تحليل كوالح الذرة المعاملة بسلالات الفطر *Trichoderma* spp وبكتيريا *Cellulomonas* الى سكريات بسيطة وانتاج بروتين احادي الخلية

جبار فرحان المعاضيدي ومروى علاء هدب

كلية مدينة العلم الجامعة/ قسم علوم الحياة

الخلاصة:

يتجمع في العراقسنوياً آلاف الأطنان من كوالح الذرة الصفراء ذات المحتوى العالي من المواد السليلوزية والتي بالامكان استخدامها لانتاج كميات كبيرة من السكريات الاحاديةوالثنائية واستخدامها لتنمية الخميرة وانتاج بروتين احادي الخلية (SCP). استخدمت احياء منتجة لانزيم السليليز، سلالات الفطر *Trichoderma spp.* و بكتريا *Cellulomonas* . تم تقدير فعاليتها الانزيمية والتركيز المناسب من الكوالح المطحونة لانتاج اعلى تركيز من السكر وامكانية استخدامه في تنمية الخمائر وانتاج البروتين احادي الخلية.بينت النتائج ان الفطريات اكثر كفاءة من البكتريا في تحليل كوالح الذرة وانتاج السكريات البسيطة خلال فترة حضانة اقصاها تسعة ايام من نمو الفطر في المزارع الغاطسة والسطحية الا انها لم تكن ذات كفاءة باستخدام المخمر.الانزيم المفروز من قبل البكتريا ناتج بتاثير الحث وكان تصاعدياً .تم استهلاك السكر من قبل الخميرة في تجارب المخمر وانتاج بروتينات احادي الخلية (SCP)والحصول على 14.3٪ بروتين وخفض نسبة الالياف من41.7٪ الى 10.9٪ وجعلها مناسبة لتغذية المجترات والاسماك.

Sacchrification of Corn Cobs by Cellulases Producer by *Trichoderma SPP*. and *Cellulomonas* and Production of SCP

Jabbar, F. Al-maadhidi and Marwa, A. Hadab

Madenat Alelem University College/ Department of Biology

Abstract:

Thousand tons of corn cobs were accumulated yearly in Iraq, which are rich in cellulose and poor in protein. The sacchrification of corn cobs can be used for cultivation of yeast and production of single cell protein (SCP). Two microorganisms producing cellulases were used for conducting experiments, *Trichoderma spp*. and *Cellulomonas*. The most productive strain of *Trichoderma spp*. was chosen after assaying all isolates. Results revealed that fungal isolates was more efficient in producing sugar from corn cobs than bacteria. Maximum concentration of sugar was produced by fungal culture after nine days of incubation time in surface and submerged culture, while it was not efficient in fermenter. Cellulases were induced to release from bacterial cells and increased with incubation period. Fermenter experiment showed the ability of yeast to utilize sugar produced from corn cob leading to increase protein content to 14.3٪ and fibers was reduced from 41.7٪ to 10.9٪ which became more suitable for feeding ruminants and fish.

Keywords: Corncobs, Cellulases, Cellulomonas, *Trichoderma* spp.

المقدمة

تعد المخلفات الزراعية السليلوزية مصادر اولية للكثير من العمليات البايولوجية باستخدام التقنيات الاحيائية الحديثة، حيث يمكن تحويلها الى مركبات ومواد ذات قيمة اقتصادية في القطاعين الزراعي والصناعي.

تتراكم في العراق سنوياً آلاف الاطنان من كوالح الذرة الصفراء ذات المحتوى العالي من الموادالسليلوزية ينحصر استخدامها في الوقت الحاضر كمواد مالئة في عليقة الحيوانات المجترة وكبديل عن نشارة الخشب المستخدمة في فرش ارضيات قاعات تربية الدواجن .ان طبيعة هذه الاستخدامات تعتبر هدراً لمواد اولية ذات قيمة اقتصادية عالية.ان التحليلات الاولية لكوالح الذرة الصفراء بينت انها غنية بالمواد السليلوزية وفقيرة بالمحتوى البروتيني [1]، مما يتطلب معالجتها اما كيميائيا او بايولوجياً لتقليل نسبة الالياف وزيادة نسبة البروتين لغرض جعلها صالحة لتغذية المواشي والاسماك والدواجن.ان معاملة كوالح الذرة الصفراء على مرحلتين كيميائية مع NAOH (1 N) وبايولوجياً يؤدي الى خفض الالياف بنسبة 82٪ وزيادة نسبة المحتوى البروتيني من 2.4٪ الى 16.3٪ [2]. ان استخدام كوالح الذرة المعاملة كيميائياً وبايولوجياً في عليقة الحملان العواسي بنسبة5 و 10٪ بديلاً عن الشعير حقق زيادة معنوية في الوزن الكلي والنمو اليومي ولم يكن له تاثير على الصفات البايوكيميائية والدمية [3]، كما حققت زيادة معنوية في محيط كيس الصفن وطول وقطرالحصى ولم يكن لها تاثير معنوي على الهرمونات الجنسية[4]. ان التخمرات الهوائية الصلبة لمسحوق الكوالح حققت زيادة معنوية في البروتين الخام، بينما حققت التخمرات اللاهوائية زيادة في نسبة السكريات البسيطة [5]. وبالامكان استخدام كوالح الذرة كمصدر لسكر الكلوكوز في عمليات التخمر التي تهدف الى انتاج مواد ذات قيمة اقتصادية مثل حامض اللاكتيك بواسطة البكتيريا *Lactobacillus delbrukii* [6] .

يهدف البحث الى توظيف الاحياء المجهرية المنتجة لانزيم السليليز في تحليل المحتوى السليلوزي لكوالح الذرة وتحويلها الى مركبات سكرية بسيطة يمكن استخدمها من قبل الخميرة لانتاج بروتين احادي الخلية (SCP).

المواد وطرق العمل

- السلالات المايكروبية:

استخدم في هذه الدراسة نوعين من الاحياء المجهرية المنتجة لانزيم السليليز :

أ. عزلات محلية من الفطر *Trichodermaspp* تم عزلها من مناطق مختلفة من العراق ثم نقيت وشخصت وحفظت على الوسط الزرعي PDA .

ب. بكتريا *Cellulomonas* تم الحصول عليها من البنك الامريكي للسلالات المايكروبية (ATCC).

- كوالح عرانيص الذرة كمصدر كاربوني:

تم جمع النماذج من معامل تفريط الذرة الصفراء، قطعت وجففت بدرجة حرارة 100 C° لمدة 24 ساعة وبعد ذلك سحقت بحجم 1mm باستخدام طاحونة كهربائية، تمت ازالة مادة اللكنين وذالك بمعاملتها مع (1N) من محلول هيدروكسيد الصوديوم لمدة 30 دقيقة و استخدم في تنمية الاحياء المجهرية المعتمدة في البحث.

.

- تقدير فعالية انزيم السليليز :

نميت السلالات الفطرية والبكتيرية على اوساط زرعية سائلة حاوية على مادة كاربل مثل سيليلوز (CMC) كمصدر كاربوني. لقحت الاوساط الزرعية المعقمة وحضنت في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 28 C° وسرعة تحرك 150 دورة/دقيقة. تم سحب عينات بصورة دورية لمدة 31 يوم لقياس كمية السكر الناتجة من تحليل الـ CMC بفعل انزيم السليليز.

- تحديد التركيز الامثل من كوالح عرانيص الذرة:

حضر عالق كوالح الذرة بتراكيز 0.5٪ ,1.0٪, 1.5٪, 2.0٪, 2.5 ٪ , 3.0 ٪ , 3.5٪ في الوسط الزرعي المناسب لتنمية الفطر *Trichoderma spp.* عقمت الحواجل الزجاجية

بالحرارة الرطبة (ضغط Lb/cm^2 1.5ودرجةحرارة C^o 121ولمدة 30 دقيقة) لقحت بعالق سبورات الفطر ووضعت في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة C^o 28 وسرعة تحريك 150 rpm. اخذت عينات لمدة 16 يوم من الوسط السائل لتحديد تركيز سكر الكلوكوز المختزل المتحرر بفعل انزيم السليليز باستخدام الطريقة اللونية.

- تأثير اضافة النشاء على النشاط الانزيمي:

اضيف النشاء بتركيز 1٪ الى الوسط الزرعي الاساسي الحاوي على تركيزين من مسحوق كوالح الذرة 1٪ و 2٪ المعامل بـ (1N) من محلول NaOHوالغير معامل. لقحت الحواجل بعالق بكتريا السليليومونس ووضعت في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 28c°وسرعة تحرك 150 rpm. أخذت عينات من الجزء السائل للوسط الزرعي لمدة 7 ايام. تم قياس تركيز سكر الكلوكوز المختزل المتحرر في الوسط الزرعي نتيجة فعل انزيم السليليز المنتج من قبل البكتريا باستخدام المطياف الضوئي على طول موجي مقداره 550 µm.

تحليل كوالح الذرة باستخدام المخمر:

استخدم مخمر سعة 10 L نوع Keel في تنفيذ تجارب تحليل كوالح الذرة لتحرير السكريات البسيطة. حضر 8 L من عالق الوسط الزرعي الحاوي على كوالح الذرة بتركيز 5٪ في الوسط السائل. عقمت حاوية المخمر مع الوسط الزرعي في الموصدة. اضيف عالق البكتريا البادىء *Cellulomonas* الى المخمر بعد عملية تبريد الوسط الزرعي الى25c. استخدمت لوحة السيطرة الالكترونية للمخمر في تحديد درجة الحرارة 28c° ، الـPH 7.0، التهوية 12 قدم/دقيقة والتحريك 150rpm. اخذت عينات كل 24 ساعة على مدى 8 أيام لقياس سكر الكلوكوز المختزل المتحرر بفعل انزيم السليليز باستخدام الطريقة اللونية.

انتاج بروتين احادي الخلية (SCP):

نفذت التجربة في مخمر سعة 16 L نوع Keel . استخدم 10L من عالق كوالح الذرة بنسبة 5٪ الناتج من تجربة تحليل كوالح الذرة مضافاً اليه 5g/L يوريا + 18 ml/Lمولاس(50٪ وزن جاف). اضيف عالق الخميرة (2.5 غم+7 غم سكر +500 ml ماء مقطر) المنمى لمدة 12ساعةالى المخمر. نميت الخميرة لمدة 72 ساعة. جرى قياس: استهلاك السكر في المخمر كل 24 ساعة ، التغييرات على الـ pH والفحص المجهري. في نهاية التجربة جرى قياس نسبة البروتين وألياف السليلوز في المنتج الجاف.

النتائج والمناقشة

جرى اختبار فعالية السلالات المايكروبية (بكتريا + فطريات) في قدرتها على فرز انزيم السليليز وتحليل الـ CMC كمصدر سليلوزي لتحديد السلالات الاكثر فعالية . بينت النتائج الموضحة في الجدول (1) ان السلالات العائدة للفطر تريكودرما متفاوتة في فعاليتها الانزيمية. بعد فترة نمو لمدة 24 يوم وجد ان جميع العزلات كانت متساوية في فعاليتها الانزيمية باستثناء السلالات رقم 3 ,8 ,9 حيث كانت الاكثر فعالية بعد 8 أيام من النمو وجميعها معزولة من منطقة بيئية واحدة (شمال غرب العراق). ان تمديد فترة النمو الى 31 يوم أدى الى تساوي الفعالية الانزيمية لكافة السلالات الفطرية المدروسة.أما بكتريا *Cellulomonas* فان فعاليتها الانزيمية كانت بعد 48 ساعة ولم تلاحظ فروقات معنوية في الفعالية بعد 96 ساعة(جدول رقم –1). كانت الفعالية الانزيمية للسلالات الفطرية أربعة اضعاف الفعالية الانزيمية للبكتريا مما يعطيها الارجحية في تحليل المواد السيلوزية وانتاج السكريات البسيطة اخذين بنظر الاعتبار عامل الزمن المستغرق لكلا النوعين لتحرير الكمية المطلوبة من السكر اللازم لتنمية الخمائر وانتاج البروتين الاحادي. لغرض الحصول على اعلى كمية من السكر الناتج من تحلل كوالح الذرة استخدمت تراكيز مختلفة من كوالح الذرة وقد جرى

تحديد التركيز الامثل الذي يعطي اعلى كمية من السكريات البسيطة اللازمة لتنمية الخمائر وانتاج بروتين احادي الخلية بعد اختبار العديد من التراكيز مع الفطر *Trichoderma spp*. بينت النتائج الموضحة في جدول (2) ان كمية السكريات البسيطة المتحررة تتناسب طرديا مع الزيادة في تركيز الكوالح المستخدمةحيث كانت اعلى كمية مع التركيز 3٪ ، وبعد 9 ايام من النمو للفطر كان اعلى تركيز قد تحقق مقارنة ببقية التراكيز المستخدمة، في حين كان التركيز 5٪ قد حقق اعلى انتاجية من السكريات لنفس الفطر بدرجة حرارة 32c° و (5-6) PH ، [7]. لم تحدث اية زيادة في كمية السكر مع استمرار عملية التمية حتى 16يوم وعليه فان فترة حضن 9ايام كانت الافضل في تحرير السكريات البسيطة بواسطة انزيم السيليز المنتج من الفطر *Trichoderma spp*-3ومن الممكن اعتماد هذه النتيجة في التجارب التطبيقية اللاحقة، وقد تمكن [8] من الحصول على اعلى تركيز من انزيم السليليز بعد فترة حض ن امدها 4 أيام من الفطر *Alternaria alternata* طريقة التخمير الصلبة وكوالح الذرة كمصدر للسليلوز.

لم يكن هناك تاثير لاضافة 1٪ نشاء الى الوسط الزرعي على النشاط الانزيمي لبكتريا السليليومونس فلم تحدث أي زيادة في كمية السكر المتحرر من الكوالح المستخدمة في التجربة المعاملة بهيدروكسيد الصوديوم NaOH (1N) أو الكوالح غير المعاملة.ان استخدام المخمر في تجربة انتاج السكريات البسيطة من كوالح الذرة بعد تلقيحها بعالق بكتريا السليليومونس اوضحت ان اعلى انتاجية للسكر كانت بعد 8 ايام من بدء التجربة (جدول 3)، لقد كانت عملية فرز الانزيم من البكتريا بتاثير الحث كونها عملية تصاعدية، فكلما طالت فترة النمو(4ايام) تعزز تركيز الانزيم وحصلت زيادة في السكريات المتحررة. لم يتحقق نجاحيذكر في استخدام الفطر *Trichoderma spp*-3 في تجربة المخمر، وهذا يعود الى ان عملية الخلط قد ادت الى فقدان الفطر القدرة على انتاج الانزيم نتيجة تقطع الغزل الفطري بفعل المراوح والاقراص الدوارة للمخمر وحالات الضرر التي تحدث لخلاياه مما يؤدي الى عدم امكانية استخدام الفطر في المزارع الغاطسة. لقد استخدمت كوالح الذرة في انتاج مواد مهمة وذات قيمة اقتصادية حيث تم الحصول على انتاجية عالية من انزيم endoglucanase عند تنمية الفطر *Arachinotus spp*. على 7٪ من مسحوق كوالح الذرة كمصدر سليلوزي [9].

بينت نتائج استخدام السكر المتحرر من كوالح الذرة في انتاج بروتين احادي الخلية في مخمر سعة 16L وبكتريا السليليومونس في المرحلة الاولى وخميرة الخبز *Saccharomyces cerevise* في المرحلة الثانية،ان كمية السكر المتحرر قد تم استنفاذه من قبل خميرة الخبز بعد 72 ساعة من النمو(جدول 4)وان نسبة البروتين في المنتج النهائي كانت 14.3٪ مقارنة مع الاصل 2.4٪ مما يعني تحقيق زيادة بمقدار ستة اضعاف ما كان موجوداً في كوالح الذرة الغير معاملة كما انخفضت نسبة الالياف من 41.7٪ الى 10.9٪ نتيجة المعاملة.لم يتغير تركيز الاس الهيدروجيني (pH) خلال فترة تنفيذ التجربة ، فقد حافظ على درجة حموضة (4.8) المناسبة لنمو الخميرة،مما يعني امكانية استخدام كوالح الذرة في انتاج بروتين احادي الخلية مناسب لتغذية المجترات والاسماك نظراً لما تحتويه الكوالح المعاملة من نسبة عالية من البروتين تفوق النسبة الموجودة في الشعير الذي هو المادة الاساس في علائقها (3,4). وان انخفاض محتوى الكوالح من الالياف يجعلها ملائمة وغير مضرة عند استخدامها في العليقة.

جدول رقم 1. اختبار فعالية انزيم السليليز لعزلات الفطر *Trichodermaspp.* وبكتريا *Cellulomanas* المنماة على CMC كمصدر سليلوزي كربوني.

Incubation time/day / Micro.Strains	Saccharide conc. (O. D. at 550 nm)				
	8	16	17	24	31
Trichoderma spp					
1	1.1	2.8	2.7	4.1	10.4
2	0.01	2.5	2.5	3.8	9.0
3	3.7	3.3	3.2	4.4	10.7
4	0.6	2.0	2.1	3.2	10.8
5	1.4	2.8	2.9	3.7	9.6
6	2.9	4.9	4.7	5.7	9.9
7	2.8	2.7	4.1	4.8	8.2
8	3.1	3.3	4.5	4.7	7.4
9	3.2	3.2	4.7	5.0	10.1
Bacteria	2 days	4 days			
Cellulomonas	0.854	0.909			

جدول 2. استخدام تراكيز مختلفة من مسحوق كوالح الذرة الصفراء لتحديد التركيز الامثل لفعالية انزيم السليلوليز للفطر *Trichoderma spp*.

Incubaction time/day / C.C.concent. g/100ml	Saccharide conc. (O. D. at 550 nm)					
	0	3	6	9	13	16
0.5	0.2	0.3	0.9	0.8	0.5	0.4
1.0	0.9	0.9	1.6	1.9	2.2	2.3
1.5	1.3	1.4	2.5	3.1	3.7	4.3
2.0	2.0	2.2	3.4	4.0	5.2	5.8
2.5	2.4	2.3	3.6	6.2	6.8	7.4
3.0	3.0	2.8	3.7	7.4	7.6	7.4

جدول 3. تحليل المحتوى السليلوزي لكوالح عرانيص الذرة الى سكريات بواسطة بكتريا *Cellulomonas* باستخدام جهاز التخمير.

Fermentation Time/day	Saccrification (O.D)	
	Blank	Inoculated
1	11.1	10.9
2	11.5	11.8
3	10.5	12.3
4	-	13.0
6	10.3	14.3
7	10.6	16.5
8	10.1	16.7

جدول 4. انتاج بروتين احادي الخلية (SCP) من السكريات البسيطة الناتجة من كوالح الذرة المعاملة كيميائياً وبايولوجيا .

72 hrs.	24 hrs.	Zero time	المعاملة
0.278	1.812	2.310	نسبة السكر في الوسط الزرعي
4.76	4.83	4.85	PH
14.3		2.4	نسبة البروتين
10.9		41.7	نسبة الالياف

References:

1. Jabbar F. Al-maadhidi, Mustafa T. Al-khatib, ShaimaaR.Farhan and Huda Fahim.(2010), Effect of different nitrogen sources supplement on final crude protein yield from fermented corn cob. J.Madenat al-elem Collegee, Vol.2, No,1 pp.: 25-31.

2. Jabbar F. Al-maadhidi and Mustafa T. Al-khatib. (2010),Degistion of fiber and increased crude protein in corn cob. J.Madenat al-elem Collegee, Vol.2, No,2 pp.: 28-29.

3. Abdoljabbar Alkhazraji, Jabbar F. Al-maadhidi and S. Abu-tabigh (2012). Effect of biological treated corn-cobs in growth, some hematological and biological aspects in Awassi Mail Lambs. ICESB, Vol. 48, pp.:33-36.

4. A.A. Al-khazragi, A. H. Kuttar, M. T. Al-temimiandJabbar F. Al-maadhidi. (2009).Effect of substitution gradually percentages of chemical and microbial treated corn-cobs with barley and some performance traits in Awassi Lambs. Iraqi J. of Agric. Vol 4, pp.:41-47.

5. Gang-neng, W. Ai-min, L. Han-wen and X. Xian-lin (2010). Preliminary study of fermented feed with corn-cob. Huber Agricultural Science, Vol. 2, pp.: 1-3.

6. Z. Ali, F. M. Anjum and T. Zahoor (2009). Production of lactic acid from corn cobs hydrolysesthrough fermentation by *Lactobacillusdelbrukii*. African J. Biotech., Vol. 8, pp.: 4175-4178.

7. AliNagham,Yazaji Sabah, Hajali A. and Azmeh M. F. (2010). Optimization of cellulase production by submearged fermentation of agriculture wastes by *Ttrichoderma spp*.Sy/acchive/docs/file/ICRE, Vol. 8, No5 ICRE.

8. A. Ijaz, Z. Anwar, Y. Zafar, I. Hussain, A. Muhammad, M. Irshad and S. Mehmood (2011). Optimization of cellulaseenzyme produced from corn cobs using *Alternaria atternata* by solid state fermentation. J. Cell and MolcularBioloy, Vol. 9, No. 2, pp.:51-56.

9. Asgher, M., Yaqub M.,Sheeikgh M. A and A. R. Barque (1999). Effect of culture condition on cellulose production by *Arachniotus Sp.*, Pak. J. Agric.Sci, Vol. 36, pp.: 3-4.