonic acid في محلول أسيتات صوديوم موقي بتركيز 0.5، مولر وpH=5) ، ثم يحضن الخليط عند درجة حرارة 40^0c مدة 10 دقائق. وبعد انتهاء فترة التحضين إضيف 3ml من DNSA وحضن في حمام مائي حرارته 95^0c لمدة10 دقائق، ثم قيست الامتصاصية الضوئية على طول موجة 540nm بالمطياف الضوئي Spectrophotometer، حيث يعملDNSA على إيقاف التفاعل بين الإنزيم والركيزة. لونه أصفر ويتحول إلى اللون البرتقالي نتيجة إرجاعه إلى 3-amino-5-nitrosalicylatوأكسدة زمرة الكربونيل في حمض غالاكتورونيك الناتج عن التفاعل. وبالاعتماد على منحنى قياسي لحمض غلاكتورونيك حددت كميته في العينات، الناتجة عن تفكك الحمض المتعدد بفعل الإنزيم. ويعبر عن وحدة الفعالية الإنزيمية بكمية الإنزيم اللازمة لتحرير 1ميكرومول من حمض الغلاكتورونيك في الدقيقة تحت ظروف لتجربة.(Miller، 1959).

المنحني القياسي لحمض د -غالاكتيورونيك:

حضرت تراكيز متدرجة من حمض غالاكتورونيك 0–1.2 مغ/مل وقيست الامتصاصية عند طول الموجة 540 nm ورسم المنحني القياسي للحمض (Wong and Zuhainis, 2017).

3–6–اختيار الركيزة الأمثل لأنتاج إنزيم polygalacturonase :

استخدمت بعض المخلفات الزراعية لتحديد الركيزة الأفضل لنمو الفطر وانتاج إنزيم polygalacturonase، وذلك من خلال تقدير فعالية الإنزيم الناتج.

تحضير المخلفات الزراعية:

حضرت قشور الفواكه والمتمثلة بقشور البرتقال والموز وتفل التفاح حسب Vivek وزملاؤه 2010 حيث جمعت كمية كافية من كل منها وقطعت بأحجام متساوية وجففت في فرن حراري

هوائي بدرجة حرارة 50^0c لحين ثبوت الوزن، ثم طحنت بمطحنة كهربائية وحفظت في عبوات زجاجية بعيداً عن الرطوبة.

أضيفت كل من المخلفات المطحونة إلى وسط إنتاج البكتيناز والمتمثل بوسط Czapek – Dox agar المحور باستبدال مصدر الكاربون بالمخلفات(قشور برتقال– قشور الموز– تفل التفاح) ، عقم الوسط وصب في أطباق بتري معقمة وترك ليتصلب وعمل في وسطه ثقوب بأقطار متساوية وتحت ظروف معقمة . لقحت الأطباق ب 1 مل من المعلق البوغي (10^6×1بوغ/مل) لأفضل عزلة فطرية والتي حددت من خلال تجربتنا في غربلة العزلات المدروسة ، ثم أعيدت التجربة نفسها باستبدال قشور البرتقال بتفل التفاح مرة وبقشور الموز مرة أخرى .حضنت جميع الأطباق بدرجة حرارة 30^0c مدة 5أيام، وبعدها قيست الهالة الشفافة المتكونة حول الحفر بإضافة محلول اليود اليودي Logules ،Iodine Solution باستخدام المسطرة وثبتت النتائج.

3-7-أمثلة ظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase **بطريقتي التخمير المغمورة والصلبة:**

3-7-1-طريقة التخمير المغمور:

حضر وسط إنتاج إنزيم polygalacturonase المذكور سابقاً(وسط التخمير)، ووزع على دوارق مخروطية سعة 250 مل بمعدل 50 مل لكل دورق، ثم أضيف أفضل مخلف حصلنا علية من التجربة السابقة بتراكيز (1%، 3%، 5%) حسب معاملات التصميم الإحصائي المعتمد في الجدول (6).(Kusuma and Reddy, 2014)

3-7-2-طريقة التخمير الصلب:

رطبت الركيزة(10غ) بالوسط السابق حتى الوصول إلى قيم الرطوبة المدروسة (60%، 70%، 80%) ووضعت في دوارق مخروطية سعة 250 مل وذلك بعد ضبط الـــ pH حسب معاملات التصميم الإحصائي المعتمد في الجدول (7).(Sudheer et al, 2010)

عقمت الدوارق على درجة حرارة 120^0c لمدة 15دقيقة في الاوتوغلاف، ثم لقح كل دورق بـــ 1مل من المعلق البوغي (10^6×1بوغ/مل) لأفضل عزلة فطرية بعمر 7 أيام وحضنت حسب التصميم الإحصائي المعتمد في الجدول (7).

- استخلاص إنزيم polygalacturonase **من وسط التخمير وتقدير فعاليته:**

في طريقة التخمير المغمور:

ثفلت الدوراق من كل تجربة بعد انتهاء فترة التحضين وذلك سرعة 8500 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 4^0c، ثم إخذ السائل الراشح الحاوي على الإنزيم والذي يمثل محلول الإنزيم الخام الناتج عن التخمير بالطريقة المغمورة

في طريقة التخمير الصلب:

أضيف المحلول الموقي محلول أسيتات الصوديوم 0.5M و pH 5 بنسبة 10:1 (w/v) إلى دوارق التخمير بعد انتهاء عملية التخمير، وحضن لمدة 30 دقيقة مع استمرار التحريك، ثم ثفلت الدوارق بسرعة 8500 دورة/دقيقة لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 4^0c لفصل الكتلة الحيوية عن المستخلص الإنزيمي ثم أخذ الراشح الناتج والذي يمثل محلول الإنزيم الخام الناتج عن التخمير بالطريقة الصلبة.

قدرت فعالية الإنزيم الناتج عن كل تجربة من الطريقتين الصلبة والمغمورة وذلك بطريقة DNSA(3,5-Di Nitro Salicylic acid) والتي ذكرت سابقاً (Miller، 1959).

حيث يعبر عن وحدة الفعالية الإنزيمية بكمية الإنزيم اللازمة لتحرير 1ميكرومول من حمض الغلاكتورونيك في الدقيقة تحت ظروف التجربة والتي يعبر عنها بـــ U/ml، ومن خلال النتائج المستحصل عليها نتوصل إلى أفضل ظروف تخمير لأنتاج إنزيم polygalacturonase بأعلى فعالية وذلك بالاعتماد على تصميم التجارب المتقدم Response Surface Methodology في تحليل النتائج.

3-7-2- تصميم التجربة:

اعتمد تصميم التجارب المتقدم Response Surface Methodology باستخدام برنامج Minitap Optimization Method لدراسة تأثير كل عامل على حدى وتأثير العوامل المتفاعلة مع بعضها البعض.

درست الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم (درجة الحرارة، درجة الحموضة، مدة التحضين، سرعة التهوية، تركيز الركيزة، ونسبة الرطوبة الأولية للركيزة).

درس كل متغير عند ثلاث مستويات (+1، 0، -1) كما يلي:

درجة الحرارة ^{0}c(20، 30، 40)

درجة الحموضة pH (4، 6، 8)

مدة التحضين (3، 5، 7) أيام

سرعة التهوية (100، 150، 200) دورة /دقيقة

تركيز الركيزة (1%، 3%، 5%)

الرطوبة الأولية (60%، 70%، 80%) وتضمن التصميم 64 معاملة 32 لأمثلة أنتاج الإنزيم بالتخمير المغمور و 32 لأمثلة أنتاج الإنزيم بالتخمير الصلب موضحة بالجدولين(6–7)

جدول(6) تصميم التجربة لأمثلة ظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase بالخمير المفمور

Blocks	درجة الحرارة **Temperature C°**	درجة الحموضة **pH**	سرعة التهوية **Aeration speed rpm/m**	تركيز الركيزة **Substrate % concentration**	مدة التحضين **Incubation time Day**
1	20	4	100	1	7
1	40	4	100	1	3
1	20	8	100	1	3
1	40	8	100	1	7
1	20	4	200	1	3
1	40	4	200	1	7
1	20	8	200	1	7
1	40	8	200	1	3
1	20	4	100	5	3
1	40	4	100	5	7
1	20	8	100	5	7
1	40	8	100	5	3
1	20	4	200	5	7
1	40	4	200	5	3
1	20	8	200	5	3
1	40	8	200	5	7
1	20	6	150	3	5
1	40	6	150	3	5
1	30	4	150	3	5
1	30	8	150	3	5
1	30	6	100	3	5
1	30	6	200	3	5
1	30	6	150	1	5
1	30	6	150	5	5
1	30	6	150	3	3
1	30	6	150	3	7
1	30	6	150	3	5
1	30	6	150	3	5
1	30	6	150	3	5
1	30	6	150	3	5
1	30	6	150	3	5
1	30	6	150	3	5

جدول(7) تصميم التجربة لأمثلة ظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase بالخمير الصلب

Blocks	درجة الحرارة Temperature C°	درجة الحموضة pH	سرعة التهوية Aeration speed rpm/m	مدة التحضين Incubation time (Day)	الرطوبة % Moisture %
1	20	4	100	3	80
1	40	4	100	3	60
1	20	8	100	3	60
1	40	8	100	3	80
1	20	4	200	3	60
1	40	4	200	3	80
1	20	8	200	3	80
1	40	8	200	3	60
1	20	4	100	7	60
1	40	4	100	7	80
1	20	8	100	7	80
1	40	8	100	7	60
1	20	4	200	7	80
1	40	4	200	7	60
1	20	8	200	7	60
1	40	8	200	7	80
1	20	6	150	5	70
1	40	6	150	5	70
1	30	4	150	5	70
1	30	8	150	5	70
1	30	6	100	5	70
1	30	6	200	5	70
1	30	6	150	3	70
1	30	6	150	7	70
1	30	6	150	5	60
1	30	6	150	5	80
1	30	6	150	5	70
1	30	6	150	5	70
1	30	6	150	5	70
1	30	6	150	5	70
1	30	6	150	5	70
1	30	6	150	5	70

تحليل التجربة.

يعبر عن العلاقة بين فعالية إنزيم Response polygalacturonase (Y) والمتغيرات الخمسة المدروسة في كل من الطريقة السائلة والطريقة الصلبة Independent (X) variables بمعادلة من الدرجة الثانية كما يلي:

$$Y=a+bX_1+CX_2+dX_3+eX_{4+}fX_5+g6X_1^2+hX_2^2+iX_3^2+jX_4^2+kX_5^2+lX_1 X_2+mX_1 X_3+nX_1 X_{4+} oX_1X_5 +pX_2X_3 +QX_2X_4 +rX_2X_5 +sX_3X_4 +tX_3X_5 +uX_4 X_5$$

حيث يمثل كل من :

Y : العامل المدروس Response

a :العامل الثابت constant

b,c,d,e,f :العامل المتغير Linear coefficient.

g,h,I,j,k: العامل المتغير مربع square coefficient.

l,m,n,o,p,q,r,s,t,u : العوامل المترابطة مع بعضها interaction coefficient

3-8-دراسة الصفات الفيزيوكيميائية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من الفطر بالطريقة المغمورة :

درست الظروف المثلى لعمل إنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4* تحت تأثير عدة عوامل كدرجة الحرارة ودرجة الحموضة pH ووجود بعض الشوارد المعدنية. حيث قدرت فعالية الإنزيم في كل تجربة وفقاً لـــ (Miller، 1959).

1- درجة الحرارة المثلى:

درست الفعالية الإنزيمية للإنزيم المدروس عند عدة درجات حرارة مختلفة (من 20^0c الى80^0c)، لمدة 30 دقيقة حيث حلت الركيزة في المحلول الموقي أسيتات الصوديوم على درجة حموضة (6=PH).حيث جرى قياس فعالية الإنزيم.

2- الثباتية الحرارية:

درست ثباتية إنزيم polygalacturonase الخام النقي بحضنه في درجات حرارة مختلفة (من 20^0 إلى80^0c) بعد تعديل درجة حموضته بمحلول أسيتات الصوديوم إلى pH=6لفترات

حضن مختلفة (30 دقيقة حتى 3 ساعات)، وجرى قياس فعالية الإنزيم عند كل درجة حرارة بعد انتهاء فترات التحضين المدروسة.

3- درجة الحموضة المثلى pH :

قدرت الفعالية الإنزيمية لإنزيم polygalacturonase الخام عند درجة حرارة 30^0c عند درجات حموضة مختلفة pH 3 – 9 ، حيث تم حل الركيزة النقية(polygalacturonic acid) في محاليل موقية مختلفة بتركيز (0.5M) باستخدام الموقي أسيتات الصوديوم للحصول على درجات حموضة pH 3-5، واستخدام الموقي أسيتات فوسفات الصوديوم للحصول على درجات حموضة pH6-7، والموقي Tris HCl للحصول على درجات حموضة pH بين **7-9**، وجرى قياس فعالية الإنزيم عند كل درجة حموضة.

4- الثباتية الحمضية:

قدرت ثباتية إنزيم polygalacturonase الخام بعد حضنه بدرجات حموضة مختلفة pH(3-9) لفترات حضن مختلفة(30 دقيقة حتى 3 ساعات) وبدرجة حرارة 4^0c ،حيث جرى قياس فعالية الإنزيم عند كل درجة حموضة وبعد انتهاء فترات التحضين المدروسة .

5- <u>تأثير بعض الشوارد المعدنية في فعالية إنزيم polygalacturonase الخام:</u>

درس تأثير بعض الشوارد المعدنية في فعالية الإنزيم، حيث حضر محلول الإنزيم الخام وضبطت درجة حموضته عند PH=6 ثم حضن مع حجم معين من كل من المحاليل الملحية المختبرة (K^+ - Mg^{+2} - Na^+ - Ca^{+2} - Zn^{+2}) بتركيز 1mM كل على حدى، وذلك على درجة حرارة 30^0c لمدة 30دقيقة (SIDDIQUI et al, 2012) ، بعد ذلك جرى قياس الفعالية المتبقية .

6- تأثير تركيز الركيزة polygalacturonic acid (PGA) :

درس تأثير تركيز الركيزة في فعالية إنزيم polygalacturonase الخام وذلك بتحضين الإنزيم مع تراكيز مختلفة من الركيزة PGA (0.2-0.4-0.6-0.8-1-1.2 ملغ/مل) محضرة في المحلول الموقي أسيتات الصوديوم PH6 ، على درجة حرارة 30^0c لمدة 10دقائق [4] وبعدها قيست الفعالية الإنزيمية بطريقة لتحديد تركيز PGA الأفضل.

7- تأثير تركيز الإنزيم polygalacturonase الخام المستخدم:

درس تأثير استخدام عدة تراكيز من الإنزيم الخام على فعالية عمله، حيث استخدم (0.7-0.6-0.5-0.4-0.3 مل) من الإنزيم الخام وحضن كل منها مع 1% من الركيزة PGAعلى درجة حرارة 30^0c لمدة 10دقائق (Saleh *et al*, 2013)، وبعدها تقاس الفعالية الإنزيمية بطريقة Miller (1959) لتحديد التركيز الأفضل للإنزيم.

التحليل الاحصائي لتحديد الظروف المثلى لعمل إنزيم polygalacturonase الخام:

تم تحليل التباين ANOVA كتجربة عاملية بتصميم قطاعات عشوائية كاملة وإجراء اختبار LSD على مستوى ثقة 1% حيث تم حساب المتوسطات والإنحرافات المعيارية بواقع ثلاثة مكررات لكل اختبار.

3-9-التنقية الجزئية لإنزيم polygalacturonase **المنتج من** *Tri 4* **بطريقة التخمير المغمور:**

3-9-1-الحصول على محلول الإنزيم الخام:

جرى تثفيل المزرعة 500مل الناتجة من إنتاج إنزيم polygalacturonase من *Tri4* باستخدام قشور البرتقال كركيزة وبطريقة التخمير المغمور ضمن الشروط المثلى المتحصل عليها من خلال البحث.

3-9-2-ترسيب البروتينات:

3-9-2-1-المعاملة بالحرارة:

إن المعاملة القصيرة لمحلول الإنزيم الخام بالحرارة heat treatment ترسب البروتينات غير المرغوب فيها والقابلة للتغيير بالحرارة مما يؤدي إلى المزيد من تركيز الإنزيم. لذلك وضع محلول الإنزيم الخام(50مل) في حمام مائي حرارته 50^oc لمدة 10 دقائق ثم جرى تثفيله بسرعة دوران 8500 دورة/دقيقة على درجة حرارة 4^0c تم التخلص من الراسب وأخذت الرشاحة والتي تحتوي الإنزيم (47مل).

3-9-2-2-الترسيب بالاسيتون:

هدفت هذه العملية إلى التخلص من بعض البروتينات غير المرغوب فيها ضمن الراشح الإنزيمي وذلك اعتمادا على اختلاف قابلية ذوبان البروتينات المختلفة في محاليل عضوية ذائبة بالماء كالكحول الايثيلي أو الاسيتون، ثم رسبت البروتينات الموجودة في 47 مل من

المستخلص الإنزيمي الخام المعرض للحرارة وذلك بإضافة الأسيتون المبرد بدرجة -20^0c وبالتدريج أثناء التحريك الشديد للمستخلص الإنزيمي باستخدام محرك مغناطيسي وبتركيز نهائي 55% ، بعد ذلك وضع المزيج بالدرجة -20^0c لمدة 3ساعات وبعدها ثفل بسرعة دوران 8500دورة/دقيقة على درجة حرارة 4^0c لمدة 20 دقيقة، وتم التخلص من الرشاحة وترك الراسب لمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة للتخلص من الأسيتون المتبقي، تم حل الراسب في 25 مل من المحلول الموقي اسيتات صوديوم (0.5M) حفظ المحلول عند درجة حرارة -20^0c لحين استخدامه.(Gautam *et al*, 2016)

3-9-3-تقنية الترشيح Gel –Filtration باستخدام عمود الـــ Sephacryl S-200:

استخدمت تقنية الترشيح الهلامي Gel –Filtration التي يتم الفصل فيها على أساس الحجم والوزن الجزيئي للإنزيمات، تم استخدام هلام السيفاكريل Sephacryl S200 لما يمتاز به من ميزات مهمة مقارنة مع الأنواع الأخرى التي يعتمد أساس عملها على الوزن الجزيئي فهو يحتوي في تركيبه على الأكريلامايد والدكستران((ناتج من ارتباط وحدات الغلوكوز بروابط اثيرية) مما يكسبه صلابة جيدة ومقاومة عالية للانضغاط، فضلاً عن تميزه بالفصل الجيد والسريع وسهولة تحضيره وبقائه ثابتاً مدة طويلة وتتراوح حدود فصله من 5-600 كيلو دالتون، تم تهيئة عمود التنقية باستخدام موقي أسيتات الصوديوم (0.5M) ، بعدها علق الهلام بـــ 300 مل من نفس المحلول الموقي وأزيلت منه الغازات (Degassing) بمضخة تفريغ الهواء عبأ الهلام في العمود ليعطي هلاماً بأبعاد (2.2 × 18 سم) وأجريت موازنة العمود باستخدام المحلول الموقي نفسه وبما يعادل 3 مرات بقدر حجم الهلام في العمود، ومن ثم حُمّل العمود Sephacryl S-200 بـــ 5مل من المحلول الحاوي على الإنزيم من الخطوة السابقة على عدة دفعات وأجريت عمليتا الغسل Washing والاسترداد Elution بمحلول موقي أسيتات الصوديوم وبسرعة جريان مقدارها 60مل/ساعة جمعت الأجزاء المفصولة من العمود بجامع الأجزاء Fraction collecter بمعدل 1 مل للجزء الواحد تمت متابعة الامتصاصية للأجزاء المفصولة عند طول موجة 280 نانومتر ورسم المنحني البياني للعلاقة بين الامتصاصية وأرقام الأنابيب، ثم جمعت محتويات الأنابيب التي تقع ضمن تشكيل القمة، وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وجرى تقدير البروتين.

تقدير البروتين:

طريقة لوري Lowry's method(Lowry *et al*, 1951):

تعتمد هذه الطريقة في تقدير كمية البروتين على تكوين لون الأزرق عند اضافة تركيبة فولن Folin-Ciocalteu يرجع الى تفاعل البروتين مع شوارد النحاس القاعدي في تركيبة فولن سيكالتو، وبما ان كمية هذه الاحماض الامينية تتغير طبيعتها من بروتين لآخر .فان كمية اللون الناتجة لكل ملغرام بروتين ستكون متغيره تبعاً لنوع البروتين تحت القياس او المراد تخمين كميته . تتصف طريقة لوري في تقدير البروتين بحساسيتها تجاه الكميات الضئيلة من تراكيز البروتينات بدءاً من 5 مايكروغرام من البروتين.

المواد اللازمة:

- المحلول القياسي BSA(bovine serum albumin)بتركيز 1mg/ml
- كاشف كبريتات النحاس القاعدي والذي يتألف من

a. 50 ml من محلول كربونات الصوديوم (2%) ممزوجة مع 50ml من محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1N

b. 10ml من محلول كبريتات النحاس (1.5%)copper sulphate ممزوجة مع 10mlمن محلول طرطرات الصوديوم البوتاسيوم sodium potassium tertarate (2.37%) ويحضر الكاشف بمزج2ml من ب مع 100 mlمن (a)

- محلول كاشف فولن (Folin- Ciocalteau) تخفف مع مقدار متساوي من الماء المقطر (ماء مقطر1ml + كاشف 1ml)

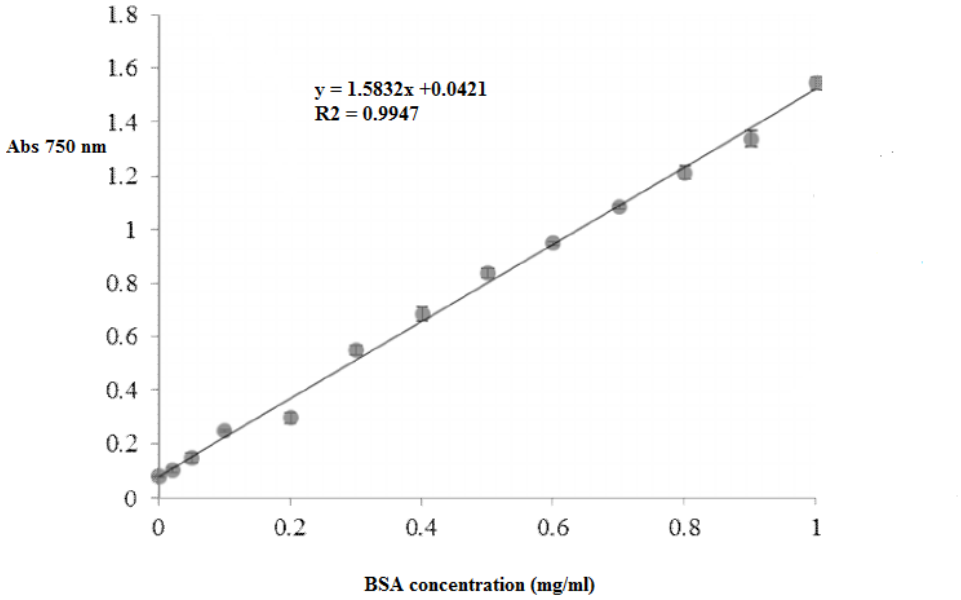
طريقة العمل:

1) حُضرت تراكيز مختلفة من محلول BSA تتراوح من 0-1mg/ml
2) نقل 0.2ml من كل تركيز لـــ BSA الى انبوبة اختبار ومن ثم تم إضافة 2ml من كاشف كبريتات النحاس القاعدي
3) حُضنت جميع انابيب الاختبار بدرجة حرارة الغرفة ولمدة 10 دقائق تمت إضافة 0.2ml من كاشف فولن الى انابيب الاختبار تدريجيا مع التحريك ليتجانس الخليط ويظهر اللون الأزرق الناتج عن تفاعل الكاشف مع معقد النحاس ونتروجين البروتين اعلاه ومن ثم حُضنت لمدة نصف ساعة.

4) قيست الامتصاصية الضوئية Absorbance باستخدام جهاز سبيكتروفوتومتر على طول موجي 750nm

5) يرسم منحنى قياسي تتمثل فيه التراكيز المختلفة مع الامتصاصية الضوئية

6) استخدم هذا المنحني في تقدير البروتين في الرشاحة الإنزيمية بعد كل مرحلة من مراحل التنقية المتبعة في البحث، ولكن بأخذ 0.2 مل من العينة الحاوية على البروتين بدلاً من 0.2 مل من تركيز محلول البروتين القياسي ثم قياس الامتصاصية عند طول موجي 750nm وبالتعويض بمعادلة المنحني القياسي للبروتين يتم الحصول على تركيز البروتين في العينة مقدراً بالميكروغرام / مل.(Rajendran *et al*. 2011). شكل(2)



شكل(2) المنحني القياسي للبروتين (BSA) باستخدام ألبومين المصل البقري

3-9-4-الرحلان الكهربائي للبروتين على هلامة عديد الاكريلامايد SDS-PAGE gel

(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

تعتبر من أهم التقنيات المستخدمة للتأكد من كفاءة عملية التنقية ودرجة نقاوة البروتين، ولتحديد الوزن الجزيئي للبروتين يجب فصل البروتينات عن بعضها.البعض، تعتمد هذه التقنية على أن جزيئات البروتين مختلفة في الشكل والحجم، حيث يتم تغيير طبيعتها في البداية باستخدام مادة SDS التي تغطى البروتينات بالشحنة السالبة و تساعد على تمسخها نتيجة تفكيك الروابط

الثانوية والجسور غير الكبريتية في البنية الثلاثية للبروتين، حيث تعتبر عملية تمسيخ البروتينات بشكلٍ كاملٍ قبل ترحيلها للحصول على الوزن الجزيئي الصحيح لها. كما تستخدم صبغة الترحيل Loading buffer التي تحتوي على مكونين أساسيين وهما(BME) β-Mercaptoethanol والـــ SDS حيث يعمل(BME) كعامل مرجع يقوم بتفكيك الجسور الكبريتية، يساعد تسخين العينات في حمام مائي درجة حرارته 95^0c في زيادة ارتباط SDS مع البروتينات، حيث ينتج في النهاية جزيئات بروتينية مشحونة سلبياً ذات بنية خطية وعند تحميل خليط البروتينات في مادة الجل وتتعرض للحقل الكهربائي فتهاجر البروتينات باتجاه القطب الموجب الجزيئية تبعاً لأوزانها. يستخدم في هذه التقنية الأكريلاميد كمادة هلامية وصبغة أزرق الكوماسي كمادة ملونة وواسم عياري يتكون من بروتينات مختلفة معلومة الوزن الجزيئي، حيث يتم تحديد الوزن الجزيئي لبروتينات العينة والتي تظهر كحزم ملونة على الهلامة من خلال مقارنة المسافة التي تقطعها هذه البروتينات حسب حجمها وشحنتها الكهربائية مع تلك التي تقطعها بروتينات الواسم العياري.(Laemmli, 1970; Hedrick and Smith, 1968)

تحضير العينات المراد ترحيلها:

تمزج عينة البروتين مع 5X Sample buffer بنسبة 1:4 في أنبوب إبندورف Eppendorf ويوضع المزيج في حاضنة بدرجة حرارة 100^0c لمدة عشرة دقائق وذلك بهدف تشويه بنية البروتين وإعادته إلى بنيته الأولية من خلال تحطيم الروابط الهيدروجينية والتكافؤية .

حيث يتكون موقي العينة 5X Sample buffer ممايلي :

Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8)	0.6 ml
Glycerol 50 %	5 ml
SDS 10 %	2 ml
2-mercaptoethanol	0.5 ml
bromophenol blue 1 %	1 ml
distilled water	0.9 ml

حيث ترتبط مادة SDS (هي مادة عالية التأين ذات شحنة سالبة) مع بقايا الأحماض الأمينية في جزيئات البروتين وتغطيه بشحنة سالبة .وتقوم بعملية تشويه denature للبروتين في العينة وتجعله في صورة سلاسل مايسمى عديد الببتيدpoly peptide (وهو التركيب الاولي للبروتين primary structure). وبذلك يلغى الاختلاف في شكل البروتين، ويكون طول سلسلة الببتيد

و الذي يعكس كتلة الجزيء هو وجه المقارنه الوحيد لرحلان البروتينات في هلامة الفصل SDS PAGE. بالتالي نتمكن من معرفة الكتلة او الوزن الجزيئي لبروتين العينة بالمقارنة مع بروتينات معلومة الوزن الجزيئي Protein ladder على نفس الهلامة على نفس الجل .

تحضير الجلGel preparation :

تحضر الأطباق الزجاجية والبلاستيكية و تنظف وتجفف جيداً، ثم ترتب على سطح معقم حيث يوضع اللوح الزجاجي الأطول الذي يحتوي فاصل اولاً ثم يوضع فوقه اللوح الزجاجي الأقصر. يتم التأكد من ثبيتهما بمحاذاة بعضهما البعض عند القاعدة بحيث لا تسمح بمرور الماء من قاعدة اللوحين المتراكبين، ثم يثبت اللوحين داخل إطار الصب casting frame بإحكام باستخدام الملاقط الجانبية.

يتم تحضير الهلام بنوعيه :

هلام الفصل separating gel بتركيز 10% وهلامة الرص stacking gel بتركيز 4.5% كما هو مبين بالجدول (8) مع ملاحظة أن مادتي Tetramethylendiamin (TEMED) و Ammonium Per Sulsat APSلاتضافان إلا قبل صب الهلامة مباشرةً. (Laemmli, 1970)

جدول(8) مكونات هلامة الفصل وهلامة الرص

stacking gel هلام الرص 4.5%	**هلام الفصل10% separating gel**	**المادة**
5.65ml	4 ml	ddH2o
1.65ml	3.3ml	Acrylamide 30%
2.5ml	–	Tris (pH 8.8) ,1M
0.1ml	o.1ml	SDS 10%
0.1ml	0.1ml	Ammonium persulfate 10% (APS)
0.004ml	0.004ml	TEMED

- يتم صب محلول هلامة الفصل separating gel حتى الخط الظاهر على اللوح الزجاجي (يحدد بوضع المشط قبل الصب ثم يرسم خط أسفله بمسافة 1 سم.)

- تم التخلص من الفقاعات الهوائية بعد الانتهاء من الصب وذلك بإضافة كمية من الإيزوبروبانول أو الماء المقطر على سطح الهلام
- ترك الهلام ليتصلب لمدة 20–30 دقيقة.
- جفف الإيزوبروبانول باستخدام ورق الترشيح
- تضاف هلامة الرص stacking gell فوق هلامة الفصل ثم يوضع المشط داخل الفراغ بين الشريحتين و يترك ليتصلب لمدة 10 دقائق
- سحب المشط من الهلام بحرص حتى لا تنكسر الآبار المتشكلة.
- فصل الإطار من قالب ويوضع القالب الحاوي على الهلامة ضمن جهاز الترحيل ويصب محلول الرحلان 5X electrode (running) buffer بحيث يغمر سطح الهلامة، حيث يحضر محلول الرحلان كمايلي :

حل 30غ من Tris base و 144غ من Glycine و 10غ من SDS في الماء المقطر وكمل الحجم إلى ليتر، وحفظ على درجة حرارة 4^0c .

- يجري تحميل عينات البروتين المراد ترحيلها بحجم 25 ميكروليتر في الآبار المشكلة أعلى الهلامة، و يحمل 5 ميكروليتر من الواسم العياري في البئر الأول.
- تم تشغيل جهاز الرحلان ويضبط التيار في البداية على 80 فولط ثم رفع تدريجياً إلى 120 فولط وتستمر عملية الرحلان لمدة ساعتين تقريباً
- بعد الإنتهاء من عملية الرحلان ووصول صبغة أزرق البروموفينول المضافة إلى عينات البروتين إلى حوالي 0.5سم من أسفل الصفيحة الزجاجية تم نزع قالب الهلامة وإخراج الهلامة منه ووضعها في حوض التلوين
- أضيف لها محلول التثبيت المكون من:

50 مل من الميتانول و 10 مل من حمض الخل و 40 مل من الماء المقطر.

- غسل الهلام عدة مرات بالماء المقطر لإزلة آثار محلول التثبيت.
- أضيف محلول التصبيغ الذي يحضر بإذابة 1غ من Coomassie brilliant blue G-250 و 450 مل ميثانول و 100 مل حمض خل ثلجي و 450 مل ماء مقطر.
- ترك الهلام في محلول التصبيغ لمدة 60 دقيقة مع التحريك البطيء إلى أن تظهر الحزم bands بشكل واضح.

- أضيف محلول إزالة الصبغة Coomasie blue destaining إلى الهلامة وتترك لمدة2−3 ساعات مع التحريك البطيء مع تبديل المحلول كل فترة، حيث يتكون محلول إزالة الصبغة من 100 مل من الميثانول و 100 مل من حمض الخل الثلجي و 800 مل من الماء المقطر.
- قدر الوزن الجزيئي للبروتينات المفصولة بالمقارنة مع بروتينات قياسية معروفة الوزن الجزيئي تتراوح أوزانها بين 10−225 كيلو دالتون.
- لتحديد الوزن الجزيئي للبروتينات رسم المنحني القياسي، حيث جرت عملية الرحلان الكهربائي للبروتينات القياسية معروفة الوزن، وتم فصلها وقياس مسافة الرحلان.

يعتمد رسم المنحني القياسي على حركية البروتينات في الهلامة والتي تكون متناسبة عكسياً مع لوغاريتم وزنها الجزيئي ويمثل المنحني القياسي قيم لوغاريتم الوزن الجزيئي(المعروف) مقابل الحركية النسبية لتلك البروتينات (التي لم تحدد أماكنها)

تعرّف الحركية النسبية للبروتينات المرحّلة كما يلي: (Davis, 1964)

Relative mobility

$$R_m = D_{potein} / D_{dye}$$

D_{potein} مسافة رحلان البروتين، بينما تمثل D_{dye} مسافة رحلان الصبغة

3−10−ترويق عصير التفاح باستخدام إنزيمpolygalacturonaseالمنتج من الفطر*Tri* 4:

تحضير عصير التفاح :

غسلت ثمار التفاح (من صنف Golden Delicious) ثم قشرت وقطعت وهرست في عصارة كهربائية للحصول على عصير متجانس ذي pH (3.5−4) ، حيث تعتبر درجة الحموضة هذه مناسبة لعمل الإنزيم الحمضي المنتج من الفطر. ثم عرض العصير لدرجة حرارة 90^0c لإيقاف نشاط الإنزيمات الموجودة في العصير، ثم رشح السائل عبر القماش لإزالة التفل قبل الترويق.

المعاملة الإنزيمية للعصير:

أخذ 10ml من العصير ويعامل بإنزيم polygalacturonase بتركيز 0.5% على درجات حرارة 30^0c-40-50-60.

كما حضن العصير بوجود تراكيز مختلفة من الإنزيم 1-1.5-2-2.5 %وبوجود تراكيز منخفضة من الجيلاتين (Ajayi *et al*, 2014).

وبعد المعاملة الإنزيمية يعرض العصير لدرجة حرارة 90^0c لمدة 5دقائق لإيقاف نشاط الإنزيم، ثم تجرى عملية طرد مركزي بسرعة 2500 دورة/دقيقة لمدة 15دقيقة ، ثم يمرر العصير النتاج على ورق ترشيح (Watman 1)، وينتج عنها العصير المعامل.(Saleh *et al*. 2009)

ثم قيست النفاذية (T_{650}%) للعصير الناتج عن كل معاملة(تركيز الإنزيم المستخدم- درجة حرارة التحضين- مدة التحضين- تركيز الجيلاتين المستخدم) باستخدام جهاز المطياف الضوئي ، حيث تعبر النفاذية عن درجة درويق العصير الناتج.(Bennamoun *et al*. 2016).

كما أجريت تجربة الشاهد بنفس الخطوات السابقة ولكن بإضافة الماء المقطر بدلاً من الإنزيم.

4-النتائج والمناقشة

4-1-نتائج تصنيف الفطور:

أجريت عملية العزل من مصادر مختلفة أهمها ثمار الخضار والفاكهة المصابة بالأعفان التي تعتبر مصدراً طبيعياً غنياً بالمواد البكتينية، وتم الحصول على 80 عزلة فطرية صنفت تبعاً للأجناس التالية *Penicillium*و *Aspergillus* و*Mucor* و*Trichoderma* و *Alternaria*و *Monilinia* و*Botrytis* (الجدول رقم 9).

جدول(9) يبين الأجناس الفطرية الناتجة في العينات المدروسة

الجنس الفطري	عدد العزلات	مصدرها
Aspergillus	18	عنب – رمان- برتقال- تفاح- فليفلة خضراء- بصل- ذرة
Penicillium	16	برتقال- ليمون- يوسفي- تفاح – أجاص- عنب- بصل
Trichoderma	13	بندورة- عنب- فليفلة – ذرة
Mucor	9	تفاح- أجاص- دراق- كرز- فريز- بندورة
Botrytis	9	بندورة- عنب- فريز- كرز
Alternaria	8	فريز- بندورة – بطاطا- بصل
Monilinia	7	المشمش – أجاص- تفاح

الصفات العامة للأجناس الفطرية الناتجة عن الدراسة: اعتماداً على مفتاح التصنيف (Samson *et al*, 2000):

1-الجنس ***Aspergillus* (Fr.:Fr)**:

تتميز مشيجة هذا الفطر بغزارة نموها والخيوط الفطرية مقسمة ومتفرعة وخلاياها عديدة النوى ويختلف لونها باختلاف الأنواع. وعند التكاثر اللاجنسي تتمايز بعض خلايا الخيوط الفطرية متخذة شكل القدم لذا سميت بخلية القدم حيث تستطيل خلايا القدم لتكوين الحوامل البوغية المتطاولة وغير المقسمة، التي تنفتح نهاياتها على شكل فقاعة أو حويصلة يحيط بها طبقة واحدة أو طبقتين من السلاميات التي تغطي كامل سطوحها، ويحمل عليها سلاسل من

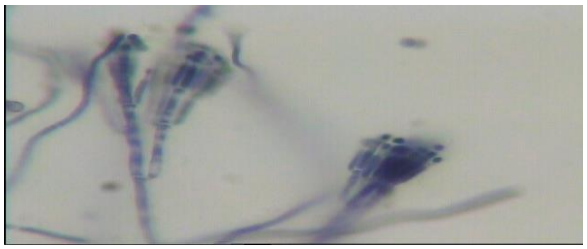
الأبواغ الكونيدية وتكون الأبواغ القاعدية هي الأحدث سنا ويسمى هذا النظام بالتتابع القمي. الأبواغ كروية الشكل وحيدة الخلية جدرها خشنة وتبدأ كخلايا وحيدة النواة م تصبح عديدة النوى نتيجة الانقسام النووي المتعاقب، وقد تبقى وحيدة النواة (شكل3).



شكل (3) الجنس الفطري *Aspergillus* تحت المجهر الضوئي على التكبير 40

2-الجنس ***Penicillium* (Link)**:

مشيجة الفطر متفرعة مقسمة متشابكة ملونة أو عديمة اللون، وتتشكل الأبواغ الكونيدية بسلاسل على حوامل بوغية هوائية مقسمة بجدر مستعرضة ومتفرعة إلى فريعات تشبه إلى حد كبير الفرشاة أو المكنسة، ومنها جاء الاسم اللاتيني Penicillus، وينشأ على فريعاتها سلاميات أو رؤيسات أو ذنيبات صفيرة تدعى الزوائد القارورية تتركز عليها الأبواغ في سلاسل. ويتم التمييز بين أنواع البنسليوم من خلال الحامل البوغي ونمط تفرعه وتماثله أو عدم تماثله، فهناك الحامل البوغي وحيد الصف Monoverticillate حيث تكون الفياليدات(الزوائد القارورية) منتظمة مباشرة عند طرف الحامل الكونيدي أما الحامل البوغي ثنائي الصف Biverticillate يتفرع إلى فريعات تحمل عليها الزوائد التي تحمل دورها الأبواغ في سلاسل. ويمتاز الحامل البوغي عديد الصفوف Polyverticillate بتفرعه إلى فريعات أولية وفريعات ثانوية ترتكز عليها الفياليدات التي تحمل الأبواغ(0شكل 4)

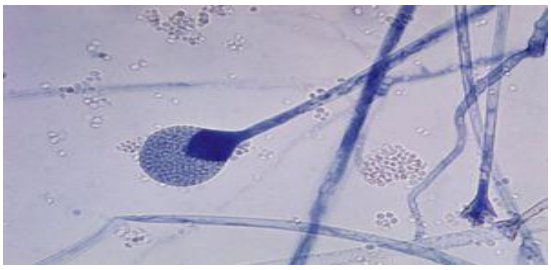


شكل(4) الجنس لفطري *Penicillium* تحت المجهر الضوئي على التكبير 40

3-الجنس ***Mucor* (Wehmer)** :

يتميز بمشيجة غير مقسمة عديدة النوى ولكنها تصبح مقسمة مع تقدمها بالسن، الحوامل البوغية قصيرة منتصبة ومستدقة باتجاه القمة، وقد تكون غير متفرعة، ويمكن أن تشكل

فروعاً قصيرة، العماد موجود ويشاهد بوضوح حتى قبل تمزق الرؤوس البوغية الصغيرة، الرؤوس البوغية كروية رمادية إلى سوداء اللون، ويبقى جزء من الرؤوس البوغية عند قاعدتها بعد تمزقها يدعى بالعنق. الأبواغ دائرية وقد تكون متطاولة قليلاً، رمادية أو سمراء اللون، ذات جدر ملساء أو مزينة قليلاً. يتم تمييز الأنواع التابعة لهذا الجنس من خلال صفات حوامل الرؤوس البوغية متفرعة أو غير متفرعة، وشكل الأبواغ (كروية أو متطاولة). (شكل 5)



شكل (5) الجنس الفطري *Mucor* تحت المجهر الضوئي على التكبير 40

4-الجنس ***Moniliella* (Stolk and Dakin)**:

المزرعة ملساء السطح لونها أبيض إلى كريمي أو بني رمادي، يلاحظ في مركزها قوام دهني بلون أصفر أو بني رمادي إلى بني داكن، تتميز المستعمرة برائحة الخميرة، الخلايا المولدة للأبواغ الكونيدية اسطوانية الشكل عليها ندب واضحة،الأبواغ بنية اللون شبه اسطوانية أو كروية مقطوعة في نهايتها وعليا ندب، تتوضع في سلاسل متفرعة أو غير متفرعة. (شكل6)

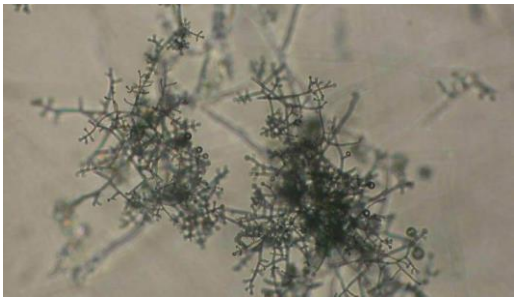


شكل(6) الجنس الفطري *Moniliella* تحت المجهر الضوئي على التكبير 40

5-الجنس ***Trichoderma* (Pers)**:

تبدو المستعمرة الفطرية بعد تنميته على بيئة غذائية داخل أطباق بتري حيث ذات مظهر سبخي بصورة خفيفة أو مندمجة، تعطي الجراثيم الكونيدية مسليوم أبيض كذلك تظهر المستعمرة في الأيام الأولى شفافة وفي اليوم الرابع من نموها يظهر اللون الأخضر على الأجزاء الهوائية للمسليوم، يتوافق هذا مع تشكل خطوط دائرية أخرى منتظمة مركزية، يظهر المسليوم تحت المجهر الضوئي مركبا من هيفات صفراء، مقسمة متفرعة ذات جدران ملساء،

الحوامل الكونيدية مخروطية أوهرمية كثيرة التفرعات، تحمل الفياليدات ذات هيئة فلاسكات والتي تحمل بدورها الجراثيم الكونيدية (شكل 7).



شكل (7) الجنس الفطري *Trichoderma* تحت المجهر الضوئي على التكبير 40

6-الجنس ***Alternaria* (Fr. Keisslerh)** :

زيتونية الى سوداء زيتونية او بنية زيتونية او رمادية وفني بعض الأنواع مقسمة إلى مناطق الحامل الكونيدي بسيط او متفرع , مستقيم او متموج مقسم , شاحب الى بني او بني زيتوني الكونيدات مفردة او تتجمع فني سلاسل قصيرة او طويلة بسيطة او متفرعة تحتو 2-7 كونيدية متباينة الأشكال من اليضاوية او الاهليليجية النى الصولجانية المقلوبة او الكمثرية المقلوبة , زيتونية الى داكنة اللون , ملساء تحتوي 2-8 حواجز عرضية و 1 الى عدة حواجز طولية تتخصر أحيانا عند الحواجز. (شكل 8)



شكل (8) الجنس الفطري *Alternaria* تحت المجهر الضوئي على التكبير 40

7-الجنس ***Botrytis* Mich. Ex Pers**:

تظهر المستعمرة في الأيام الأولى شفافة ثم تتحول الى اللون الرمادي الفاتح وبعدها الى البني الغامق، يشكل الفطر أجساماً صلبة تساعد الفطر على البقاء ضمن الظروف البيئية السيئة، يظهر الميسيليوم مقسما والحامل البوغي متفرع على شكل شجرة ذات قمم منتفخة تحمل فوقها أبواغاً ذات لون بني قاتح كروية بيضاوية إلى بيضاوية ناعمة الجدران. (شكل9)

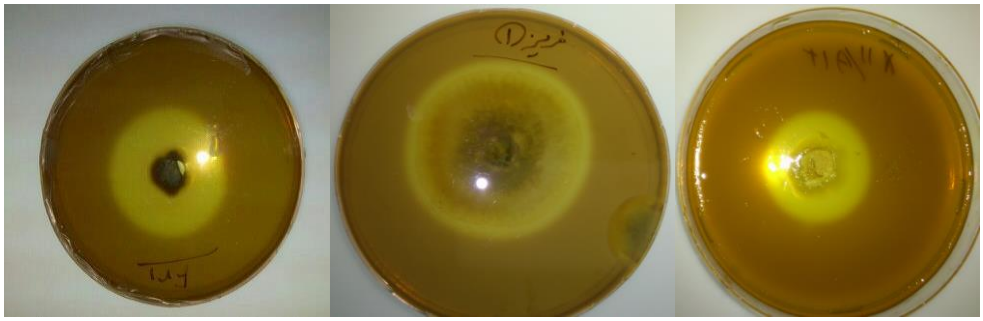


شكل (9) الجنس الفطري *Botrytis* تحت المجهر الضوئي على التكبير 40

4-2-اختبار قدرة العزلات الفطرية على إنتاج إنزيم Polygalacturonase:

4-2-1-نتائج الغربلة الأولية للعزلات:

أجريت الغربلة الأولية للعزلات الفطرية بعد تنميتها على وسط Czapek- Dox Agar المعدل باستبدال مصدر الكربون بالبكتين. أمكن تمييز العزلات التي أعطت أعلى قدرة على إنتاج البكتيناز من خلال تكوين هالة شفافة حول المستعمرة الفطرية ناتجة عن تحلل البكتين الموجود في الوسط وذلك باستخدام كاشف محلول Logules' Iodine Solution الذي يعمل على ترسيب المواد البكتينية السليمة غير المتفككة في حين لاتترسب السكريات الأحادية الناتجة عن التفكك الإنزيمي للبكتين، مما يسمح بظهور هالات شفافة حول المستعمرات الفطرية حيث تفككت المواد البكتينية بفعل الإنزيم الناتج، كما هو موضح بالشكل (10).



الشكل (10) الهالة الشفافة الناتجة عن تفكك البكتين في الوسط لأفضل العزلات الفطرية المدروسة

كما يوضح الجدول (10) أقطار الهالات المتشكلة في اختبار الغربلة الأولية لجميع العزلات الفطرية المدروسة ومصادر كل منها.

الجدول(10)العزلات الفطرية وأجناسها ومصادرها وأقطار الهالات الشفافة المتشكلة (متوسط 3مكررات)

رمز العزلة	الجنس	المصدر	متوسط قطر العزلة(سم) ± الخطأ المعياري
Asp1	*Aspergillus*	ثمرة عنب	2.33 ±0.12
Asp 2	*Aspergillus*	ثمرة رمان	1.13 ±0.07
Asp 3	*Aspergillus*	عرنوس ذرة	0.50 ±0.06
Asp 4	*Aspergillus*	حبوب ذرة	1.57 ±0.07
Asp 5	*Aspergillus*	ثمرة تفاح	0.83 ±0.03
Asp 6	*Aspergillus*	بصل	0.20 ±0.06
Asp 7	*Aspergillus*	ثمرة عنب	0.03 ±0.03
Asp 8	*Aspergillus*	فليفلة خضراء	2.50 ±0.06
Asp 9	*Aspergillus*	بصل	2.10 ±0.06
Asp 10	*Aspergillus*	ثمرة عنب	0.90 ±0.06
Asp 11	*Aspergillus*	ثمرة تفاح	0.20 ±0.06
Asp 12	*Aspergillus*	بصل	0.07 ±0.03
Asp 13	*Aspergillus*	ثمرة عنب	0.47 ±0.03
Asp 14	*Aspergillus*	ثمرة تفاح	0.77 ±0.09
Asp15	*Aspergillus*	رمان	0.20±0.06
Asp16	*Aspergillus*	رمان	1.90±0.03
Asp17	*Aspergillus*	أجاص	2.30±0.08
Asp18	*Aspergillus*	فليفلة	2.25±0.12
Pen 1	*Penicillium*	ثمرة برتقال	1.47 ±0.15
Pen 2	*Penicillium*	ثمرة ليمون	1.03 ±0.03
Pen 3	*Penicillium*	ثمرة برتقال	1.90 ±0.06
Pen 4	*Penicillium*	ثمرة يوسفي	0.13 ±0.03
Pen 5	*Penicillium*	ثمرة تفاح	0.03 ±0.03
Pen 6	*Penicillium*	ثمرة برتقال	0.13 ±0.03
Pen 7	*Penicillium*	ثمرة أجاص	2.20 ±0.12

Pen 8	*Penicillium*	ثمرة عنب	1.37 ±0.07
Pen 9	*Penicillium*	ثمرة ليمون	0.43 ±0.09
Pen 10	*Penicillium*	ثمرة ليمون	1.37 ±0.03
Pen 11	*Penicillium*	ثمرة برتقال	0.70 ±0.06
Pen 12	*Penicillium*	ثمرة عنب	1.43 ±0.03
Pen 13	*Penicillium*	ثمرة برتقال	0.47 ±0.09
Pen 14	*Penicillium*	بصل	0.23 ±0.03
Pen 15	*Penicillium*	ليمون	1.00 ±0.06
Pen 16	*Penicillium*	يوسفي	0.73 ±0.09
Tri 1	*Trichoderma*	حبوب ذرة	1.20 ±0.10
Tri 2	*Trichoderma*	ثمرة عنب	1.17 ±0.09
Tri 3	*Trichoderma*	ثمرة عنب	0.40 ±0.12
Tri 4	*Trichoderma*	ثمرة بندورة	2.47 ±0.03
Tri 5	*Trichoderma*	حبوب ذرة	1.60 ±0.06
Tri 6	*Trichoderma*	ثمرة فليفلة	1.07 ±0.07
Tri 7	*Trichoderma*	ثمرة عنب	0.53 ±0.09
Tri 8	*Trichoderma*	ثمرة بندورة	0.23 ±0.03
Tri 9	*Trichoderma*	فليفلة	2.00 ±0.12
Tri 10	*Trichoderma*	فليفلة	1.20 ±0.04
Tri 11	*Trichoderma*	دراق	1.00 ±0. 11
Tri 12	*Trichoderma*	فليفلة	0.60 ±0.06
Tri 13	*Trichoderma*	رمان	1.20 ±0.08
Muc 1	*Mucor*	ثمرة تفاح	0.57 ±0.07
Muc 2	*Mucor*	ثمرة أجاص	0.53 ±0.07
Muc 3	*Mucor*	ثمرة تفاح	1.17 ±0.15
Muc 4	*Mucor*	ثمرة كرز	0.13 ±0.03
Muc 5	*Mucor*	ثمرة دراق	0.63 ±0.07
Muc 6	*Mucor*	ثمرة بندورة	0.53 ±0.03
Muc 7	*Mucor*	ثمرة فريز	0.27 ± 0.03

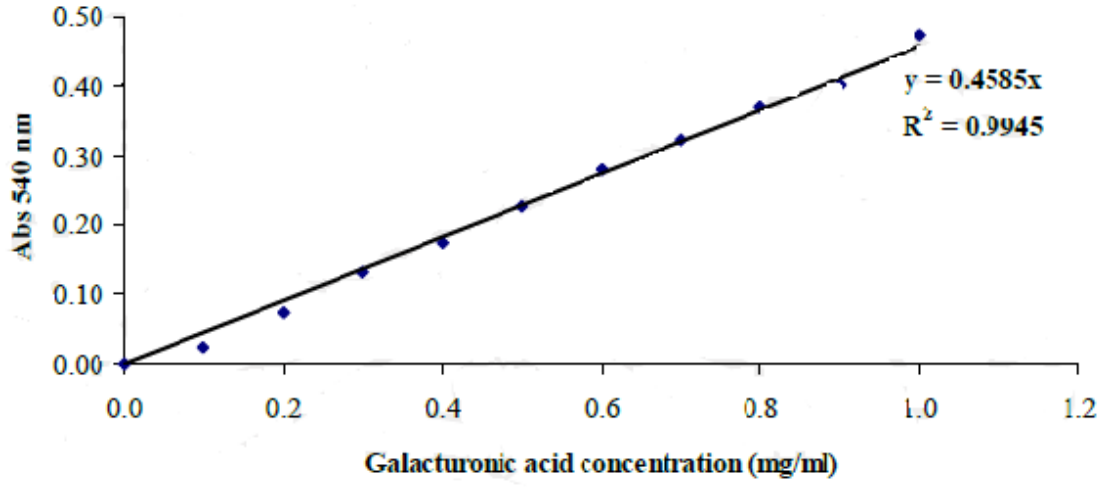
Muc 8	*Mucor*	دراق	1.07 ±0.13
Muc 9	*Mucor*	اجاص	0.07 ±0.15
Bot 1	*Botrytis*	ثمرة عنب	0.13 ±0.03
Bot 2	*Botrytis*	ثمرة فريز	0.57 ±0.03
Bot 3	*Botrytis*	ثمرة كرز	1.40 ±0.15
Bot 4	*Botrytis*	ثمرة كرز	2.87 ±0.03
Bot 5	*Botrytis*	ثمرة بندورة	0.43 ±0.03
Bot 6	*Botrytis*	ثمرة بندورة	0.37 ±0.07
Bot 7	*Botrytis*	يوسفي	1.54 ±0.03
Bot 8	*Botrytis*	يوسفي	0.97 ±0.13
Bot 9	*Botrytis*	كرز	1.07 ±0.09
Alt 1	*Alternaria*	ثمرة فريز	0.63 ±0.03
Alt 2	*Alternaria*	ثمرة بندورة	0.83 ±0.03
Alt 3	*Alternaria*	درنة بطاطا	0.53 ±0.03
Alt 4	*Alternaria*	بصل	1.90 ±0.06
Alt 5	*Alternaria*	ثمرة بندورة	0.47 ±0.03
Alt 6	*Alternaria*	ثمرة فريز	0.27 ±0.03
Alt 7	*Alternaria*	بطاطا	1.70 ±0.02
Alt 8	*Alternaria*	بطاطا	0.90 ±0.06
Mon 1	*Monilinia*	أفرع مشمش	1.50 ±0.06
Mon 2	*Monilinia*	أفرع مشمش	1.13 ±0.09
Mon 3	*Monilinia*	أفرع مشمش	0.13 ±0.03
Mon 4	*Monilinia*	أفرع مشمش	0.60 ±0.12
Mon 5	*Monilinia*	أفرع مشمش	0.13 ±0.03
Mon 6	*Monilinia*	أجاص	1.25 ±0.10
Mon 7	*Monilinia*	تفاح	1.00 ±0.07
Lsd(less significant difference)		0.191	

من الجدول(10) نلاحظ أن بعض العزلات كانت ضعيفة في مقدرتها على إنتاج إنزيم polygalacturonase، بينما أظهرت عزلات أخرى قدرة عالية على إنتاجه. وتعود أفضل هذه العزلات إلى الأجناس الفطرية *Penicillium* و*Botrytis* و *Aspergillus* و*Trichoderma*وهذا مايتوافق مع نتائج (Anisa *et al*. 2013)، ويعود سبب اختلاف القدرة على إنتاج الإنزيم بين العزلات التابعة لنفس الجنس إلى اختلاف مصدر هذه العزلات واختلاف أنواعها ، (AmandandAdebayotayo, 2012). وكان أكبر قطر للهالة المتشكلة 2.87سم في العزلة Bot4 من ثمار الكرز المتعفنة. نلاحظ أن نتائج الغربلة الأولية اختلفت عن الثانوية وهذا يعود إلى أن طريقة قياس قطر الهالة تهمل سمك الميسليوم النامي في الطبق فبعض الفطريات قد لاتتوسع في النمو بشكل أفقي بقدر توسعها فيه بشكل رأسي.

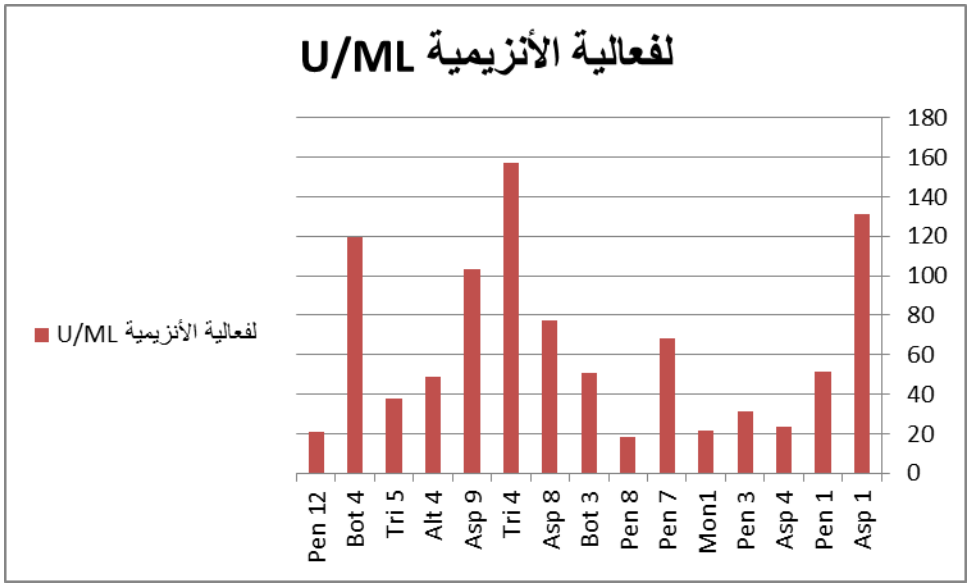
4-2-2-نتائج الغربلة الثانوية للعزلات الفطرية:

قدّرت فعالية إنزيم Polygalacturonase الناتج عن أفضل 15عزلة فطرية من العزلات السابقة المدروسة وذلك بطريقة 3-5 دي نيتروساليسيليك أسيد (DNS) وبالاعتماد على منحنى قياسي لحمض الغلاكتورونيك كما في الشكل(13)، و الذي حدّدت من خلاله العزلات ذات الفعالية الإنزيمية الأعلى.

والشكل (11) يبين فيهما فعالية الإنزيم المنتج من العزلات الفطرية المنتخبة.



الشكل(11) يبين المنحني القياسي لحمض د -غالاكتيورونيك



الشكل (12) الفعالية الإنزيمية للعزلات الفطرية المدروسة

والشكل (12) نلاحظ أن نتائج العزلة Tri4 تفوقت معنوياً على باقي نتائج العزلات المدروسة حيث أعطت فعالية إنزيمية (157u/ml) ، وتعود هذه العزلة إلى الجنس الفطري *Trichoderma* ، تليها نتائج العزلةAsp1 التي أعطت فعالية إنزيمية (131u/ml) والتي تعود للجنس *Aspergillus* ، وهذا ما يتوافق مع (Mahdy et al, 2013). وهذا ما يفسر المقدرة الكبيرة لهذه العزلات على إصابة الثمار وخاصةً البكتينية منها.

مما سبق نجد أن أعلى فعالية لإنزيم Polygalacturonase كانت من عزلة تتبع الجنس الفطري *Trichoderma*.sp المسبب لعفن الثمار

4-3- اختيار الركيزة الأمثل لأنتاج إنزيم polygalacturonase :

لدى استخدام ثلاث أنواع من المخلفات (قشور برتقال- قشور الموز- تفل التفاح) تبين أن أعلى فعالية إنزيمية للفطر *Tri 4* كانت عند استخدام قشور البرتقال كركيزة للنمو حيث أعطت أعلى قطر للهالة الشفافة المتشكلة وهذا موضح ضمن الجدول (11).

جدول (11) متوسط قطر الهالة الشفافة المتشكلة من تنمية الفطر ***Tri 4*** على ثلاث أنواع من المخلفات

نوع الركيزة	قطر الهالة الشفافة cm
قشور البرتقال	2.40 ±0.03
قشور الموز	0.87 ±0.07
تفل التفاح	1.07 ±0.12

وهذا مايتوافق مع Saleh وزملائه في أنتاج polygalacturonase من Tri4باستخدام قشور البرتقال كركيزة للنمو(Saleh *et al*, 2009).

4-4-نتائج أمثلة ظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase **بطريقتي التخمير المفمورة والصلبة:**

4-4-1-طريقة التخمير المغمور:

استخدم تصميم التجارب المتقدم Response Surface Methodology باستخدام برنامج Minitap Optimization Method لدراسة الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم (درجة الحرارة، درجة الحموضة، مدة التحضين، سرعة التهوية، تركيز الركيزة) من الفطر *Tri* 4 باستخدام قشور البرتقال كركيزة بطريقة التخمير المفمور وكانت النتائج كما هو مبين في الجدول (12).

جدول(12) الفعالية الإنزيمية في المعاملات المدروسة بالطريقة المغمورة

Blocks	درجة الحرارة **Temperature C°**	درجة الحموضة **pH**	سرعة التهوية **Aeration speed rpm/m**	تركيز الركيزة **Substrate concentration %**	مدة التحضين **Incubation time Day**	فعالية الإنزيم **Enzyme activity U/ml**
1	20	4	100	1	7	7.77
2	40	4	100	1	3	12.85
3	20	8	100	1	3	16.306
4	40	8	100	1	7	43.286
5	20	4	200	1	3	7.8133
6	40	4	200	1	7	4.663
7	20	8	200	1	7	41.69
8	40	8	200	1	3	19.873
9	20	4	100	5	3	334.11
10	40	4	100	5	7	15.945
11	20	8	100	5	7	177.133
12	40	8	100	5	3	3.676667
13	20	4	200	5	7	77.476
14	40	4	200	5	3	8.886
15	20	8	200	5	3	174.82
16	40	8	200	5	7	15.213
17	20	6	150	3	5	205.29
18	40	6	150	3	5	7.753
19	30	4	150	3	5	186.09
20	30	8	150	3	5	107.3
21	30	6	100	3	5	177.93
22	30	6	200	3	5	89.643
23	30	6	150	1	5	128.13
24	30	6	150	5	5	77.73
25	30	6	150	3	3	92.51
26	30	6	150	3	7	122.20
27	30	6	150	3	5	151.46
28	30	6	150	3	5	150.75
29	30	6	150	3	5	153.19
30	30	6	150	3	5	149.623
31	30	6	150	3	5	149.94
32	30	6	150	3	5	147.19

تحليل التجربة:

دراسة تأثير العوامل المدروسة (كل عامل على حدة، ومربع العوامل، والعلاقة بين العوامل) في فعالية إنزيم polygalacturonase المنتج من *Tri 4* باستخدام قشور البرتقال كركيزة بالتخمير المغمور وكانت النتائج كما في الجدول (13):

جدول(13)تأثير العوامل المدروسة في فعالية الإنزيم بالطريقة المغمورة

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant الثابت	237.310	30.200	7.859	0.000
Temperature درجة الحرارة	-33.271	24.900	-1.336	0.009
pH درجة الحموضة	9.699	24.900	0.389	0.004
Aeration speed سرعة التهوية	-2.884	24.900	-0.116	0.010
Substrate concentration تركيز الركيزة	22.746	24.900	0.913	0.031
Incubation time مدة التحضين	3.579	24.900	0.144	0.008
Temperature*Temperature	-18.036	67.360	-0.268	0.001
pH*pH	-18.111	67.360	-0.269	0.003
Aeration speed*Aeration speed	-31.021	67.360	-0.461	0.004
Substrate concentration*Substrate concentration	-80.721	67.360	-1.198	0.016
Incubation time*Incubation time	-56.951	67.360	-0.846	0.006
Temperature*pH	-15.007	26.420	-0.568	0.051
Temperature*Aeration speed	-1.532	26.420	-0.058	0.040
Temperature*Substrate concentration	-26.867	26.420	-1.017	0.010
Temperature*Incubation time	-2.139	26.420	-0.081	0.007
pH*Aeration speed	3.258	26.420	0.123	0.904
pH*Substrate concentration	8.961	26.420	0.339	0.741
pH*Incubation time	1.463	26.420	0.055	0.957
Aeration speed*Substrate concentration	-1.087	26.420	-0.041	0.968
Aeration speed*Incubation time	-11.277	26.420	-0.427	0.678
Substrate concentration*Incubation time	1.296	26.420	0.049	0.962

R^2=92.2%

دراسة تأثير العوامل المدروسة في فعالية إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير المفمور:

- التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات الخمسة المدروسة(درجة الحرارة- pH- تركيز قشور البرتقال كركيزة- فترة التحضين- سرعة التهوية) كل على حدا في فعالية إنزيم polygalacturonase حسب الجدول(13) حيث نلاحظ أن قيمة *P* المتغيرات (درجة الحرارة- تركيز الركيزة- سرعة التهوية- درجة الحموضة- مدة التحضين) أقل من 0.05% (*P*<0.05) وبالتالي هناك تأثير معنوي لكل من هذه المتغيرات في فعالية الإنزيم والعلاقة خطية
- التأثير المربع Squares effect وتعني تأثير العوامل المربعة مثل pH*pH ونلاحظ من الجدول(13) أن قيمة *P* لجميع العلاقات أقل من0.05 (*P*<0.05) والعلاقة بين هذه العوامل المربعة وفعالية الإنزيم على شكل منحني (قطع مكافئ).

- التاثير التفاعلي Interraction effect وتعني تأثير العوامل المتداخلة في فعالية الإنزيم: ونلاحظ من الجدول(13) أن علاقات التداخل بين درجة الحرارة مع كل من سرعة التهوية – تركيز الركيزة- مدة التحضين معنوية التأثير في فعالية الإنزيم حيث أن قيمة P أقل من 0.05(*P*< 0.05)

أما في باقي العلاقات كانت (*p*>0.05) وبالتالي تأثيرها غير معنوي في فعالية الإنزيم ، واعتماداً على الجدول (13) يمكن كتابة المعادلة كما يلي تحتوي المعادلة على 10 علاقات تداخل بين المتغيرات الخمسة حيث يمثل كل من :

درجة الجرارة Temperature.....X_1

درجة الحموضة pH .....X_2

سرعة التهوية Aeration speed .....X_3

تركيز الركيزة Substrate concentration.....X_4

مدة التحضين Incubation time .....X_5

$$Y=237.31-33.271X_1+9.699X_2-2.884X_3+22.746X_4+3.579X_5- 15.007X_1X_2-1.532X_1X_3-26.869X_1X_4-2.139X_1X_5+3.258X_2X_3+8.961X_2X_4+1.463X_2X_5-$$

$1.087X_3X_4-11.277X_3X_5+1.296X_4X_5-18.036X_1^2 -18.111X_2^2 -31.021X_3^2 - 80.271X_4^2 -56.951X_5^2$

معامل التحديد R^2= 92.20% وهذا يدل على أن العوامل المدروسة مع مربعاتها وعلاقاتها مع بعض مسؤولة عن فعالية الإنزيم بنسبة 92.20%

جدول(14)تحليل التباين لفعالية الإنزيم بالطريقة المغمورة

المصدر	درجة الحرية DF	المجموع التسلسلي للمربعات Seq SS	المجموع المعدل للمربعات Adj SS	معدل متوسط المربعات Adj MS	F	P
Regressionالانحدار	20	319411.000	319411.000	15970.600	1.000	0.005
Linear خطي	5	31311.000	31311.000	6262.200	1.000	0.018
Square مربع	5	269268.000	269268.000	53853.600	5.000	0.014
Interaction التداخل	10	18833.000	18833.000	1883.300	0.000	0.046
Residual Error الخطأ المتبقي	11	122809.000	122809.000	11164.000		
Lack-of-Fit الخطأ في الملاءمة	6	122808.000	122808.000	20468.100	235762.000	0.120
Pure Error الخطأ الكلي	5	0.000	0.000	0.000		
Total المجموع	31	442220.000				

يبين الجدول (14) أن متغير واحد على الأقل من المتغيرات المدروسة المفردة (Linear) ذو تأثير معنوي في فعالية polygalacturonase (0.05>p)، كما يدل على وجود متغير مربع (Square) واحد على الأقل معنوي و كذلك وجود علاقة ارتباط (Interaction) واحدة على الأقل معنوية.

ويبين الشكل (13) الشروط المثلى لظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير المفمورة من الفطر *Tri* 4 باستخدام قشور البرتقال كركيزة هي كالتالي:

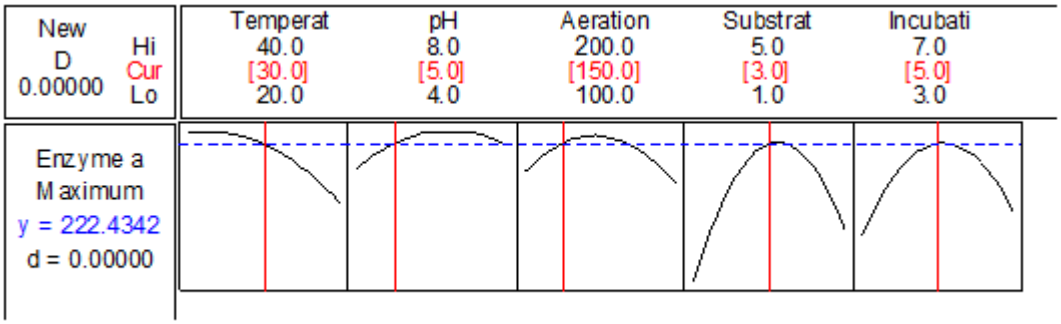
درجة الحرارة = 30^0c

pH = 5

سرعة التهوية= 150rpm

تركيز الركيزة= 3%

مدة التحضين= 5days



الشكل (13) الظروف المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير المغمور من الفطر *Tri* 4 باستخدام قشور البرتقال كركيزة بواسطة البرنامج الإحصائي RSM

طبقت هذه الشروط المبينة في الشكل (13) وقيست الفعالية الإنزيمية لإنزيم polygalacturonase فبلغت 218.975 وحدة/مل، وهي قريبة من فعالية الإنزيم النظرية (y= 222.434)

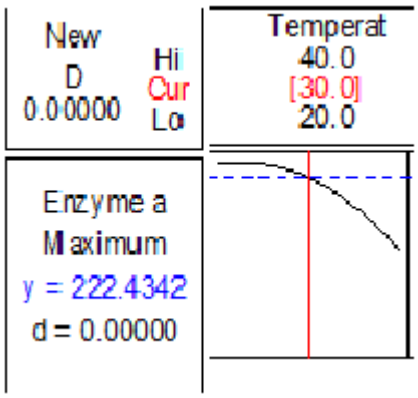
أمثلة ظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase(PG) باستخدام قشور البرتقال كركيزة بالطريقة المغمورة:

1- تأثير درجة الحرارة في فعالية الإنزيم:

تشير النتائج المبينة في الشكل (13) إلى ازدياد الفعالية الإنزيمية بازدياد درجة الحرارة إلى حد يبدأ بعده انخفاض تدريجي في الفعالية الإنزيمية، وهذا يعود إلى أن إنزيم PG حساس تجاه الحرارة وارتفاع درجة الحرارة يؤثر سلباً في نمو الفطر الأمر الذي ينعكس على إنتاج الإنزيم.

كما نلاحظ أن لدرجة الحرارة تأثير معنوي في فعالية الإنزيم وكانت درجة الحرارة المثلى لإنتاج PG هي 30^0c وهذا يتوافق مع نتائج(Abdel-Mohsen *et al*, 2016) الذين حصلوا على إنتاج أعظمي لإنزيم PG عند درجة حرارة 30^0c من فطر *Trichoderma viride* فعند زيادة درجة الحرارة من 27 حتى 30^0c لوحظ زيادة في فعالية الإنزيم في حين زيادة درجة الحرارة عن ذلك أدى إلى تناقص في فعالية الإنزيم، كما توافقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (Saleh *et al*, 2013) في أن درجة الحرارة المثالية لإنتاج إنزيم PG من

فطر *T. harzianum* و *T. virnes* هي 30^0c لإنتاج الإنزيم. والشكل (14)يبين درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة



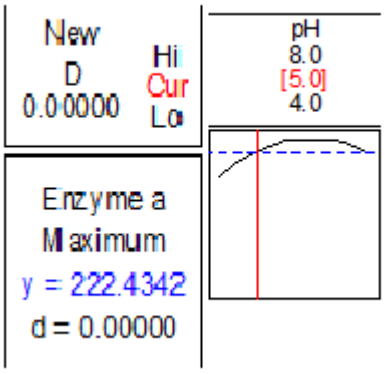
شكل (14) درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة

2-تأثير درجة الحموضة في فعالية الإنزيم:

تتميز الإنزيمات بعدم ثباتيتها تجاه التغير في حموضة الوسط لكن هناك قيمة مثلى للـــ pH لكل إنزيم يكون عندها الإنزيم أكثر فعالية تعرف هذه النقطة بالـــ pH المثالي و يعتبر تحديد هذه النقطة مهماً جداً للوصول بالإنزيم إلى أعلى نشاط.

بينت النتائج أن درجة الحموضة المثالية لإنتاج إنزيم PG ضمن ظروف التجربة المثالية هي 5 باستخدام قشور البرتقال كركيزة لنمو الفطر *Tri 4*كما في الشكل (17) وهذا يتقارب الى ما توصل إليه Yannam وزملاؤه 2014 في إنتاج الإنزيم حيث كان افضلpH هو 5.5 (Yannam et al, 2014). كما توافقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (Saleh et al, 2013) في أن درجة الحموضة المثالية هي 5 لإنتاج إنزيم PG من فطر *T. harzianum* و *T. virnes* .

بينما كان أفضل pH هو **7** عند انتاج إنزيم PG من *Trichoderma pseudokoningii* باستخدام البكتين النقي كركيزة(Debpali et al, 2014). والشكل (15) يبين درجة الحموضة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة



شكل (15) درجة الحموضة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة

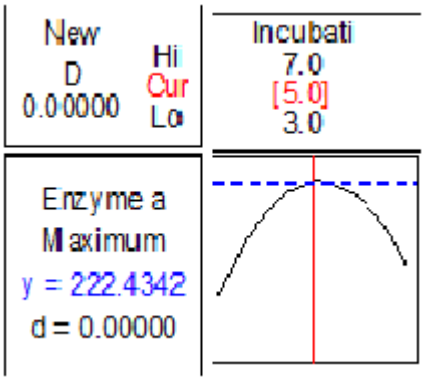
3-تأثير فترة الحضانة في فعالية الإنزيم:

بينت النتائج زيادة في فعالية الإنزيم مع زيادة فترة الحضن لتصل إلى أعلى فعالية بعد تحضين الفطر *Tri 4* لمدة 5 أيام عند استخدام قشور البرتقال كركيزة ضمن الظروف المثالية لإنتاج إنزيم PG كما في الشكل (18) و زيادة مدة التحضين بعد ذلك لم تؤد إلى زيادة في إنتاج الإنزيم وذلك يعود لانخفاض كمية المواد الغذائية بإضافة للمثبطات المنتجة من قبل الفطر نفسه بالإضافة إلى انه كلما زادت نواتج الاستقلاب ينخفض النمو الفطري والسبب في ذلك هو أن هذه النواتج تعمل على زيادة الضغط الإسموزي حيث يكون ضغط الوسط أعلى من ضغط الخلية لذلك سوف يكون معدل خروج الماء من الخلية أسرع من معدل دخوله إليها مما يؤدي إلى حدوث تجفيف لبروتوبلازم الخلية نتيجة لخروج الماء فينكمش البروتوبلازم وهذا يؤدي إلى حدوث بلزمة للخلايا.

كما تطابقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (Saleh *et al*, 2013) في أن مدة التحضين المثالية هي 5 أيام لإنتاج إنزيم PG من فطر *T. harzianum* و *T. virnes* .

كما وجد (Wong and Zuhainis, 2017) عند إنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر *Aspergillus fumigatus* أن أفضل مدة تحضين هي عند تنمية الفطر مدة 5 أيام باستخدام نخالة الرز كركيزة.

و الشكل (16) يبين فترة الحضانة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة



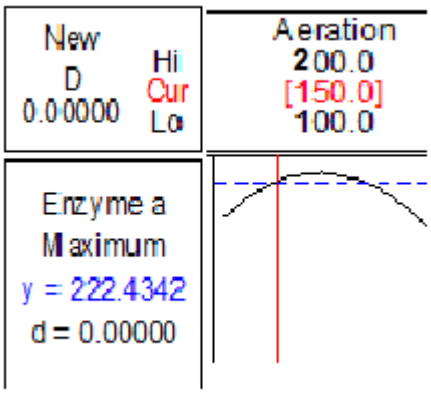
شكل (16) فترة الحضانة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة

4-تأثير سرعة التهوية في فعالية الإنزيم:

استخدمت سرعات مختلفة للحاضنة الهزازة عند تحضين دوارق التخمير لتحديد سرعة التهوية المثالية لإنتاج إنزيم polygalacturonase. لوحظ أن أعلى فعالية إنزيمية كانت لدى استخدام 150 دورة/دقيقة وكان تأثير سرعة التهوية معنوي في إنتاج إنزيم PG باستخدام قشور البرتقال كركيزة لنمو الفطر *Tri 4*.شكل (17)

توافقت هذه النتائج مع نتيجة الدراسة التي أجراها Arijit وزملاؤه لإنتاج إنزيم PG حيث استخدموا سرعات تهوية مختلفة تراوحت بين100-300 دورة/دقيقة وكانت سرعة التهوية المثالية 150دورة/الدقيقة.(Arijit *et al*, 2013)

كذلك توافقت النتائج مع ماتوصل اليه Naderi وزملاؤه حيث وجدو أن أفضل سرعة دوران لإنتاج إنزيم PG كانت 150دورة/ دقيقة باستخدام بكتين الحمضيات كركيزة(Naderi *et al*, 2012). بينما في دراسات أخرى وجد أن استخدام سرعات تهوية عالية (500 دورة/دقيقة) تؤدي لإنتاج كتلة حيوية أكبر وبالتالي إنتاجية أعلى للإنزيم (Oncu *et al*, 2007).

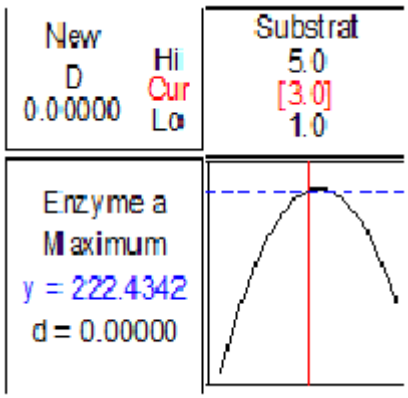


شكل (17) سرعة التهوية المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كركيزة

5-تأثير تركيز الركيزة في فعالية الإنزيم:

استخدمت تراكيز مختلفة من قشور البرتقال كمادة غنية بالبكتين عند دراسة الشروط المثلى لإنتاج إنزيم PG وذلك لتحديد التركيز الأفضل فكان التركيز 3% (التركيز كنسبة مئوية من حجم وسط التخمير) هو الأمثل لفعالية إنزيم PG المنتج من الفطر *Tri* 4. وكان تأثيره معنوياً في فعالية الإنزيم.

وهذا مايتوافق مع ما توصل إليه (Saleh *et al*, 2009) عند إنتاج إنزيم PG من ***Trichoderma harzianum*** باستخدام قشور البرتقال كركيزة حيث كان التركيز المثالي الذي يحقق أعلى فعالية إنزيمية هو 3% من قشور البرتقال، والشكل (18) يبين التركيز الأمثل للركيزة(قشور البرتقال) لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور



شكل (18) التركيز الأمثل للركيزة(قشور البرتقال) لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير المغمور

4-4-2-طريقة التخمير الصلب:

استخدم تصميم التجارب المتقدم Response Surface Methodology باستخدام برنامج Minitap Optimization Method لدراسة الظروف المثلى لإنتاج الإنزيم بالطريقة الصلبة(درجة الحرارة، درجة الحموضة، مدة التحضين، سرعة التهوية، نسبة الرطوبة الأولية) من الفطر *Tri* 4 باستخدام قشور البرتقال كركيزة بطريقة التخمير الصلب وكانت النتائج كما هو مبين في الجدول (15).

جدول(15) الفعالية الإنزيمية في المعاملات المدروسة بالطريقة الصلبة

الفعالية الإنزيمية وحدة/مل	مدة التحضين (يوم)	نسبة الرطوبة الاولية %	سرعة التهوية **rpm/m**	**p H**	الحرارة **C**	**Blocks**
9.123	7	80	100	4	20	1
14.096	3	60	100	4	40	2
20.42	3	60	100	8	20	3
44.761	7	80	100	8	40	4
5.187	3	60	200	4	20	5
5.821	7	80	200	4	40	6
44.328	7	80	200	8	20	7
20.641	3	60	200	8	40	8
359.875	3	60	100	4	20	9
12.453	7	80	100	4	40	10
164.961	7	80	100	8	20	11
5.128	3	60	100	8	40	12
86.34	7	80	200	4	20	13
10.024	3	60	200	4	40	14
187.925	3	60	200	8	20	15
17.965	7	80	200	8	40	16
222.091	5	70	150	6	20	17
10.54	5	70	150	6	40	18
202.6	5	70	150	4	30	19
103.964	5	70	150	8	30	20
186.32	5	70	100	6	30	21
82.721	5	70	200	6	30	22
138.83	5	70	150	6	30	23
72.08	5	70	150	6	30	24
95.44	3	60	150	6	30	25
130.041	7	80	150	6	30	26
164.327	5	70	150	6	30	27
157.976	5	70	150	6	30	28
166.215	5	70	150	6	30	29
143.076	5	70	150	6	30	30
155.751	5	70	150	6	30	31
159.03	5	70	150	6	30	32

جدول(16) تأثير العوامل المدروسة في فعالية إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير الصلب:

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant الثابت	294.616	20.650	14.264	0.000
Temperatureدرجة الحرارة	-46.860	17.030	-2.751	0.019
pHدرجة الحموضة	3.233	17.030	0.190	0.003
Aeration speedسرعة التهوية	-3.044	17.030	-0.179	0.001
Moistureنسبة الرطوبة الاولية	12.984	17.030	0.762	0.002
Incubation timeمدة التحضين	-3.732	17.030	-0.219	0.031
Temperature*Temperature	-83.551	46.070	-1.813	0.007
pH*pH	-92.696	46.070	-2.012	0.049
Aeration speed*Aeration speed	-42.831	46.070	-0.930	0.033
Moisture * Moisture	113.239	46.070	2.458	0.032
Incubation time*Incubation time	-133.236	46.070	-2.892	0.015
Temperature*pH	-4.038	18.070	-0.223	0.027
Temperature*Aeration speed	0.351	18.070	0.019	0.985
Temperature* Moisture	-19.604	18.070	-1.085	0.041
Temperature*Incubation time	10.249	18.070	0.567	0.582
pH*Aeration speed	-0.606	18.070	-0.034	0.074
pH* Moisture	7.939	18.070	0.439	0.049
pH*Incubation time	2.943	18.070	0.163	0.074
Aeration speed* Moisture	2.408	18.070	0.133	0.006
Aeration speed*Incubation time	-13.546	18.070	-0.750	0.069
Moisture *Incubation time	0.534	18.070	0.030	0.077

R^2 = 91.50%

معامل التحديد R^2= 91.50% وهذا يدل على أن العوامل المدروسة مع مربعاتها وعلاقاتها مع بعض مسؤولة عن فعالية الإنزيم بنسبة 91.50%

كما هو مبين في الجدول (16) تمت دراسة تأثير العوامل المختبرة (كل عامل على حدى، ومربع العوامل، والعلاقة بين العوامل) في فعالية إنزيم polygalacturonase المنتج من *Tri 4*باستخدام قشور البرتقال كركيزة بالتخمير الصلب

التحليل الإحصائي لتأثير المتغيرات الخمسة المدروسة (درجة الحرارة– pH– نسبة الركوبة الأولية– فترة التحضين– سرعة التهوية) كل على حدا في فعالية إنزيم polygalacturonase حسب الجدول (16) حيث نلاحظ أن قيمة *P* للمتغيرات المدروسة أقل من 0.05% (*P*<0.05) وبالتالي هناك تأثير معنوي لكل من هذه المتغيرات في فعالية الإنزيم والعلاقة خطية

التأثير المربع Squares effect وتعني تأثير العوامل المربعة مثل pH*pH ونلاحظ من الجدول(16) أن قيمة *P* لجميع العلاقات أقل من0.05 (*P*<0.05) والعلاقة بين هذه العوامل المربعة وفعالية الإنزيم على شكل منحني (قطع مكافئ).

التاثير التفاعلي Interraction effect وتعني تأثير العوامل المتداخلة في فعالية الإنزيم: ونلاحظ من الجدول (16) أن علاقات التداخل بين سرعة التهوية مع كل من درجة الحرارة ودرجة الحموضة وسرعة التهوية معنوية التأثير في فعالية الإنزيم حيث أن قيمة P أقل من 0.05(*P*< 0.05)

أما في باقي العلاقات كانت (*p*>0.05) وبالتالي تأثيرها غير معنوي في فعالية الإنزيم ، واعتماداً على الجدول (16) يمكن كتابة المعادلة كما يلي تحتوي المعادلة على 10 علاقات تداخل بين المتغيرات الخمسة حيث يمثل كل من :

درجة الجرارة Temperature..…… X_1

pH ……..…… X_2

سرعة التهوية Aeration speed ……..... …… X_3

نسبة الرطوبة الاولية %…… X_4

مدة التحضين Incubation time ..…..…….. X_5

$$Y=294.616-46.86X_1+3.233X_2-3.044X_3+12.984X_4-3.732X_5-4.038X_1X_2-0.351X_1X_3-19.604X_1X_4+10.249X_1X_5-0.606X_2X_3+7.939X_2X_4+2.943X_2X_5+2.408X_3X_4-13.546X_3X_5+0.534X_4X_5-83.551X_1^2-92.696X_2^2-42.831X_3^2-113.239X_4^2-113.236X_5^2$$

جدول(17)تحليل التباين لفعالية الإنزيم بالطريقة الصلبة

المصدر	المصدر	درجة الحرية DF	المجموع التسلسلي للمربعاتSeq SS	المجموع المعدل للمربعات Adj SS	معدل متوسط المربعاتAdj MS	F	P
Regressionالانحدار	**Regression**	20	487206.000	487206.000	24360.300	4.660	0.006
Linear خطي	**Linear**	5	43166.000	43166.000	8633.200	1.650	0.026
Square مربع	**Square**	5	431762.000	431762.000	86352.300	16.530	0.000
Interaction التداخل	**Interaction**	10	12279.000	12279.000	1227.900	0.240	0.045
Residual Error الخطأ المتبقي	**Residual Error**	11	57458.000	57458.000	5223.400		
Lack-of-Fit الخطأ في الملاءمة	**Lack-of-Fit**	6	57456.000	57456.000	9576.000	29594.270	0.240
Pure Error الخطأ الكلي	**Pure Error**	5	2.000	2.000	0.300		
Total المجموع	**Total**	31	544664.000				

يبين الجدول (17) أن متغير واحد على الأقل من المتغيرات المدروسة المفردة (Linear) ذو تأثير معنوي في فعالية polygalacturonase (0.05>p)، كما يدل على وجود متغير مربع (Square) واحد على الأقل معنوي و كذلك وجود علاقة ارتباط (Interaction) واحدة على الأقل معنوية.

ويبين الشكل (19) الشروط المثلى لظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير الصلبة من الفطر *Tri* 4 باستخدام قشور البرتقال كركيزة هي كالتالي:

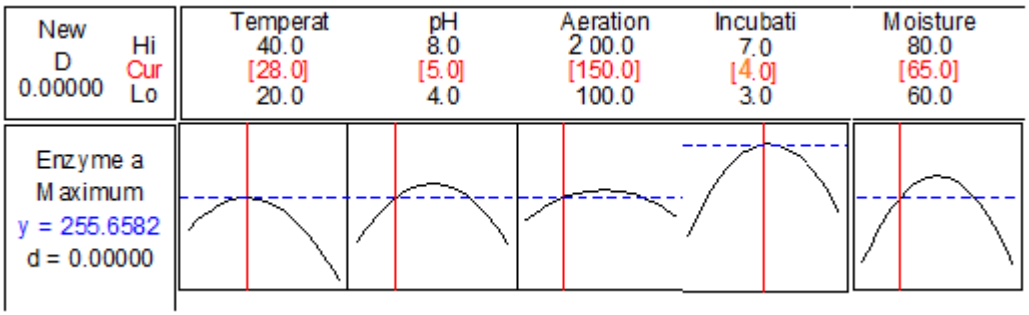
Temperature = 28^0c

pH = 5

Aeration speed = 150rpm

Moisture % = 65%

Incubation time = 4days

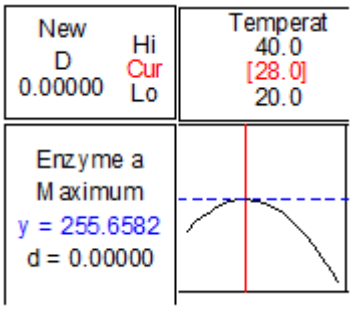


الشكل (19) الظروف المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير الصلب من الفطر *Tri* 4 باستخدام قشور البرتقال كركيزة بواسطة البرنامج الإحصائي RSM

1-تأثير درجة الحرارة في فعالية الإنزيم:

تشير النتائج المبينة في الشكل (22) إلى ازدياد الفعالية الإنزيمية بازدياد درجة الحرارة إلى 28^0 م بعدها نلاحظ انخفاض تدريجي في الفعالية الإنزيمية وهذا يتوافق مع نتائج(Nab *et al*. 2003) الذين حصلوا على إنتاج أعظمي لإنزيم PG عند درجة حرارة 28^0 م من فطر *Trichoderma viride* باستخدام قشور البصل كركيزة فعند زيادة درجة الحرارة من 27 حتى C˚30 لوحظ زيادة في فعالية الإنزيم في حين زيادة درجة الحرارة عن ذلك أدى إلى تناقص في فعالية الإنزيم.

كما تقاربت هذه النتائج مع ما توصل إليه (Okafor *et al*. 2010) في أن درجة الحرارة المثالية لإنتاج إنزيم PG من فطر *T. harzianum* و *T. virnes* هي C˚30 باستخدام نخالة القمح كركيزة. والشكل (20) يبين درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة

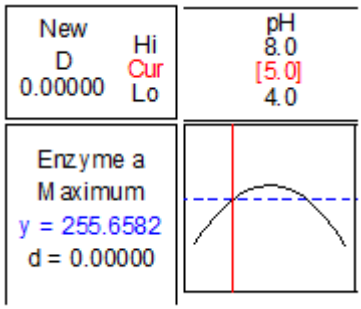


شكل (20) درجة الحرارة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة

2-تأثير درجة الحموضة في فعالية الإنزيم:

بينت النتائج أن درجة الحموضة المثالية لإنتاج إنزيم PG ضمن ظروف التجربة المثالية هي 5 باستخدام قشور البرتقال كركيزة لنمو الفطر *Tri 4*، وهذا يتقارب الى ما توصل اليه Okaforفي إنتاج الإنزيم حيث كان افضلpH هو 5.5 (Okafor et al, 2010). كما توافقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (Saleh *et al*, 2013) في أن درجة الحموضة المثالية هي 5 لإنتاج إنزيم PG من فطر *T. harzianum* و *T. virnes* .

والشكل (21) يبين درجة الحموضة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة



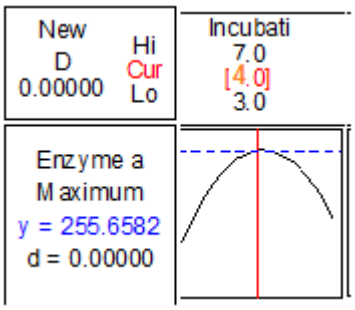
شكل (21) درجة الحموضة المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة

3-تأثير فترة الحضانة في فعالية الإنزيم:

بينت النتائج زيادة في فعالية الإنزيم مع زيادة فترة الحضن لتصل إلى أعلى فعالية بعد تحضين الفطر *Tri 4*لمدة 4 أيام عند استخدام قشور البرتقال كركيزة ضمن الظروف المثالية لإنتاج إنزيم PG ، و زيادة مدة التحضين بعد ذلك لم تؤد إلى زيادة في إنتاج الإنزيم كما هو مبين في الشكل (22)

تطابقت هذه النتائج مع ما توصل إليه (Okafor *et al*, 2010) في أن مدة التحضين المثالية هي 4 أيام لإنتاج إنزيم PG من فطر *T. harzianum* و *T. virnes* .

بينما وجد Nab وزملاؤه أن أفضل مدة تحضين كانت 3 أيام عند تنمية الفطر *Trichoderma harzianum* على قشور الحمضيات بهدف إنتاج إنزيم PG(Nab *et al*, 2003).

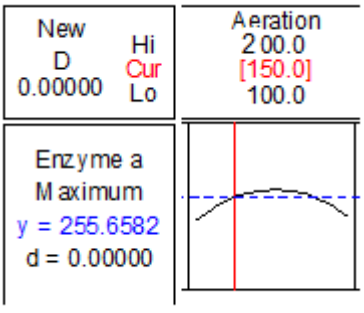


شكل (22) مدة التحضين المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة

4- تأثير سرعة التهوية في فعالية الإنزيم:

استخدمت سرعات مختلفة للحاضنة الهزازة عند تحضين دوارق التخمير لتحديد سرعة التهوية المثالية لإنتاج إنزيم polygalacturonase. لوحظ أن أعلى فعالية إنزيمية كانت لدى استخدام 150 دورة/ وكان تأثير سرعة التهوية معنوي في إنتاج إنزيم PG باستخدام قشور البرتقال كركيزة لنمو الفطر *Tri 4*.كما هو مبين في الشكل(23)

توافقت هذه النتائج مع نتيجة الدراسة التي أجراها Grajek لإنتاج إنزيم PG حيث استخدم سرعات تهوية مختلفة تراوحت بين100-300 دورة/دقيقة وكانت سرعة التهوية المثالية 150دورة/الدقيقة.(Grajek, 2009)، كذلك توافقت النتائج مع ماتوصل اليه Naderiوزملاؤه حيث وجدو أن أفضل سرعة دوران لإنتاج إنزيم PG كانت 150دورة/ دقيقة باستخدام بكتين الحمضيات كركيزة(Naderi *et al*, 2012).



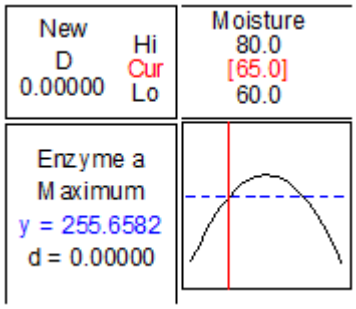
شكل (23) سرعة التهوية المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة

5-تأثير نسبة الرطوبة الأولية في فعالية الإنزيم:

بينت النتائج زيادة في فعالية الإنزيم مع ازدياد الرطوبة الأولية للركيزة المستخدمة حتى نسبة 65% وبعدها بدأت الفعالية بالانخفاض كما هو مبين في الشكل (24).

إن انخفاض محتوى الرطوبة للركائز الصلبة يؤدي إلى انخفاض قابلية ذوبان المواد المغذية من الركيزة، كما تشجع الفطر على التبوغ، ومن جهة أخرى فإن ارتفاع المحتوى الرطوبي عن الحد الأمثل يؤدي إلى انخفاض مردود الإنزيم، وذلك يعود إلى أن ارتفاع محتوى الرطوبة يشكل حواجز فراغية في مسام الركيزة الصلبة وبالتالي يقلل من انتشار هيفات الفطر إضافة إلى خفض كفاءة نقل الأوكسجيناللازم لعملية التخمير.

تقاربت نتائج لبحث مع ماتوصل إليه Nab وزملاؤه حيث كانت نسبة الرطوبة الأولية لقشور الحمضيات كركيزة لإنتاج PG من *Trichoderma harzianum* هي 70%(Nab *et al*, 2003) بينما كانت أفضل رطوبة أولية لإنتاج إنزيم PG بالتخمير الصلب من *Trichoderma viride* كانت 80% (Grajek, 2009)



شكل (24) نسبة الرطوبة الأولية المثلى لإنتاج إنزيم polygalacturonase من الفطر Tri 4 بالتخمير الصلب باستخدام قشور البرتقال كركيزة

4-5-دراسة الصفات الفيزيوكيميائية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من الفطر *Tri 4* بالطريقة المغمورة:

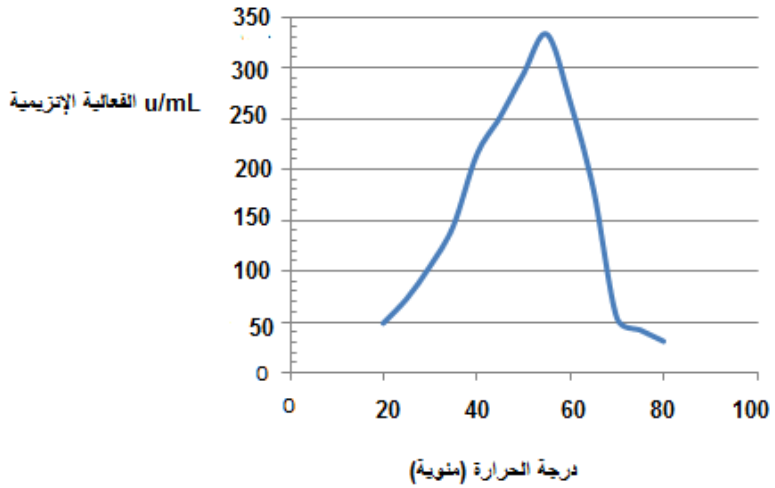
أنتج إنزيم polygalacturonase من الفطر *Tri4* بطريقة التخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كمصدر وحيد للكربون ضمن الظروف المثالية التي توصل إليها البحث ، ثم درست الصفات الفيزيوكيميائية للإنزيم الخام الناتج من حيث عدة عوامل مؤثرة على فعاليته كدرجة الحرارة ودرجة الحموضة pH وإضافة بعض الأملاح المعدنية وتركيز الركيزة.

1- تحديد درجة الحرارة المثلى للإنزيم الخام:

يبين الشكل (27) أن درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4* هي 55^0c ، حيث يكون نشاط الإنزيم ضعيفاً عند درجة حرارة 20^0c بفعالية إنزيمية قدرها 48.8 U./mL، وتزداد هذه الفعالية لتصل إلى 330 U./mL عند درجة حرارة 55^0c ، وبعدها تنخفض الفعالية مع ارتفاع درجة الحرارة لتصبح 31.05U./mL عند درجة حرارة 80^0c كما هو موضح في الشكل (25). إن ازدياد الفعالية الإنزيمية مع ازدياد درجة الحرارة إلى الدرجة يعود إلى زيادة الطاقة الحركية لكل من جزيئات الإنزيم والركيزة، مما يؤدي إلى زيادة التصادمات بينها فتزداد درجة ارتباطها، وهذا بدوره يؤدي إلى زيادة الفعالية الإنزيمية، وان ارتفاع درجة الحرارة أكثر من ذلك يؤدي إلى انخفاض الفعالية،لأن الحرارة العالية عملت على تخثر البروتين.

وقد توافقت نتائج البحث مع نتائج (Saleh *et al*, 2009) حيث تبين أن إنزيم polygalacturonase المنتج من *Trichoderma harzianum* أعطى أعلى فعالية على درجة حرارة $50\text{-}55^0$c بينما انخفضت فعاليته عند درجات الحرارة $80^0\text{-}90^0$c بسبب تخرب الإنزيم على درجات الحرارة العالية، بينما لوحظ في دراسة أخرى أن الحرارة المثالية لعمل إنزيم PG هي 40^0 م (Saleh *et al*, 2006).

كما كان أعلى نشاط للإنزيم PG المنتج من الفطر *Penicillium janthinellum* sw09 عند الدرجة 45^0م (Yuping *et al*, 2016).



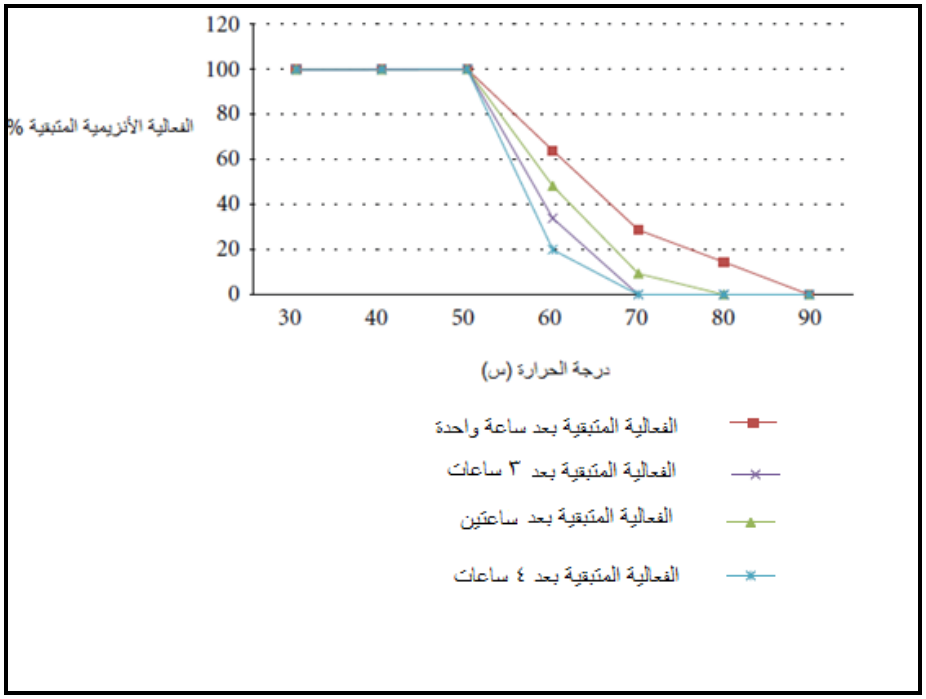
شكل (25) تأثير درجة الحرارة في الفعالية الإنزيمية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4*

2-دراسة الثباتية الحرارية لإنزيم polygalacturonase الخام:

يبين الشكل(26) الفعالية الإنزيمية تبعاً لدرجة حرارة حضن محلول الإنزيم بعد تعديل رقم درجة حموضته بمحلول أسيتات الصوديوم إلى pH6 لفترات حضن مختلفة (30 دقيقة حتى 3 ساعات)، حيث احتفظ الإنزيم بـــ 95% من فعاليته بعد تسخينه على درجة حرارة 55^0س لمدة ساعة واحدة ، وبعدها انخفضت فعاليته عند استمرار تسخينه على نفس هذه الدرجة لمدة 4 ساعات لتصبح 20% فقط، حيث بدأت الفعالية بالانخفاض مع ارتفاع درجة الحرارة وزمن الحضن لتصل إلى 3% فعالية متبقية عند تسخينه على درجة حرارة 80^0c لمدة أربع ساعات. وهذا ما يتوافق مع نتائج(Delabona *et al*, 2013) حيث وجدوا أن الإنزيم بقي مستقراً بعد ساعة من الحضن على حرارة 50^0c.

بينما وجد أن الإنزيم المنتج من *Trichoderma harzianum* المنماة على قشور البرتقال الإنزيم بقي مستقرا عند تحضينه ع درجة 50^0c لمدة 30 دقيقة(Saleh *et al*, 2009).

وفي دراسة أجريت لأنتاج الإنزيم من *Rhizomucor pusillus* وجد أنه بقي ثابتا عند تحضينه لمدة 120 دقيقة على درجة حرارة 50^0c وحموضة pH بين 5-4 ثم انخفضت ثباتيته بعد 60^0 م و pH اعلى من 5.(Siddiqui et al, 2012).

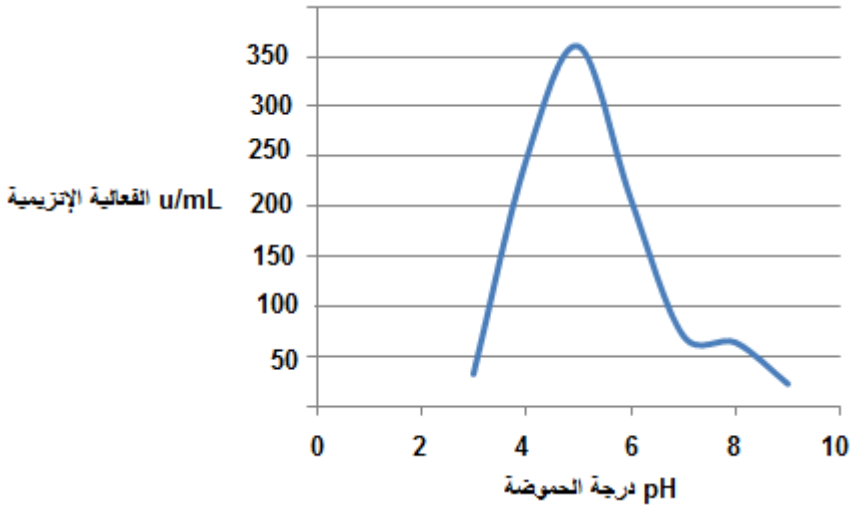


شكل (26) تأثير زمن الحضن في الثباتية الحرارية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4* عند درجات حرارة مختلفة

3-تحديد رقم الحموضة الأمثل للإنزيم:

بينت النتائج أن أفضل درجة حموضة لفعالية إنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri4*كانت في المجال الحامضي للوسط ، حيث بدأت فعالية الإنزيم بالتزايد مع ارتفاع رقم الـــ pHإلى أن وصل إلى أعلى فعالية عند pH5 حيث كانت 360.4U./mL، وبعدها تراجعت فعالية الإنزيم إلى أن وصلت إلى 22.89U./ML عند pH9 ، يعود سبب انخفاض الفعالية الإنزيمية عند أرقام حموضة أعلى من 5 إلى تأثيرpH الوسط في الحالة الأيونية للمجاميع الجانبية في الموقع الفعال للإنزيم وجعلها غير ملائمة للارتباط مع الركيزة. وهذا ما يوضحه الشكل(27). وهذه ما يتوافق مع(Heerd *et al*, 2012) حيث كان رقم الـــ pH الأمثل لعمل الإنزيم عند pH 5 .

تقاربت النتائج مع ماتوصل اليه Okafor وزملائه عند أنتاج إنزيم PG من الفطر *Trichoderma* باستخدام نخالة القمح كركيزة حيث كان ال pH المثالي لعمل الإنزيم هو 5.5 (Okafor *et al*, 2010)، بينما ابتعدت النتائج عن ما وجده Nab وزملاؤه حيث كانت أعلى فعالية للإنزيم عند pH 7 لدى انتاجه من Trichoderma harzianum (Nab *et al*, 2003).

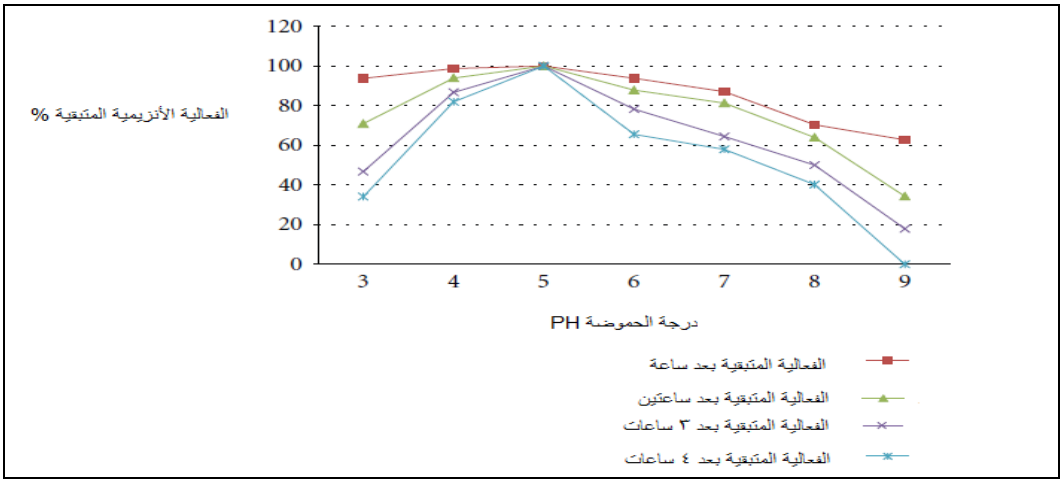


شكل(27) تأثير درجة الحموضة في الفعالية الإنزيمية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4*

4-الثباتية الحمضية لإنزيم polygalacturonase الخام:

يبين الشكل(28) أن الإنزيم بقي مستقراً بعد ساعة من تحضينه في المجال الحمضي pH4-5، ولوحظ تدهور في فعالية الإنزيم مع ارتفاع رقم حموضة الوسط وزيادة زمن الحضن، حيث وصلت الفعالية المتبقية للإنزيم إلى 20% عند pH 9 وذلك بعد 3 ساعات من حضن الإنزيم على هذه الدرجة. وهذا ما يتوافق مع نتائج (Magda et al, 2013) حيث أن الإنزيم بقي مستقرا في المجال pH 4-6.

بينما وجد في دراسات أخرى على إنزيم PG المنتج من *Trichoderma harzianum* المنماة على قشور البرتقال أنه بقي ثابتاً ضمن مجال pH 3.5-7(Saleh *et al*, 2009). ولدى أنتاجه من Fuzarium sp باستخدام البكتين كركيزة كان الإنزيم الناتج ثابتا عند pH بين 4-8(Rajendran *et al*, 2011).



شكل (28) تأثير زمن الحضن في الثباتية الحمضية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4* عند درجات حموضة مختلفة

5-تأثير بعض الشوارد المعدنية في فعالية إنزيم polygalacturonase الخام:

يبين الجدول (18) تأثير بعض الشوارد المعدنية (بتركيز 1mM) في فعالية إنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri 4* ، حيث بينت النتائج أن لشوارد Ag^{+2} و Mn^{+2} دور منشط لعمل الإنزيم حيث ازدادت الفعالية بنسبة 37 و 10 % على التوالي، أما شوارد الحديد فقد لعبت دوراً مثبطاً لأن الحديد يرتبط مع المركز الفعال للإنزيم ويشكل معقداً معه مما يؤدي إلى إعاقة ارتباط الإنزيم مع الركيزة حيث انخفضت الفعالية بنسبة 21% ، كما كان لـــ Citric acid أثر منشط لعمل الإنزيم حيث ارتفعت الفعالية بنسبة 41% لدى

إضافته بتركيز 1mM وهذا ماتوافق مع نتائج (Arotupin *et al*, 2012) التي بينت ازدياد فعالية الإنزيم بوجود بعض الشوارد المعدنية كالمنغنيز والفضة، وفي دراسة اجريت على أنتاج PG من *Penicillium citrinum* تبين أن لشوارد Mg^{+2} و Zn^{+2} دور محفز لعمل الإنزيم (El-Batal *et al*, 2013)، كما وجد Saleh وزملاؤه عند أنتاج PG من *Trichoderma harzianum* أنه كان لبعض الشوارد تأثير مثبط جزئي للإنزيم مثل(Ca^{+2} –Li^{+2}- Ag^{+2}) بينما منعت شوارد Co^{+2} و Mn^{+2} عمل الإنزيم تماماً(Saleh *et al*, 2006)

وفي دراسة أنتج فيها الإنزيم من *Aspergillus niger* لوحظ أن وجود شوارد Mg^{+2} وCo^{+2} أدت لزيادة الفعالية بنسبة 127% (Sopuruchukwu *et al*, 2016).

جدول (18) **تأثير بعض الشوارد المعدنية والمركبات المعدنية(بتركيز 1mM)في فعالية إنزيم polygalacturonase الخام**

الشوارد المعدنية/ والمركبات الكيميائية (1mM)	الفعالية المتبقية %
الشاهد	100
بوتاسيوم K^{+}	73
مفنزيوم Mg^{+2}	96
حديد Fe^{+2}	79
كالسيوم Ca^{+2}	64
زنك Zn^{+2}	54
فضة Ag^{+2}	137
منغنيز Mn^{+2}	110
Citric acid	141

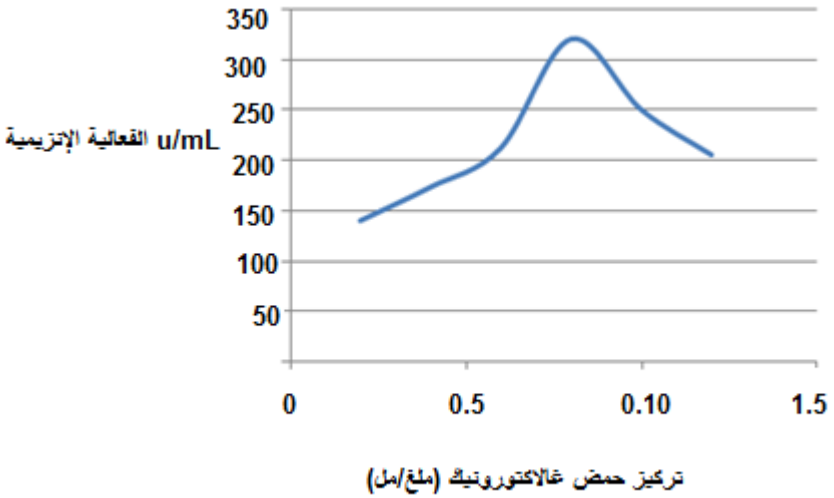
تأثير تركيز ركيزة حمض غالاكتيورونيك المتعدد polygalacturonic acid (PGA)في فعالية الإنزيم الخام:

أن تكوين المعقد الإنزيمى يسبق التحولات التى تحدث فى مادة التفاعل وبما أن حجم جزئ الإنزيم أكبر بكثير من حجم مادة التفاعل فإن المراكز النشطة للإنزيم لا تشغل بالكامل عند

إستخدام التركيزات المنخفضة لمادة التفاعل حيث تقل نسبة إرتباط مادة التفاعل بالمركز النشط لسطح الإنزيم و ينعكس ذلك سلبياً على الكفاءة أو السرعة القصوي لهذا الإنزيم لكن عند زيادة تركيزمادة التفاعل فإن عدد الجزيئات الموجودة بجوار المركز النشط تزداد وبذلك تزداد فرصة إتصاله به، وعند تثبيت تركيز الإنزيم فإن تركيز مادة التفاعل يترتب عليه زيادة فى معدل تحفيز الإنزيم للتفاعل إلى أن يصل المركز النشط إلى درجة التشبع وعمل الإنزيم بكفاءته القصوى

يبين الشكل (29) الفعالية الإنزيمية لدى استخدام تراكيز مختلفة من PGA، حيث ازدادت فعالية الإنزيم مع ازدياد تركيز الركيزة و أعطى أعلى فعالية(330U./mL) عند تركيز 0.8 ملغ/مل من PGA وهذا ماتوافق مع (Rodriguez and Sanroman, 2005).

بينما وجد Martos وزملاؤه لدى إنتاج إنزيم PG من *Aspergillus niger* أن أفضل تركيز للركيزة هو بنسبة 2%(2009 ,Martos *et al*)



شكل(29) تأثير تركيز الركيزة polygalacturonic acid (PGA) في فعالية الإنزيم الخام

4-6-نتائج التنقية الجزئية لإنزيم polygalacturonase **المنتج من** *Tri 4* **بطريقة التخمير المغمور:**

بهدف تقدير كمية البروتين بعد كل مرحلة من مراحل التنقية، تم رسم المنحني القياسي للبروتين، حيث جرى تحضير تراكيز متدرجة من محلول ألبومين المصل البقري BSA تتراوح من 0.05-1 مغ/مل وقيست الامتصاصية باستخدام جهاز سبيكتروفوتومتر على

طول موجي 750nm ، ومنها رسم المنحنى القياسي للعلاقة بين تركيز BSA (ملغم/مل) والامتصاصية ، وبتعويض قيمة الامتصاصية المقاسة بعد كل مرحلة من مراحل التنقية في معادلة المنحني القياسي للبروتين يتم الحصول على تركيز البروتين في العينة مقدراً بالميكروغرام / مل (Lowry *et al*, 1951)، (Rajendran *et al*. 2011).

حيث يوضح الشكل(2) العلاقة الخطية بين تراكيز المحلول القياسي لـــ BSA والامتصاصية على طول موجي 750nm

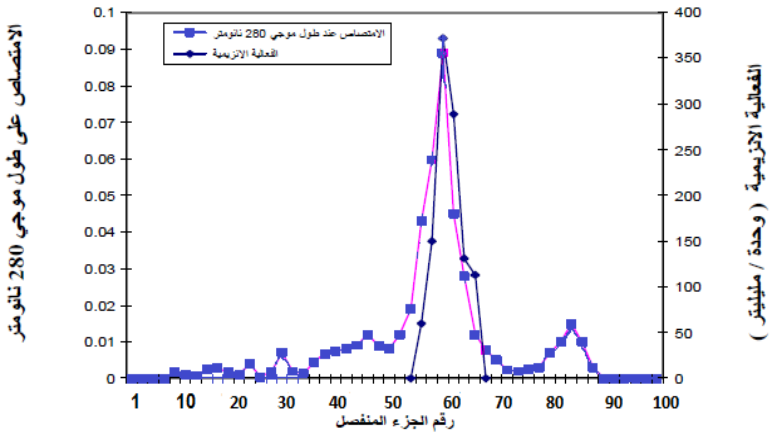
أنتج إنزيم polygalacturonase(PG) من *Tri 4* باستخدام قشور البرتقال كركيزة و بطريقة التخمير المغمور ضمن الشروط المثلى في الدراسة، و أجريت مراحل التنقية الجزئية لإنزيمPG بدءاً من المعالجة الحرارية للراشح الإنزيمي الخام ثم الترسيب بالأسيتون وانتهاءً باستخدام أعمدة الكروماتوغرافيا Sephacryl S-200 . حيث قدرت كل من الفعالية الإنزيمية(u/ml) وحسبت الفعالية الكلية للإنزيم(U) وتركيز البروتين له(mg/ml) بعد كل مرحلة من مراحل التنقية، ثم حسبت الفعالية النوعية من قسمة قيمة الفعالية االإنزيمية(u/ml) على تركيز البروتين (mg/ml).

حيث أدت المعالجة الحرارية للمستخلص الإنزيمي إلى زيادة الفعالية النوعية من 153.4 إلى 180.5 وحدة/ مغ ورفع عدد مرات التنقية إلى 1.17 مرة. كما إن عملية ترسيب البروتينات بالاسيتون المبرد أدت إلى زيادة الفعالية النوعية من 153.4 إلى 227.5 وحدة/ مغ ورفع عدد مرات التنقية إلى 1.5 مرة.

وهذا ماتوافق مع الدراسات المرجعية التي توصي بإخضاع المستخلص الإنزيمي الخام للمعالجة الحرارية والترسيب بالاسيتون المبرد لما له من أهمية في التنقية الجزئية لإنزيم PG حيث أن المعاملة بالاستون المبرد أدت إلى زيادة الفعالية النوعية ثلاث أضعاف عما كانت عليه في المستخلص الإنزيمي وزيادة عدد مرات التنقية 3.13 مرة (Gautam *et al*, 2016). وفي دراسة أجراها Rajendra وزملاؤه لوحظ زيادة في عدد مرات التنقية إلى 2.5 مرة (Rajendran *et al*, 2011).

أخذ 5 مل من محلول الإنزيم بعد المعالجة الحرارية والترسيب بالاسيتون المبرد و حُمّل في العمود Sephacryl S-200 على عدة دفعات وأجريت عمليتا الغسل Washing والاسترداد Elution بمحلول موقي أسيتات الصوديوم وبسرعة جريان مقدارها 60مل/ساعة جمعت

الأجزاء المفصولة من العمود بجامع الأجزاء Fraction collecter بمعدل 1مل للجزء الواحد تمت متابعة الامتصاصية للأجزاء المفصولة عند طول موجة 280 نانومتر ورسم المنحني البياني للعلاقة بين الامتصاصية وأرقام الأنابيب، ثم جمعت محتويات الأنابيب التي تقع ضمن تشكيل القمة، وقيس حجمها وقدرت فعاليتها وجرى تقدير البروتين. ويبين الشكل (30) أن الأجزاء التي جمعت في الأنابيب بين 54–63 أظهرت أعلى فعالية للإنزيم.



الشكل(30) نتائج تنقية PG باستخدام هلامة Sephacryl S-200 ، قيست الامتصاصية لأجزاء البروتين التي فصلت باستخدام أسيتات الصوديوم وبسرعة جريان مقدارها 60 مل/ساعة جمعت الأجزاء المفصولة من العمود بمعدل 1 مل للجزء الواحد وتم قياس الامتصاصية عند طول موجة 280 nm
لأجزاء البروتين. ثم قيست فعالية الأنزيم عند كل قمة.

ويبين الجدول (19) ملخصاً لخطوات تنقية إنزيم polygalacturonase(PG) المنتج من الفطر *Tri 4*باستخدام قشور البرتقال كركيزة و بطريقة التخمير المغمور، حيث أظهرت النتائج ارتفاع الفعالية الإنزيمية التي بلغت 135.4 وحدة/مل، كما بلغت الفعالية النوعية 735.8 وحدة/ مغ وبعدد مرات تنقية بلغت 4.7 وبحصيلة إنزيمية مقدارها 20.7%.

جدول(19) مراحل التنقية لإنزيم **polygalacturonase(PG)**

خطوات التنقية	الحجم الناتج [ml]	الفعالية الإنزيمية [U/ml]	الفعالية الكلية [U]	تركيز البروتين [mg/ml]	الفعالية النوعية [U/mg]	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية %
المستخلص الخام	50	130.42	6521	0.85	153.4	1	100
المعالجة الحرارية	47	128.2	6025	0.71	180.5	1.17	92.3
الترسيب بالاسيتون	25	129.7	3242	0.57	227.5	1.5	49.7
هلامة Sephacryl S-200	10	135.4	1354	0.28	588.7	4.7	20.7

وقد تمكن Saleh وآخرون (2009) من تنقية إنزيم PG المنتج من الفطر *Trichoderma harzianum* المنماة على قشور البرتقال بعد تنقيته بعدة خطوات تنقية تمثلت بعمود التبادل الأيوني DEAE- Sepharose وبعده عمود الكروماتوغرافيا Sephacryl S-200 وكانت الحصيلة الإنزيمية 40% وبعدد مرات تنقية بلغت 3.8 مرة.

كما أنتج إنزيم PG من الفطر *Trichoderma viride* وتمت تنقيته جزئيا بالترسيب بسلفات الامونيوم والايتانول 50% ثم الترسيب بالاسيتون المبرد للوصول إلى عدد مرات التنقية 1.22 مرة وبحصيلة إنزيمية قدرها 17.28% (Abdel-Mohsen *et al*, 2016)

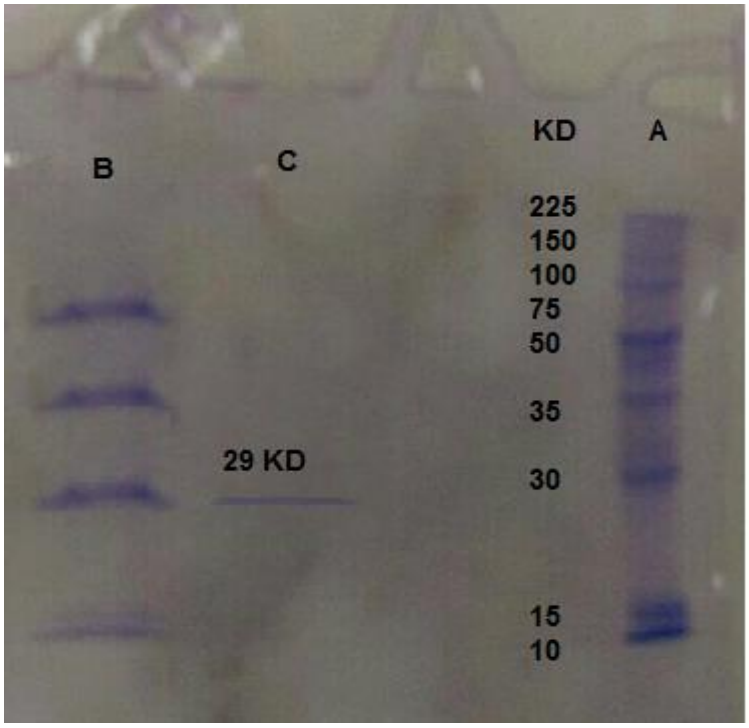
ترسيب بالايتانول

بينما توصل Gautam وزملاؤه (2016) إلى إمكانية تنقية إنزيم PG المنتج من الفطر *Aspergillus fumigatus* بالترسيب بالأسيتون 60% ثم الترشيح الهلامي باستعمال هلام Sephadex G-100 وكانت الحصيلة الإنزيمية 2.98 % و عدد مرات تنقية 18.43 مرة.

4-7-الفصل بالرحلان الكهربائي للبروتين باستخدام SDS-PAGE:

أجريت عملية التنقية الجزئية لإنزيم polygalacturonase(PG) حيث احتفظ بحجم 25 ميكروليتر من الأجزاء الناتجة عن كل مرحلة من مراحل التنقية في المجمدة عند درجة الحرارة −20° م ، بعدها أجريت عملية الرحلان الكهربائي لهذه الأجزاء كما في الشكل (31) حيث يبين المسار (A) نتائج الرحلان الكهربائي لبروتينات معروفة الوزن الجزيئي، بينما يبين المسار (B) نتيجة الرحلان الكهربائي لعينة البروتين بعد الترسيب بالاستون المبرد، حيث

ظهرت مجموعة من الحزم ، أما المسار (C) فيبين نتيجة الرحلان الكهربائي لعينة البروتين بعد تنقيتها باستخدام هلام Sephacryl S-200 وقد ظهرت حزمة واحدة.

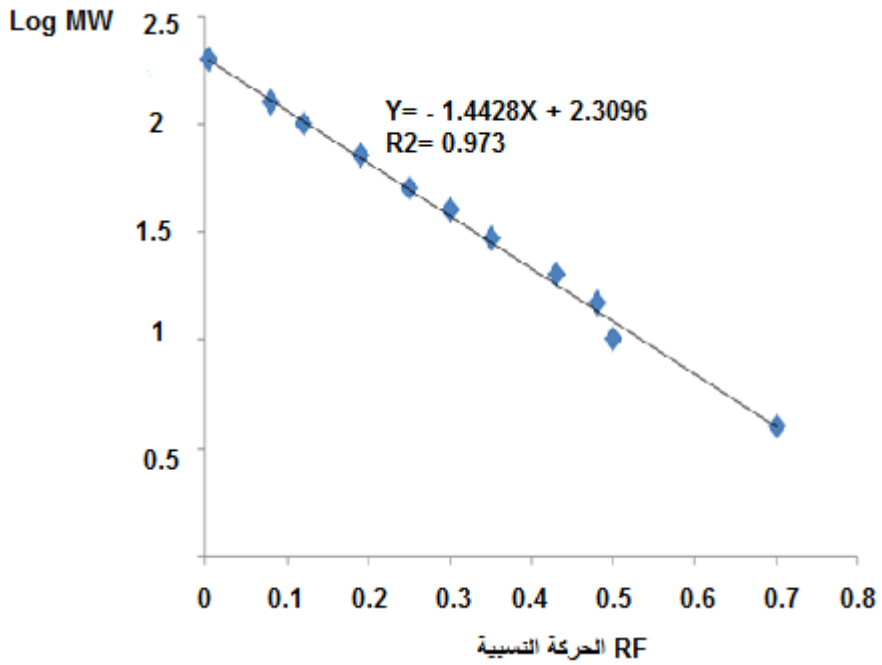


شكل (31) نتائج الرحلان الكهربائي للأجزاء الناتجة عن مراحل التنقية

و تظهر في الشكل(33) في المسار A الأوزان الجزيئية للبروتينات الناتجة التي حسبت كما يلي:

في البداية رسم المنحني القياسي لبروتينات معروفة الوزن الجزيئي الذي يربط بين قيمة الحركة النسبية RF وقيمة Log(MW) ، حيث RF يمثل نسبة المسافة التي قطعها البروتين إلى المسافة التي قطعتها الصبغة، بينما Log(MW) هو لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات معروفة الوزن الجزيئي 5– 250 كيلو دالتون.

يبين الشكل (32) المنحني القياسي الناتج . أجريت المواءمة الخطية وفقاً للمعادلة المبينة في هذا الشكل.



الشكل(32) المنحني القياسي الناتج عن الرحلان الكهربائي للبروتينات المعروفة الوزن على هلامة SDS-PAGE

حسب الوزن الجزيئي لكل حزمة في الشكل (الهلام) من خلال قياس نسبة المسافة التي قطعتها الحزمة إلى المسافة التي قطعتها الصبغة وتعويضها في معادلة المستقيم المبين في الشكل (35) وبالنتيجة أمكن حساب الوزن الجزيئي للإنزيم المدروس والتي بلغت 29 كيلو دالتون.

تباينت الدراسات في تقدير الوزن الجزيئي لإنزيم polygalacturonase(PG) وذلك تبعاً لاختلاف مصدر الإنزيم وطريقة القياس المتبعة، فقد بلغ الوزن الجزيئي لإنزيم PG المنتج من *Trichoderma harzianum* 29 كيلو دالتون (Saleh et al, 2009)، بينما وجد FANELLI وآخرون (2007) أن الوزن الجزيئي له بلغ 32 كيلو دالتون عند إنتاجه من *Trichoderma koningii*، كما أنتج إنزيم PG من *Rhizomucor pusillus* وتمت تنقيته باستخدام sephadex G200 وSephacryl S100 وكان الوزن الجزيئي له 32كيلو دالتون (Siddiqui *et al*, 2012). بينما كان الوزن الجزئي للإنزيم 66.2كيلو دالتون عند انتاجه وتنقيته ب DEAE-Sepharose FF من الفطر *Penicillium janthinellum* sw09 (Yuping *et al*, 2016). وفي دراسة أجراها Gautam وزملاؤه على إنتاج إنزيم PG من الفطر *Aspergillus fumigatus* كان الوزن الجزيئي للإنزيم 43 كيلو دالتون(Gautam *et al*,2016). وكان الوزن الجزيئي للإنزيم 60 كيلودالتون وذلك عند

انتاجه من *Penicillium citrinum* و تنقيته بالترسيب بكبريتات الامونيوم 75% ثم إجراء عملية ديلزة وبعدها استخدام عمود sephadex G100 (El-Batal *et al*, 2013).

4-8-نتائج ترويق عصير التفاح باستخدام إنزيم polygalacturonase المنتج من الفطر *Tri4*:

يبين الجدول (20) تأثير استخدام درجات حرارة وفترات تحضين مختلفة على ترويق عصير التفاح لدى معالجته بإنزيم polygalacturonase (1.5 %) بوجود الجيلاتين (0,01%) وذلك من خلال قيمة النفاذية على 650 نانومتر(T_{650}%)، حيث أعطت النتائج ترويق أفضل بزيادة درجات الحرارة المستخدمة ، فكانت أعلى نفاذية T_{650}% (80.1) عند درجة حرارة 50^0c بعد 5 ساعات تحضين. طابقت هذه النتائج بعض الدراسات السابقة حيث وجد Ishiiو Yokotsuka (1972) أن أفضل درجة حرارة كانت 55^0–50^0 c ، بينما خالفت Gupta الذي وجد أن أفضل حرارة لترويق العصير كانت 45^0c (Gupta *et al*, 2003).

جدول(20) تأثير كل من درجة الحرارة وزمن التحضين في الترويق الإنزيمي لعصير التفاح معبراً عنه بالنفاذية الضوئية على 650 نانومتر

مدة التحضين (ساعة)	النفاذية (T_{650}%)			
	30^0 س	**40^0** س	**50^0** س	**60^0** س
0	10.30 t	10.28 t	10.22 t	10.20 t
1	12.20 s	16.72 q	20.67 p	14.70 r
3	34.01 o	48.85 k	66.17 f	38.42 n
5	55.23 i	74.76 c	**80.1 a**	58.40 h

الأرقام التي تحمل أحرف مختلفة تدل على فروق معنوية عند مستوى ثقة ($p<0.05$)

كما درس التركيز الأمثل لكل من الإنزيم polygalacturonase والجيلاتين المستخدم في للحصول على أفضل ترويق لعصير التفاح وذلك ضمن الظروف المثلى التي وصل اليها البحث (حرارة تحضين50^0c لمدة 5ساعات) ، حيث تعتبر عملية الترويق بوجود المواد المجمعة للغرويات أكثر كفاءة، فهي مواد تحمل شحنة موجبة (+) مثل الجيلاتين التى تعادل شحنة المواد البروتينية والبكتينية العالقة بالعصير التي تحمل شحنة سالبة (−) فعند التعادل ينتج ترسب لهذه المواد يمكن فصلها بالترشيح والحصول على العصير رائق. كما أن عصير التفاح يحتوي طبيعيا على مواد عفصية تجعل الترويق بالجيلاتين أكثر كفاءة

حيث بينت النتائج أن استخدام التركيز 2.5% من الإنزيم وبوجود الجيلاتين بتركيز 0.015% أعطى أفضل درجة ترويق لعصير التفاح حيث كانت النفاذية (T_{650}% 83.41)، وهذا ماهو موضح في الجدول(21).

وأن ترويق عصير التفاح يكون أفضل بزيادة تركيز الإنزيم المستخدم وكذلك الجيلاتين، لكن الزيادة المفرطة في استخدام الجيلاتين تسبب عكارة للعصير فيما بعد التعبئة.

جدول(21) تأثير تراكيز من إنزيم polygalacturonase والجيلاتين في ترويق عصير التفاح معبراً عنه بالنفاذية الضوئية على 650 نانومتر

تركيز الإنزيم (%)	النفاذية T_{650}% نانومتر عند تركيز محتلفة من الجيلاتين (%)			
	0	0.01	0.015	0.02
1.0	26.35q	70.86g	73.52f	78.2e
1.5	33.20o	78.01e	79.36d	80.42c
2.0	41.6n	80.8c	81.4bc	82.16b
2.5	44.56m	82.17b	**83.41a**	81.21bc

الأرقام التي تحمل أحرف مختلفة تدل على فروق معنوية عند مستوى ثقة ($p<0.05$)

ففي دراسة أجراها Saleh وزملاؤه على استخدام إنزيم polygalacturonase المنتج من *Trichoderma harzianum* المنماة على قشور البرتقال في الصناعات الغذائية حيث توصلوا الى أهمية استخدام الإنزيم في ترويق عصير التفاح وزيادة مردود اعصير بنسبة 135% (Saleh *et al*, 2009).

وعلى ضوء النتائج السابقة أمكن الحصول على درجة جيدة من ترويق عصير التفاح باستخدام إنزيم polygalacturonase المنتج من الفطر *Tri4*بطريقة التخمير المغمور باستخدام قشور البرتقال كمصدر وحيد للكربون وذلك بوجود تركيز بسيط من الجيلاتين.

5- الاستنتاجات CONCLUSION

- صنفت 80 عزلة فطرية على مستوى الجنس وكانت تابعة للأجناس التالية *Penicillium* و*Aspergillus* و*Mucor* و*Trichoderma* و*Alternaria* و*Monilinia* و*Botrytis*
- أجريت غربلة أولية للعزلات الفطرية لإنتاج أنزيم Polygalacturonase فتفوقت الأجناس التالية *Penicillium* و*Botrytis* و *Aspergillus* و*Trichoderma*
- تفوقت العزلة Tri4 معنوياً على باقي العزلات المدروسة في انتاجها إنزيم Polygalacturonase حيث أعطت فعالية إنزيمية (157u/ml) ، وتعود هذه العزلة إلى الجنس الفطري *Trichoderma* ، تليها العزلةAsp1 التي أعطت فعالية إنزيمية (131u/ml) والتي تعود للجنس *Aspergillus*
- استخدمت ثلاث أنواع من المخلفات (قشور برتقال- قشور الموز- تفل التفاح) تبين أن أعلى فعالية إنزيمية للفطر *Tri4* كانت عند استخدام قشور البرتقال كركيزة للنمو حيث أعطت أكبر قطر للهالة الشفافة المتشكلة.
- حددت الشروط المثلى لظروف إنتاج إنزيم polygalacturonase بطريقة التخمير المغمورة من الفطر *Tri4* باستخدام قشور البرتقال كركيزة هي درجة الحرارة 30^0c ، pH =5 ، سرعة التهوية 150 دورة/دقيقة، تركيز الركيزة 3%، مدة التحضين 5 أيام. بينما كانت الشروط المثلى لإنتاج الإنزيم بالتخمير الصلب: الحرارة 28^0c ، pH =5 ، سرعة التهوية 150 دورة/دقيقة، نسبة الرطوبة الأولية65%، مدة التحضين 4 أيام.
- درست الصفات الفيزيوكيميائية لإنزيم polygalacturonase الخام المنتج من الفطر *Tri4*بالطريقة المغمورة
- أن درجة الحرارة المثلى لفعالية إنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri4* هي 55^0c حيث يعطي فعالية 330 U./Ml، كما احتفظ الإنزيم بـــ 95% من فعاليته بعد تسخينه على درجة حرارة 55^0c لمدة ساعة واحدة
- أن أفضل رقم حموضة لفعالية إنزيم polygalacturonase الخام المنتج من *Tri4* كانت في pH5 حيث كانت 360.4U./mL، كما بقي الأنزيم مستقراً بعد ساعة من تحضينه في المجال الحمضي pH4-5، ولوحظ تدهور في فعالية الإنزيم مع ارتفاع درجة حموضة الوسط وزيادة زمن الحضن.

- بينت النتائج أن لشوارد Ag^{+2} و Mn^{+2} دور منشط لعمل الإنزيم حيث ازدادت الفعالية بنسبة 37 و 10 % على التوالي، أما شوارد الحديد فقد لعبت دوراً مثبطاً حيث انخفضت الفعالية بنسبة 21%، كما كان لحمض الليمون أثر منشط لعمل الإنزيم الإنزيم حيث ارتفعت الفعالية بنسبة 41% لدى إضافته بتركيز 1mM.
- ازدادت فعالية الإنزيم مع ازدياد تركيز الركيزة و أعطى أعلى فعالية (330U./mL) عند تركيز 0.8ملغ/مل من PGA.
- أمكن تنقية الإنزيم باستخدام الترسيب بالحرارة والاسيتون المبرد و هلامة Sephacryl S-200، حيث كانت الحصيلة الإنزيمية للإنزيم المنقى 20.7% وبلغت عدد مرات التنقية 4.7 مرة
- تم تعيين الوزن الجزيئي لبروتين PG باستخدام SDS-PAGE وبلغ 29 كيلو دالتون.
- حددت الظروف المثلى لترويق عصير التفاح أنزيمياً بمعالجته بإنزيم polygalacturonase فكانت أعلى درجة ترويق عند درجة حرارة 50^0c بعد 5 ساعات تحضين و بالتركيز 2.5% من الإنزيم وبوجود الجيلاتين بتركيز 0.015%

6-التوصيات RECOMMENDATIONS

- متابعة العمل على تطوير إنتاج أنزيم Polygalacturonase باستخدام مخلفات زراعية وصناعية أخرى متوفرة ورخيصة الثمن.
- اختبار كائنات دقيقة أخرى منتجة للأنزيم وطرق تخمير أخرى
- الكشف عن المورثات المسؤولة عن إنتاج الأنزيم من هذا الفطر واستثمارها.
- الوصول إلى التنقية الكاملة للأنزيم و اختبار استخدام الأنزيم المنقى في الصناعات الغذائية.

7-المراجع

1) Abdel-Mohsen, S., Abo-Elmagd, H., and Housseiny, M. 2016. A safe potential juice clarifying pectinase from *Trichodermaviride*EF-8 utilizing Egyptian onion skins. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 14, 153–159.
2) Adesola, A., Oluwabunmi , A., and Grace , O. 2011. Extraction and clarification of apple juice with polygalacturonase obtained from apple (*Malusdomestica*) fruits deteriorated by *Aspergillusniger*. Int. J. Biol. Chem. Sci. 5(3): 1047-1053.
3) Adriana, B., Telma, E., Denise, B., Mauricio, M., and Jorge, A., 2002. Evaluation of filamentous fungi and inducers for production of endo-polygalacturonase by solid state fermentation.*Verlag der ZeitschriftfürNaturforschung*. 57:666-670
4) Agrios, G. 2005. Plant Pathology. 5th.*Elsevier Academicpress*.922p.
5) Ajayiو A. ,Osunkoya, A. ,Peter,. F., and Olasehinde. I.(2014). CLARIFICATION OF APPLE JUICE WITH BORATORYPRODUCED PECTINASE OBTAINED FROM THE DETERIORATION OF APPLE (Malusdomestica) FRUITS BY Aspergillusniger. International Journal of Advanced Biotechnology and Research . Vol5.Issue2. 2014.pp134-140
6) Akhilesh,T., Roma, P., Smarika, S., and Reena, G. 2010. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from Mucorcircinelloides ITCC 6025. Enzyme Res. Article ID 170549. 7 pages.
7) Akhter, N ., Morshed, A. , Uddin, A. , Begum, F. , Sultan, T., and Azad, A. 2011. Production of Pectinase by *Aspergillusniger*Cultured in Solid State Media, International Journal of Biosciences. Vol. 1. No. 1. p. 33-42.
8) Albersheim, P., Neukom, H. and Deuel,H.1960. Splitting of pectin chain molecules in neutral solution. Arch BiochemBiophys.90:46–51.
9) Alkorta, I., Garbisu, C., Llama,J., Serra, J. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: A review.Proc. Biochem. 33 (1),21-28.
10) Amand,T. and Adebayotayo, B..2012. Screening of new isolate soffungalstrains for polygalacturonase production in submerged .Innovative Romanian Food BiotechnologyVol. 11, 15-22

11) Amin, F., Bhatt, .H. and Asgher, M. 2017. Multiple Parameter Optimizations for Enhanced Biosynthesis of Exo-polygalacturonase Enzyme and its Application in Fruit Juice Clarification. International Journal of Food Engineering. Volume 13. Issue 2
12) .Anisa, S.K., S.Ashwini and K.Girish.2013.Isolation and Screening of *Aspergillus*spp.forPectinolyticActivity, *ElectronicJournalofBiology*, Vol9(2)37-41.
13) Anuradha, K., Padma,N., Venkateshwar, S. and Reddy, G., 2016. Mango juice clarification with polygalacturonase produced by *Aspergillusawamori*MTCC 9166 - Optimization of conditions. International Food Research Journal 23(1): 147-151.
14) Arijit, D. , Soura, B., Naimisha,V., and Sundar, S. 2013. Improved Production and Purification of Pectinase from *Streptomyces* sp. GHBA10 isolated from Valapattanam mangrove habitat, Kerala. India, *International Research Journal of Biological Sciences*.Vol. 2(3), 16-22.
15) Arotupin, D., Akinyosoye, F., Aandonif adi, A. 2012. Purification, Characterization and Application of Polygalacturonase from
16) *Aspergillusniger*CSTRF Malaysian Journal of Microbiology. 8(3). 175-183.
17) Atanda, S.A. , Pessu, P. O., Agoda, S., Isong I. U. and Ikotun. 2011. The concepts and problems of post-harvest food losses in perishable crops. African Journal of Food Science Vol. 5 (11) pp.603-6013
18) Basha, N.S., Rekha, R., Komala, M. and Ruby, S., 2009. Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme Lasparaginase from Marine Actinomycetes by Solidstate and Submerged Fermentation: Purification and Characterisation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8, 353-360
19) Bennamoun,L., Hiligsmann, S., Dakhmouche, S., Ait-Kaki, A., Labbani, F., Nouadri,T., Meraihi, Z., Turchetti, B., Buzzini, P., and Thonart,P. 2016. pH—Stable Exo-Polygalacturonase Using Aureobasidiumpullulans Isolated from Saharan Soil of Algeria Grown on Tomato Pomace. *Foods*. 5. 72
20) Bissett, C. 1992. Trichoderma parceramosum Can. J. Bot, 69, 2418-2420.

21) Bruhlmaum, F., kim,K., Zimmerman,W., and Fiechter, A. 1994. Pectinolytic enzymes from Actinomycetes for the degumming of ramie bastfibers. *Applied and Environmental Microbiology*.60:2107-2112.
22) Campbel, D. 2010. "The Pasteur Institute of Paris". American Journal of Veterinary Medicine (Chicago, Ill.: D. M. Campbell) 10 (1): 29–31. Retrieved February 8, 2010
23) Celestino, S., Freitas ,S., Medrano , F., De Sousa, M., Ferreira-Filho , E.2006. Purification and characterization of a novel pectinase from Acrophialophoranainiana. J Biotechnol; 123: 33-42.
24) Cho,S. and Lee, S. 2001. The X-ray structure of Aspergillusaculeatuspolygalacturonase and a modeled structure of the polygalacturonase– octagalacturonate complex. J MolBiol ,31(8):63–78.
25) Codner, R. 2001. Pectinolytic and cellulolytic enzymes in the microbial modification of plant tissues. J ApplBacteriol, 84:147–60.
26) David, B., Archer, I., Connerton,F. and Donald,A. 2008. Filamentous Fungi for Production of Food Additives and Processing Aids. *AdvBiochemEngin/Biotechnol*.111: 99 147
27) Davis, J.1964. Disc electrophoresis, II. Method and application to human serum proteins. J. Am. N. Y. Acad. Sci., 121: 404-427
28) Dalvi, P. and Anthappan, P. 2006. Amylase and pectinase from singl source for simultaneous desizing and scouring. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*. 32:459-465.
29) Debpali, S., Writuparna, D., Barnita, G. and Rina ,R. 2014. OPTIMIZATION OF BIOTECHNOLOGICAL PARAMETERS AND CHARACTERIZATION OF CATALYTIC PROPERTIES OF THERMOSTABLE POLYGALACTURONASE FROM A CHROMIUM TOLERANT STRAIN OF *TRICHODERMA PSEUDOKONINGII* , Innovative Romanian Food Biotechnology.Vol. 14,P: 54-60
30) Delabona, P., Pirota, R.D.P.B., Codima, C.A., Tremacoldi, C.G., Rodrtgues, A., and Farinas, C.S. 2013. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus*strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. Ind. Crops Prod.42, 236–242.

31) Dolan, E., 2008. *Education outreach and public engagement*. New York Springer Verlag. page 37
32) Dunleavy, J. and Fogarty, W. 1971. Proceedings of the British Wood Preserving Association. 21st.Camdridge: Annual Conference.
33) Elad, Y., Vivier, M., Fillinger, S., 2015. the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems. Springer, Heidelberg, Germany, .Plant Pathol. 55, 155–177.
34) El-Batal, A., Osman, E. and Ibrahim, A. 2013. Optimization and characterization of polygalacturonase enzyme produced by gamma irradiated *Penicilliumcitrinum*.Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 5(1):336-347
35) Elgin, S., Flowers, S. and May, V., 2005. Modern genetics for all students: An example of a high school/university partnership. *Cell Biol. Educ*, 4, 32-34.
36) Feliziani, E., Santini, M., Landi, L., Romanazzi, G., 2013. Pre- and postharvest treatment with alternatives to synthetic fungicides to control postharvest decay of sweet cherry. Postharvest Biol. Technol. 78, 133–138.
37) Cao, J., Chen, S and Zhengand, L. 1992.Screening of pectinase producer from alkalophilic bacteria and study on it,s potential application degummines of ramie.*Enzyme and Microbial Technology*.14:1013-1016.
38) Gastavsson, J., Cederberg, C. and Sonesson, U. 2011. Global Food Losses and Food Waste.Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Rome.
39) Gautam , A., Sangeeta ,Y. and Dinesh ,y. 2016. Purification and characterization of polygalacturonase from Aspergillusfumigatus MTCC 2584 and elucidating its application in retting of Crotalaria juncea fiber. Biotech . 6:201
40) Gomes, J., Zeni, J., Cence,K., Taniqzzo,G., Treich, H . and Valduduga, E. 2011. Evaluation of production and characterization of polygalacturonase by *Aspergillusniger* ATCC 9642. Chemical Engineers. Volume 89. Issue 4. Pages 281–287.

41) Grajek, W. 2009.Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by TrichodermavirideTS in solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology .Volume 9. Issue 11, Pages 658-662.
42) Hande, D., Nihan,G., Canan,T., Doreen,H. and Marcelo,L.2012. Optimization of the process parameters for the utilization of orange peel to produce polygalacturonase by solid-state fermentation from an *Aspergillussojae*mutant strain. Turk J Biol. 36: 394-404.
43) Hande, D. and Canan. 2014. Valorization of wheat bran for the production of polygalacturonase in SSF of *Aspergillussojae*.Industrial Crops and Products. Volume 54. Pages 302–309.
44) Harman, G. and Hayes, C. 1993. The Genetic Nature and Biocontrol Ability of Progeny from Protoplast Fusion in *Trichoderma*. In: Chet, I. *Biotechnology in Plant.* Disease Control. Wiley-Liss, New York. 237-255.
45) HEDRICK,J . AND SMITH, A. 1968. Determination of the molecular weight of proteins by electrophoresis in slab gels with a transverse pore gradient of crosslinked polyacrylamide in the absence of denaturing agents. Arch BiochemBiophys 126: 155-164.
46) HEERD, D., YEGIN, S., TARI, C., AND FERNANDEZ-LAHORE, M. 2012.Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. Insolid-state fermentation: A comparative study. Food Bioproduct Processing 90, 102–110.
47) Hodges, R.J., ,.Buzby, J.C, Bennett, B. 2011. Postharvest losses and waste in developed and less developed countries: opportunities to improve resource use. Journal of Agricultural Science. (149), 37-45, . © Cambridge University Press 2010.
48) Ikram, H. and Sikander, A. 2007. *Kinetics Of Invertase Production By Saccharomyces Cerevisiae In Batch Culture.* Institute of Industrial Biotechnology.GC University. Lahore.Pakistan.
49) Iwuagwu, C., Mbah, N. and Nwogboga, C.2014. Identification and control mycopathogens associated with storage of five horticultural produce in evaporative coolant-vegetable basket. European Journal of Biotechnology and Bioscience. 2 (2): 24-27

50) Jacob, N., Asha, C. and Prema, P. 2008. Purification and partial characterization of polygalacturonase from Streptomyces lydicus. Bioresour Technol. 99(14):6:697-701
51) Jaklitsch, W. M. 2009. European species of Hypocrea Part I. The green-spored species. Stud Mycol 63:, 1-91.
52) Jones, M., Anderson, J. and Albersheim, P.1972. Hostpathogen interactions IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by Fusariumoxysporum f. sp. Lycopersici. Physiol. Plant Pathol. 2, 153-166.
53) Jayani, R., Saxena, S. and Gupta, R. 2005. Microbial pectinolyticenzymes: Areview. *Process Biochem*. 40:2931-2944.
54) Kashyap, D., Vohra, P., Chopra, S. and Tewari, R. 2001. Application of Pectinases in Commercial Sector: A Review. *Bioresour Technol*. 77:215-227.
55) Klug, G., Schnitzhofer, W., Vršanská, M., Weber, J., Agrawal, P. B., Nierstrasz, V. A., andGuebitz, G. M. 2006. Purification and characterization of a new bioscouringpectatelyase from< i> Bacillus pumilus BK2</i>. Journal of biotechnology, 121(3), 390-401.
56) Kuhad, R., Gupta, R. and Singh, A. 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. Volume 2011. Article ID 280696. 10 pages.
57) Kumar, S.2015. Role of enzymes in fruit juice processing and its quality enhancement, *Institute of Food Technology*. 6(6):114-124.
58) **a-** Kusuma, M . and Reddy,D. 2014. Purification and Characterization of Polygalacturonase using Isolated Bacillus subtilis C4. Research Journal of Biotechnology. 9(2):95-103 .

b- Kusuma, M. and Reddy, D. 2014. Optimization of Polygalacturonase using isolated *Bacillus subtilis*C4 by submerged fermentation. Journal of Pharmacy Research .8(2),106-112.
59) Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
60) Ladjama, A., Taibi, Z. and Meddour,A. 2007. Production of pectinolytic enzymes using St using Streptomyces strains isolated from palm soilinbiskra area (Algeria). *African Crop Science Conference Proceedings* .8:1155-1158.

61) Lang, C., Dornenburg, H. 2000. Perspectives in the biological function and the technological application of polygalacturonase .ApplMicrobiolBiotechnol . 53: 366-75.
62) Lima,A., Silva,T., Maller,A., Jorge,G., Terenzi,H. and Polizeli,M. 2010. Purification and Partial Characterization of an Exo-polygalacturonase from Paecilomycesvariotii Liquid Cultures. ApplBiochemBiotechnol, 160:1496–1507
63) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biolchem.* 193, 265-275
64) MAGDA A,M., ABD-EL-HADY M., EL-SAYED M.S., MOHAMED O. EL-, WAFFAA G. ANDMOHAMED I. 2013. Purification and Characterization ofPolygalacturonases Produced by *Trichoderreesei*F418 using Lemon Peels and Rice Straw under Solid-State Fermentation. Journal of Applied Sciences Research. 9(4): 3184-3198
65) Mahdy, O., G. Shousha and Khonezy, E.2013. Purification and Characterization of Polygalacturonase Produced by *Trichodermareesei* F418 using Lemon Peels and Rice Straw under Solid-State Fermentation . Journal of Applied Sciences Research, 9(4): 3184-3198
66) Martins, E., Leite, R., Silva, R. and Gomes,E. 2013.Purification and Properties of Polygalacturonase Produced by Thermophilic Fungus Thermoascusaurantiacus CBMAI-756 on Solid-State Fermentation,EnzymeResearch. Volume 2013 . Article ID 438645, 7 pages
67) Martins,E., Silva,D., Leite,R. and Gomes,E.2007. Purification and characterization of polygalacturonase produced by thermophilic*Thermoascusaurantiacus* CBMAI-756 in submerged fermentation. Antonie van Leeuwenhoek , 91: 291
68) Martos, A., Vazquez, F. , Benassi, F. and Hours, A. 2009. Production of Pectinases by *A. niger*: Influence of Fermentation Conditions, BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY. Vol.52, n. 3: pp.567-572.
69) McGinnis,M.R. 1980.Laboratory Hand Book of Medical Mycology. Academic Press.N.Y.P.523-587.

70) Miller,G. L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
71) Morton, R. 1950. Separation and purification of enzymes associated with insoluble particles. *Nature*. 166. 1092-95.
72) Muhammad, H., Ahmed,I., Anjum, M. and Irfan, M. 2011. Purification and Characterization of the kineticParameters of Cellulase Produced from Wheat Straw by *Trichodermaviride* under SSF and its Detergent Compatibility. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2, 149-156.
73) Nab, N., Asgher,A., Sheikh, M. and Asad, M.2003. PRODUCTION OF PECTINASE BY Trichodermaharzianum IN SOLIDSTATE FERMENTATION OF CITRUS PEEL. *Pak.* J. *Agri.* Sci., *Vol. 40(3-4*
74) Naderi, S. , Naghavi, N. and Shahanipoor, K. 2012. PECTINOLYTIC ACTIVITY OF *Aspergillusniger*ON PECTIC AGRICULTURAL SUBSTRATES. The 1th International and The 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture 26 – 27 April in Isfahan, Iran
75) Narie,K., Kevin, D. and Stephen, B., 2002. Comparative enzyme production by fungi diverse lingocellulosic substrates. *The Journal of Microbiology*. 40(3):241-244.
76) Nazneen, A., Alam, U .,Azim. B., Feroza,S., Tipu,T. and Abulkalam,A. 2011.Production of pectinase *Aspergillusniger*cultured solid state media. *International Journal of Biosciences*. 1(1):33-42.
77) Nihan, G., Ezgi, E. and Canan,T. 2015. Evaluation of agro-industrial wastes, their state, and mixing ratio for maximum polygalacturonase and biomass production in submerged fermentation. Journal Environmental Technology Volume 36. Issue 20. Pages 2657-2667 .
78) Niketan, D., Reshma,T., Kaushik ,J., Praveen ,S. and Deep,P. 2012. NTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC and TECHNOLOGY RESEARCH VOLUME 1, ISSUE 9.
79) Oncu, S., Tari, C. and Unluturk, s. 2007. Effect of Various Process Parameters on Morphology. Rheology and Polygalacturonase Production by *Aspergillussojae* in a Batch Bioreactor Biotechnology Progress. Volume 23. Issue 4 Pages 836–845

80) Okafor,A., Chinedu, S., Ebuehi,T and Okerenta, B. 2010.Pectinolytic activity of wild-type filamentous fungifermented on agro-wastes. African Journal of Microbiology Research. Vol. 4(24) pp. 2729-2734
81) Palomaki, T and Saarilahti, H. 1997. Isolation and characterization of new C-terminal substitution mutation affecting secretion of polygalacturonase in Erwiniacarotovora ssp. Carotovora. FEBS Lett. 400:122–6.
82) Rajendran, R., Karthik, S., Radhai, R., Rajapriya,P. and Balakumar,C. 2011. PRODUCTION AND OPTIMIZATION OF FUNGAL PECTINASE FROM *Fusarium*sp. *International Journal of Current Research.Vol. 33, Issue, 4, pp.254-258*.
83) Reda, A.,M.Hesham, A.Mahmoud and Z.Ebtisam.2008. Production of bacterial pectinase(s) from agro-industrial wastes under solid state fermentation conditions.Journal of Applied Sciences Research. 4(12):1708-1721
84) Rehman, H. and Qader, S. 2012. Polygalacturonase: Production of pectin depolymerising enzyme from *Bacillus licheniformis* KIBGE IB-21. Carbohydrate Polymers . Volume 90.Issue 1, 1 September 2012, Pages 387–391.
85) Rodriguez,C. and Sanroman, M .2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22 211-219.
86) Romanazzia,G., Smilanickb,J., Feliziania, E. and Drobyc,S. 2016. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops, Postharvest Biology and Technology.113 : 69–76.
87) Sakai, T. 1992. Degradation of pectins. In: Winkelmann G. editor.Microbial degradation of natural products. Weinheim: VCH, P. 57–81.
88) Salau, A. and Shehu, K.2015. An overview of the fungal diseases of vegetables in Sokoto State. Nigeria. Global Advanced Research Journal of Agricultural Science . Vol. 4(1) pp. 001-005
89) Saleh, A., Abdulrahman, Land Jalaluddin,A. 2013. Solid State Production of Polygalacturonase and Xylanaseby*Trichoderma* Species Using Cantaloupe and Watermelon Rinds. Journal of microbiology. 51, (5), 605-611

90) Saleh, A., Abdulrahman, L and Taha, A. 2009. Characterization of a Polygalacturonase from *Trichodermaharzianum* Grown on Citrus Peel with Application for Apple Juice. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3(3): 2770-2777.
91) Saleh, A.,Nevin,M., Ebtsam, N. and Roqaya, I. 2006. Biochemical characterization of an extracellular polygalacturonase from *Trichodermaharzianu.,* Journal of Biotechnology.127 :54–64.
92) 2014. Lemon juice clarification using fungal pectinolytic enzymes coupled to membrane ultrafiltration. *Food and Bioproducts Processing.*Volume 92.Issue 1, Pages 14–19
93) Sameh, M., Mohamed ,N., Salma, J., Semia, B., Manel. F and Semia, E. 2014. Lemon juice clarification using fungal pectinolytic enzymes coupled to membrane ultrafiltration. *Food and Bioproducts Processing.*Volume 92.Issue 1, Pages 14–19
111) Samson ,R.,E.Hoekstra ,J.Frisvad and Fiiltenborg, O.2000. Introduction to Food airborne fungi (5thed) . Bearn Netherlands CentraaebureauvoorSchimmel cultures.
112) Shashi, K., Anuja, V. and . 2013. Purification and physicochemical properties of polygalacturonase from *Aspergillusniger* MTCC 3323.Protein Expression and Purification. V:87. Issue 1, Pages 11–16.
113) Siddiqui, M., Pande, V. and Arif, M.2012. Production, Purification, and Characterization of Polygalacturonase from Rhizomucorpusillus Isolated from Decomposting Orange Peels. Hindawi Publishing Corporation Enzyme Research Volume . Article ID 138634, 8 pages.
114) Simb,A. 2009.The roleof pectinase enzyme in the development of soft rot Caused by Pseudomonas fluorecens in the purple variety of onions (*Alliumcepa*).*African Journal of Microbiology Researeh*. 3(4):163-167.
115) Sopuruchukwu, F. and Vinking, E. 2016. Production, Purification and Characterization of Polygalacturonase from Aspergillusniger in Solid State and Submerged Fermentation Using Banana Peels. Journal of Advances in Biology and Biotechnology. 10(1): 1-15
116) Subramaniyam, R. and Vimala, R. 2012. Solid State and Submerged Fermentation for the Production of Bioactive Substances: a Comparative Study. *International journal of science and nature*, 3, (3), 480-486.

117) Sudheer . Y., Varakuma, S. and Reddy, O.2010. Production and optimization of polygalacturonase from mango (Mangiferaindica L.) peel using Fusariummoniliforme in solid state fermentation .Journal of Microbiology and Biotechnology. Vol. 26 Issue 11, p1973.

118) Suresh, B. and T. Viruthagir.2010. Optimization and kinectics of pectinase enzyme using *Aspergillusniger* by solid-state Fermentation. Indian Journal of Science and Tecnology. 3(3):867-870.

119) Suresh, B., Viruthagiri, T. and Sasikumar, E. 2009. Optimization of process variables using Response Surface Methodology (RSM) in the solid-state fermentative production of

120) Tapati,D ., Sunita, A., Patrali .B and Rintu .B. 2014. Purification of polygalacturonase from *Aspergillusawamori*Nakazawa MTCC 6652 and its application in apple juice clarification. LWT - Food Science and Technology. Volume 59, Issue 1, Pages 591–595.

121) Thakur,A., Pahwa,B., Singh,S. and Gupta,R. 2010. Production, Purification.and Characterization of Polygalacturonase from Mucorcircinelloides ITCC 6025. SAGE-Hindawi Access to Research , Enzyme Research . Article ID 170549. 7 pages.

122) Thamer, A., 2013. EFFECT OF *FUNGAL* PECTINASES AND GELATIN ON APPLE JUICE CLARIFICATION. Mesopotamia J. of Agric. Vol. (41) No. (4).

123) Tortora, J., Funke, R. and Case,C. 2010. Microbiology An Introduction, San Francisco. CA 94111, USA: Pearson Benjamin Cummings. p. 135. *ISBN 978-0-321-58202-7*.

124) Venkatesh, M.and D., Girija. 2009. Micrbial pectinase from tropical fruit Wastes.Journul of Tropical Agriculture. 47(1-2):67-69.

125) Vibha, B. 2010. Exploitation of micro-organism for isolation and screening Of pectinase from environment. Globelics Innovation work for Society: Linking, Leveraging and Learnin. Malaysia.

126) Vivek, R. ,Rajasekharan, M., RavichandranK, R., Sriganesh. K. and Vaithees, V. 2010. Pectinase production from orange peel extraction and dried orange peel solid as substrates using *Aspergillusniger*.*International Journal of Biotechnology and Biochemistry*.6(3):445-453.

127) Wang, Y. 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research Journal*, 42, 8-12.

128) Wayne, M.**,** Ivana,V.**,** Verneta,L.**,** Wesley, M.**,** Bruce, D.**,** Wojciech,J. and William**, S.** 2010. Purification and Biochemical Characterization of Polygalacturonase Produced by *Penicilliumexpansum* During Postharvest Decay of 'Anjou' Pear . Biochemistry and Cell Biology. Volume 100, Number 1: Pages 42-48.

129) Wong, L. and Zuhainis,W. 2017. Optimization of cultural conditions for polygalacturonase production by a newly isolated Aspergillusfumigatus R6 capable of retting kenaf, Industrial Crops and Products . Volume 97. Pages 175–183.

130) Yannam,S., Shetty,P. and Obulum, V. 2014. Optimization, Purification and Characterization of Polygalacturonase from Mango Peel Waste Produced by *Aspergillusfoetidus*, *Food Technol. Biotechnol. 52* (3) 359–367.

131) Yuping,M., Siwen, S., Hui, H. and Chunping, X. 2016.Production, purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Penicilliumjanthinellum*sw09. Annals of the Brazilian Academy of Sciences. ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690

132) Zhong,C., Dong,C,Qingyan,W., Liang,X., Bo .L,Yutuo,W, Hongchi.T,Qixia.Z,Yunlai.C and Ribo. H.2017. Identification of an acidic endo-polygalacturonase from *Penicilliumoxalicum* CZ1028 and its broad use in major tropical and subtropical fruit juices production, Journal of Bioscience and Bioengineering ز Available online 21 February 2017.

Ministry of High Education
Damascus University
College of Agriculture
Department of Food Science

Ministry of Higher Education
National Commision
for Biotechnology

Production of Polygalacturonase by fermentation from fungal species causing fruit rots, and application in juice industry

Thesis submitted for PH.D. Degree in Food Science

Prepared by

Eng. Rasha Ata Daoud

Supervised by

Prof. Dr. Mohammad.Kher. Tahla **&** **Prof. Dr. Mohammad Fawaz. Azmeh**

2017