CC BY

College of Basic Education Research Journal

www.berj.mosuljournals.com

A Study of effect of different agricultural conditions on production of enzyme mannanase from fungal isolate *Lentinula edodes*

Noor Alaubidi
Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, University of Mosul, Mosul, Iraq
Faten Noori Abed Husien Mula Abed
Department of Life Sciences, College of Science, University of Mosul

Article Information

Article history:
Received: January 30,2025
Reviewer: March 4,2025
Accepted: March 4,2025
Available online

Keywords:
Mannanase enzyme , Lentinula edodes, agricultural conditions

Correspondence:

Abstract

Shiitake mushroom,scientically known as *Lentinula edodes*, is a white-rot fungus with significant medical and industrial importance ,particularly for being source of mannanase enzymes. Both natural and synthetic mannans are used in its mannan form, which contains substances that stimulate use of β-mannanase in industrial applications due to its multifaceted properties . An isolate of *Lentinula edodes* was obtained from Al-Waduk Company for Fungal Production and Cultivation in Baghdad. Preliminary screening revealed its ability to produce mannanase enzyme, indicated by a clear zone of hydrolysis measuring 14.6mm in diameter. This isolated was cultivated on LBG medium, yielding an enzyme activity of 2.38 units/ml.

Cultivation studies demonstrated that submerged fermentation reported highest enzyme activity after 9 days of incubation, reaching 2.94 units/ml. this was determined to be the optimal incubation period under the following conditions: 30°C , LBG as carbon source, 0.4% yeast extract as nitrogen source, pH 6, and an agitation rate of 150 rpm. Additionally, supplementation of culture medium with acacia seeds as a natural compound AL_2O_3 significantly enhanced enzyme production.

ISSN: 1992 – 7452

دراسة تأثير ظروف زراعية مختلفة على انتاج انزيم Mannanase من العزلة الفطرية *Lentinula edodes*

نور عامر محمد علي **فاتن نوري عبد ملا**

(قسم علوم الحياة كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة الموصل) **(قسم علوم الحياة كلية العلوم جامعة الموصل)**

الملخص:

الفطر الشـــيتاكي او الأشـــم الشـــائع الياباني*Lentinula edodes* وهو احد فطريات العفن الأبيض ذي الأهمية الطبية والصناعية والمفرز للانزيمات المحللة للمانان. والمانان الطبيعي او الصناعي يستعمل بصيغة المانان والذي يحتوي على مواد تحفز استعمال Mannanase- β في التطبيقات الصناعية بسبب خواصه المتعددة الأوجه. تم الحصول على عزلة الفطر *Lentinula edodes* من شـركة الودق لإنتاج وزراعة الفطريات/بغداد وخضـعت لاختبار الغربلة الاولية لمعرفة قابليتها على انتاج انزيم Mannanase بدلالة قطر هالة التحلل الانزيمي بقطر هالة تحلل بلغت 14.6ملم ونميت هذه العزلة على وســط الانتاج LBG ، وبلغت الفعالية الانزيمية 2.38 وحدة/مل . أظهرت نتائج الظروف الزرعية عند تنمية الفطر في المزارع المغمورة التي اعطت اعلى فعالية انزيمية بعد 9 أيام من التحضـين 2.94 وحدة/مل، وتعد هذه مدة التحضـين المثلى في درجة حرارة 30م° و(Locust Bean Gum(LBG كمصـــدر كاربوني ، ومســـتخلص الخميرة وبتركيز 0.4 % كمصدر نيتروجيني، والأس الهيدروجيني 6، بسرعة رج 150دورة/دقيقة، وأدّت اضافة بذور الاكاسيا بوصفه أحد المركبات الطبيعية، والمركب الكيميائي AL_2O_3 التي تحفز زيادة انتاج الانزيم.

الكلمات المفتاحية : فطر الشيتاكي ، LBG ، مستخلص الخميرة ، بذور الاكاسيا.

المقدمة

ان من أكثر الفطريات التي تركزت الابحاث عليها هي فطريات العفن الأبيض White Rot Fungi وذلك لقدرتها على تحلل المواد العضوية المختلفة ،لامتلاكها الانزيمات الخاصة التي تهاجم مادة اللكنين الموجودة في الخشب، وبذلك استعملت هذه الفطريات في العديد من التطبيقات منها إزالة الالوان من الأقمشـــة القطنية والتبييض الحيوي وإزالة المركبات الهيدروكاربونية وإزالة المعادن الثقيلة وإزالة الفينولات من مياه الصرف الصحي (Sharma *et al*.,2022).

يُعدّ فطر *Lentinula edodes* من الفطريات الكبيرة الصـالحة للأكل التي لم يتم دراسـتها بشـكل كبير في العراق على الرغم من الأهمية الطبية له التي كانت محل انظار ألباحثين بجميع دول العالم وهذا الفطر له

القدرة على انتاج العديد من الانزيمات ، منها انزيم Mannanase او Exo-1-4-β-Mannanase (E. C. 3.2.1.25) وهو من الانزيمات التابعة لعائلة glycoside hydrolases(GH) يعمل هذا الانزيم على تحطيم المانان و Hemi mannan وهما جزء من الهيميسليلوز الموجودة في جدران الخلايا النباتية والبذور والقهوة،ينتج عن التحطيم سكريات المانان.عزل β-Mannanase من مصادر مختلفة منها البكتريا ،الفطريات ،النباتات الراقية والحيوانات (Chauhan *et al.*,2012) ومنذ عام 1990 تُعد انزيمات β -Mannanases من الانزيمات التي برزت في صناعة التقنيات الحيوية، وان الانزيمات التي تنتج من الكائنات الحية المختلفة لها خصائص مختلفة منها نشاط الانزيم والأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة المثلى، لذلك فان انزيم B-Mannanase المنقى من الفطريات ذا نشاط نوعي عالٍ وخصائص انزيمية مطلوبة للتطبيقات الصناعية (Van *et al*.,2010) . يستخدم انزيم β -Mannanase المايكروبي في العديد من التطبيقات الصناعية منها صناعة المواد الغذائية ويستعمل بوصفه إضافات للأعلاف الحيوانية و في التبييض الحيوي للب الورق, ولتقليل لزوجة القهوة السريعة الذوبان وترويق عصائر الفاكهة والنبيذ ، وفي صناعة المنظفات وإزالة الاصباغ الصناعية وانتاج الايثانول الحيوي وفي صناعة الأدوية المضادة للسرطان والمضادة للالتهابات (Dawood and Ma,2020). تهدف هذه الدراسة الى تحديد الظروف الزرعية المثلى لانتاج انزيم Mannanase من العزلة الفطرية *Lentinula edodes* بنظام التخمرات المغمورة.

مواد وطرائق العمل

تم الحصول على الاجسام الثمرية للفطر *Lentinula edodes* من شركة الودق لإنتاج وزراعة الفطريات / بغداد للحصول على الخيوط الفطرية بصورة نقية نعقم كابينة الزرع بالايثانول 70% ويؤخذ قطع صغيرة من قلب الجسم الثمري (القبعة او الساق) بواسطة مشرط معقم بالكحول الاثيلي 70% لمدة خمس دقائق, وبعد انتهاء المدة تنقل القطع الى قناني حجمية اخرى حاوية على ماء مقطر معقم لازالة اثار المعقم . تنقل بعدها قطع الاجسام الثمرية على اوراق ترشيح معقمة نوع.Whatman No.1 لتجف توزع قطع الاجسام الثمرية بواقع قطعة واحدة او قطعتين على سطح اطباق بتري بلاستيكية معقمة حاوية على وسط ال PDA . تغلف الاطباق بورق الالمنيوم وتترك في الحاضنة عند درجة حرارة 27+-2°م لحين ظهور المستعمرات النقية.(Kala *et al.*,2020).

الكشف عن قابلية الفطر على انتاج انزيم ال Mannanase

للكشف عن قابلية عزلة الفطر على انتاج الانزيم استخدم وسط الكشف والموصوفة من قبل (Olaniyi and Ekundayo,2013) ويحتوي الوسط على:Peptone 0.1%, Yeast extract0.1%, LBG 0.1%

Glucose 0.3%,($NH_4)_2Po_4$ 0.1%, Agar2%, $MgCL_2$ 0,02%,$Na_2HPO_4$0,14% في 100مل من الماء المقطر ،عدل الاس الهيدروجيني عند 5,8,عقم الوسط بالمؤصدة ولمدة 15 دقيقة وبدرجة حرارة 121°م وضغط 1 كغم/سم^2 , صب الوسط في اطباق بتري معقمة وتترك ليتصلب داخل كابينة الزرع المعقمة اخذت قطعة من المزرعة الفطرية المنقاة حديثا بواسطة ثاقب الفلين ذو القطر 6 ملم وباستخدام ملقط معقم وبالتلهيب الكحولي وضعت على سطح وسط الكشف, وضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 27+-2°م لمدة تتراوح من 5ايام , ثم ملاحظة قطر هالة التحلل التي تمثل قابليتها على انتاج الانزيم . (Norizan,*et al*., 2020).

انتاج انزيم Mannanase

من اجل الحصول على الانزيم الخام من العزلة الفطرية *Lentinula edodes* حضر وسط Basal medium السائل والموصوفة من قبل(Chantorn *et al*.,2013) باذابة المكونات الآتية(%w/v): LBG 1، Peptone 0.4، KH_2PO_4 0.3، K_2HPO_4 0.2، $MgSO_4.7H_2O$ 0.05، $CoCL_2.6H_2O$ 0.0002 ، $FeSO_4.7H_2O$ 0.0005، $MnSO_4.H_2O$ 0.0002 and $ZnCl_2$ 0.0016 تذاب في 100 مل من الماء المقطر وضبط الأس الهيدروجيني عند 6.5 وزع الوسط في دوارق كل دورق 50 مل عقمت الدوارق بجهاز المعقام عند درجة حرارة 121°م وضغط 1 كغم/سم^2 لمدة 15 دقيقة وترك الوسط المعقم ليبرد ثم لقح كل دورف بخمس قطع من المزرعة الفطرية المنقاة حديثا وحضنت الدوارق بالحاضنة الهزازة عند سرعة 150 دورة / دقيقة وبدرجة حرارة 27∓2°م ولمدة تسعة أيام. واستعمل الوسط أيضاً كعينة سيطرة حيث تم حذف المصدر الكاربوني او النيتروجيني وحسب التجربة المطلوب دراستها.

تقدير فعالية انزيم Mannanase

لتحديد الفعالية الانزيمية اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Khongcharoen (2021) واستخدم مادة LBG كمادة اساس والمتكونة من 1غم من مادة LBG اذيبت في 100 مل من تركيز 0.05 مولاري من بوتاسيوم فوسفيت بفر عند الاس الهيدروجيني 6.اخذ 1مل من المادة الاساس واضيف لها 1 مل من المستخلص الانزيمي في انبوبة اختبار مع المزج جيدا ، ترك المزيج في حمام مائي عند درجة حرارة 40م° لمدة 5 دقائق بعدها يؤخذ 1مل من المزيج اعلاه وتوضع في انابيب اخرى ويضاف لها 1 مل من محلول DNS وتوضع في حمام مائي مغلي 100م°ولمدة عشر دقائق بعدها تترك لتبرد ثم يقاس الفعالية الانزيمية بجهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 540 نانوميتر.

تقدير البروتين

تم قياس البروتين حسب طريقة Lowry *et al.,*1951باستخدام البومين مصل البقر كبروتين قياسي.

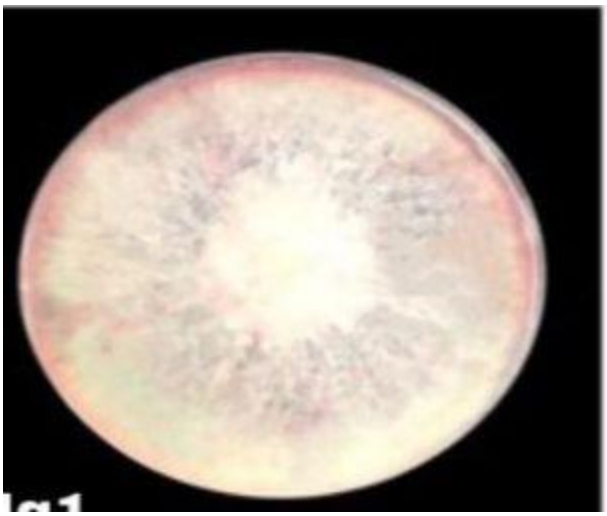
الظروف الزرعية لانتاج انزيم Mannanase

تم اختبار ظروف زرعية مختلفة على انتاج انزيم Mannanase من عزلة الفطر *Lentinula edodes* وهي مدد تحضين مختلفة تتراوح مابين (5-12) يوم ,ومعرفة المصدر الكاربوني باستخدام (Guar gum,LBG ومصادر ,(Sucrose,Glucose,Dextrose,Mannose,Manitol,Maltose,Arabic gum نيتروجينية(Yeast, $NaNO_3$, KNO_3 , NH_4NO_3 , Peptone , extract, $NaHPO_4$, NH_4SO_4) و, درجات حموضة مختلفة (3-10),ودرجة حرارة(22-36) م° وبفارق 2 درجة مئوية في كل مرة.وسرعة رج تتراوح مابين (100-250) دورة/ دقيقة , ومحفزات انتاج انزيم منها طبيعية (جوز الهند,بذور التمر,بذور الاكاسيا) ومحفزات كيميائية ($Talc,AL_2O_3$) .

النتائج والمناقشة

الغربلة الاولية والكشف عن قابلية العزلات الفطرية على انتاج انزيم Mannanase:

اعتمادا على قطر هالة التحلل التي تُعدُّ دلالة على انتاج الانزيم، تبين ان الفطر *Lentinula edodes* له القابلية على انتاج انزيم Mannanase بدلالة قطر هالة التحلل للمادة الاساس LBG والتي بلغت 14.6 ملم بعد مضي 5 ايام من التحضين كما في الشكل (1).



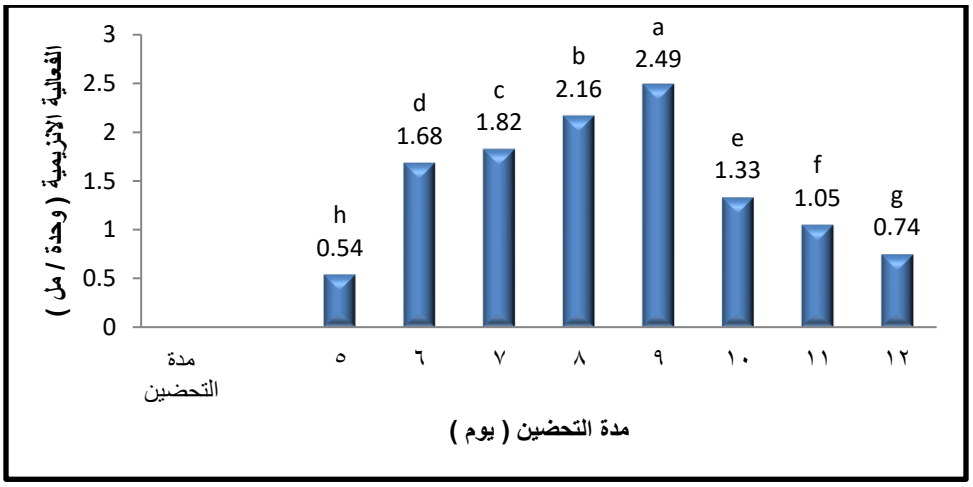
الشكل (1) الكشف عن قابلية عزلة الفطر *Lentinus edodes* على انتاج انزيم Mannanase باستخدام وسط الغربلة الاولية بدلالة قطر هالة التحلل

الظروف الزراعية لإنتاج انزيم Mannanase

1- مدة التحضين

يلاحظ من الشكل (2) زيادة انتاج الانزيم المستخلص من الفطر عند انمائه على وسط الانتاج ولمدد تحضين مختلفة، وتستمر الزيادة طرديا حتى بلغت اقصى انتاجية للانزيم(2.49)وحدة/مل في اليوم 9 من التحضين، بعدها تتجه الانتاجية للانخفاض التدريجي التي بلغت الانتاجية (0.74) وحدة/مل بعد مدة حضن 12 يوما.

ويعزى سبب الانخفاض التدريجي بالفعالية الانزيمية لإنتاج الانزيم مع استمرار مدة التحضين إلى التغيرات التي تحصل مع الاستمرار بالتحضين كاستنزاف المواد الغذائية وتراكم المنتجات الثانوية الأخرى في وسط التخمير والذي يبدأ بالتحلل الذاتي للخلايا(Malik *et al*.,2010). من خلال استعراض البحوث السابقة منها ما توصل اليه Alsarrani(2011) ان اقصى انتاجية لانزيم Mannanase من عزلة الفطر *Aspergillus niger* بلغت 3وحدة /مل باليوم 6 لوحظ بعدها الانخفاض التدريجي بعد 14 يوماً حيث بلغت الفعالية للأنزيم 2.1 وحدة /مل. في حين وجد(Adesina *et al*.,2013)ان أفضل فعالية لإنتاج الانزيم كانت في اليوم 9 و بلغت 14.11 وحدة /مل والمستخلص من الفطر *Aspergillus niger* وذكرNisa في عام 2007 عندما اعطت عزلة الفطر *Penicillium sp*. بعد مرور 8 أيام من التحضين اعلى فعالية انزيمية بلغت 8.2 وحدة/مل.. في حين وجد (Olaniyi *et al*.,2013) بان مدة التحضين المثلى لإنتاج انزيم Mannanase والمنقى من الفطر *Trichosporonoides oedocephalis* باستعمال تخمرات الحالة الصلبة كانت 4أيام من التحضين وبفعالية انزيمية بلغت 37.96 وحدة/مل.



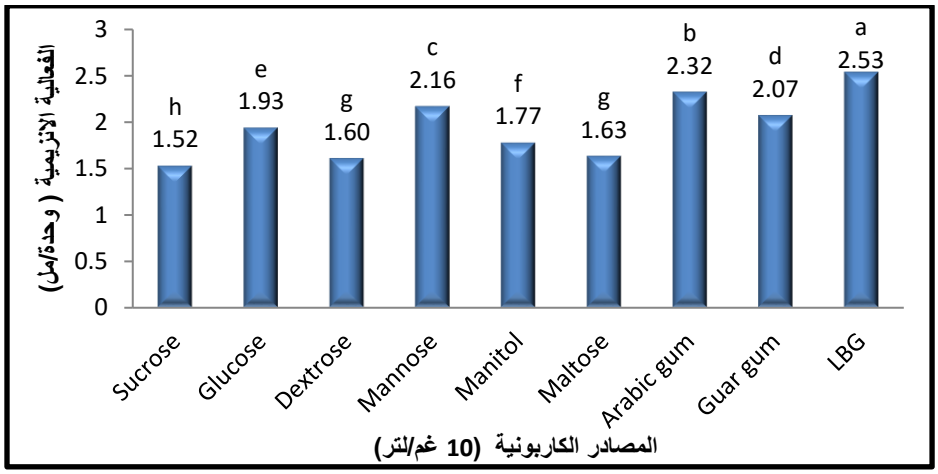
الشكل (2) تأثير مدة التحضين على انتاج انزيم Mannanase من عزلة الفطر *L. edodes*

2- المصدر الكاربوني

يُعدُّ المصدر الكاربوني من الاحتياجات الضرورية لنمو الفطريات ويجب توفره في وسط النمو، ولذلك جهز الوسط الزرعي بمصادر كاربونية مختلفة وتشمل Arabic gum، Guar gum، LBG، Mannose، Manitol، Maltose، Dextrose، Glucose، Sucrose، ومن النتائج الموضحة بالشكل (3) يلاحظ التنافس بين LBG و Arabic gum من حيث استعماله من قبل الفطر شيتاكي لإنتاج انزيم Mannanase وان أفضل فعالية انزيمية لإنتاج الانزيم باستعمال المصدر الكاربوني LBG أذ بلغت 2.53

وحدة/مل،في حين المصدر الكاربوني Arabic gum اعطى فعالية انزيمية بلغت 2.32 وحدة/مل، أما بقية المصادر الكاربونية فقد تمكن الفطر من استغلالها والنمو ولكن انتاج الانزيم كان بنسبة اقل من LBG، واقل فعالية انزيمية لانتاج الانزيم باستعمال المصدر الكاربوني Sucrose وبلغت 1.5 وحدة/مل.ويمكن ان تفسر النتيجة بان LBG يتكون من ارتباط كلاكتومنان ومانوز وان الانزيم يحفز على تحلل هذين المركبين وينتج من هذا التحلل المانوز، والكلاكتوز يستعمل في كثير من الفطريات كمصدر اساسي للكاربون.(Dionisio and Grenha, 2012). في حين اوضح (Norizan *et al.*,2020) بان أفضل المصادر الكاربونية لانتاج انزيم Mannanase هو LBG حيث بلغت الفعالية الانزيمية 513.6 وحدة/مل.

أشار(Maijala *et al.*,2012) الى ان أفضل مصدر كاربوني لانتاج انزيم Mannanase(LBG) حيث اعطى اعلى فعالية انزيمية من عزلة الفطر *Aspergillus terreus* بلغت 130 وحدة/مل.في حين توصل (Tang *et al.*,2001) إلى ان LBG هو أفضل مصدر كاربوني لانتاج انزيم Mannanase من عزلة الفطر البازيدي *Agaricus bisporus* وبلغت 3.3 وحدة/مل. وجاءت النتائج مخالفة لما توصل اليه Zine and (Peshwe, 2018) حيث بلغت اعلى فعالية لإنتاج انزيم Mannanase من الفطر *Streptomyces sp*. باضافة المصدر الكاربوني Guar gum إلى الوسط 76.69 وحدة/مل.



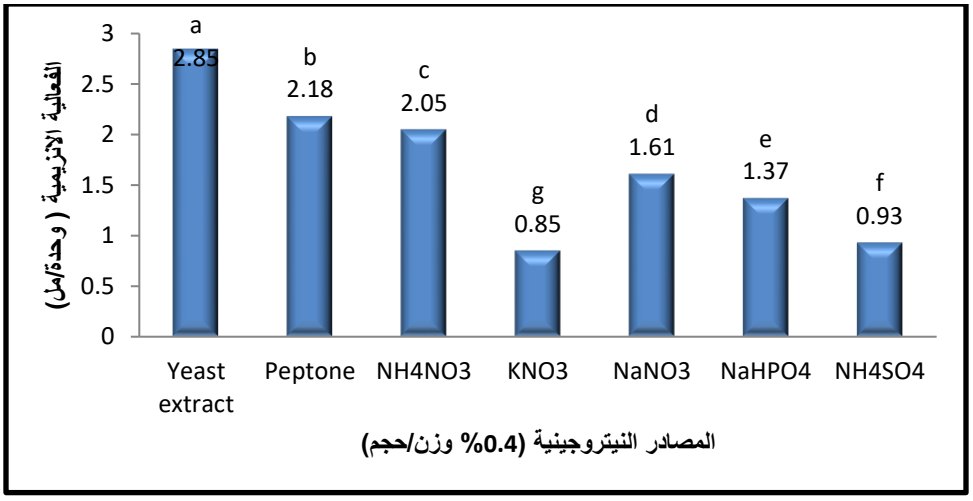
الشكل (3) تأثير مصادر كاربونية مختلفة على انتاج انزيم Mannanase من الفطر*L. edodes*

3- المصدر النيتروجيني

زود وسط الانتاج بمصادر نيتروجينية مختلفة وذلك لمعرفة قدرة الفطر على النمو وانتاج انزيم Mannanase وقد استعمل في التجربة أكثر من مصدر نيتروجيني وهي NH_4SO_4 ، $NaNO_3$، KNO_3، NH_4NO_3، PePton، Yeast extract. ومن الشكل (4) يتضح ان مستخلص الخميرة Yeast extract اعطت اعلى فعالية لإنتاج الانزيم Mannanase بلغت 2.85 وحدة/مل، تليه Pepton حيث كانت الفعالية الانزيمية 2.18 وحدة/مل، في حين ان اقل المصادر النيتروجينية انتاجا لانزيم Mannanase هو المصدر النيتروجيني KNO_3وبلغت الفعالية الانزيمية 0.85 وحدة / مل. العديد من العناصر الغذائية ضرورية لنمو الفطريات

ونشاطها كون الفطريات كائنات غير ذاتية التغذية ولذلك نحتاج إلى توفر العناصر الغذائية في وسط النمو ومن ضمنها المصادر النيتروجينة التي تُعدُّ عاملا مهما للنمو ومن هذه المصادر مثل الأحماض الأمينية واملاح الامونيوم (Laursen,2018).

وبالتدقيق للبحث المنشور من قبل(Zakaria *et al*.,1998) جاءت نتائجه مطابقة لما تم التوصل اليه في هذه التجربة اذ ان مستخلص الخميرة أفضل المصادر النيتروجينية لانتاج الانزيم المستخلص من *Flavobacterium* sp.، ومن خلال المراجعة التي اجريت لدراسة من قبل (Yatmaz *et al*.,2016) التي اكدت ان نترات الامونيوم ومن بعدها مستخلص الخميرة من أفضل المصادر النيتروجينية التي استغلت في النمو التي اعطت اعلى انتاجية لانزيم Mannanase من الفطر *Aspergillus sojae*.



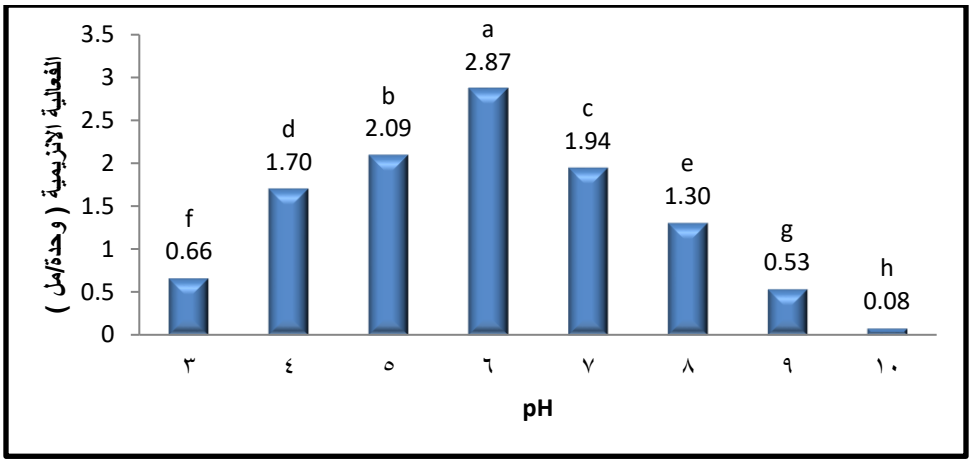
الشكل (4) تأثير مصادر نيتروجينية مختلفة على انتاج انزيم Mannanase من عزلة الفطر *L.edodes*

4- الأس الهيدروجيني

تمت دراســـة تأثير أســـس هيدروجينية مختلفة على فعالية انزيم Mannanaseمن عزلة الفطر *L. edodes* وتشير نتائج الشكل (5) حدوث زيادة تدريجية لفعالية الانزيم بدلالة الفعالية الانزيمية حتى وصولها لأقصـــى حد 2.87 وحدة/مل عندالاس الهيدروجيني 6، واعقبه انخفاض بالفعالية الانزيمية بزيادة الأس الهيدروجيني إلى ان وصل ادنى قيمة له بلغت 0.08 وحدة/مل عند الأس الهبدروجيني 10، .يمكن ان يعزى السبب إلى ان نمو الفطر يعمل على تراكم نواتج الايض الثانوي وافراز الفطر للأحماض العضوية التي تغير من قيمة الأس الهيدروجيني لبيئة النمو، وان الأس الهيدروجيني المختلف لوسط النمو له تأثير معنوي لنشاط الانزيم.(Bahri *et al*.,2019) العديد من الفطريات تتحمل مدى واســـع من تركيز الأس الهيدروجيني وهي تُعدُّ من أهم العوامل في وسط النمو ، وذلك لتأثيرها على سرعة عمل الانزيم وعلى التمثيل الغذائي للفطريات

بصـورة عامة، ولكل انزيم درجة مثلى يعمل عندها الانزيم بكل نشـاطه، وتختلف هذه الدرجة تبعا لعدة عوامل منها درجة حرارة التفاعل ومصدر الانزيم ومدة حفظه تحت ظروف معينة(الكسار،2017).

اظهرت دراســة اجريت من قبل (Cake , 2014) ان أفضــل اس هيدروجيني هو 6.1 لفعالية انزيم Mannanase المســتخلص من عزلة الفطر *Aspergillus tamari* والأس الهيدروجيني 6.2 للفطر *Aspergillus niger*، لقد اتفقت الدراسات السابقة لما حصل عليه (Shimizu *et al.*,2015)ان أفضل أس هيدروجيني لفعالية الانزيم هو 6 من عزلة الفطر *Aspergillus nidulans*..كما توصــل Zine و Peshwe في عام (2018) إلى ان أعلى فعالية لأنزيم Mannanase هي 74.31 وحدة/مل عند الأس الهيدروجيني 7.

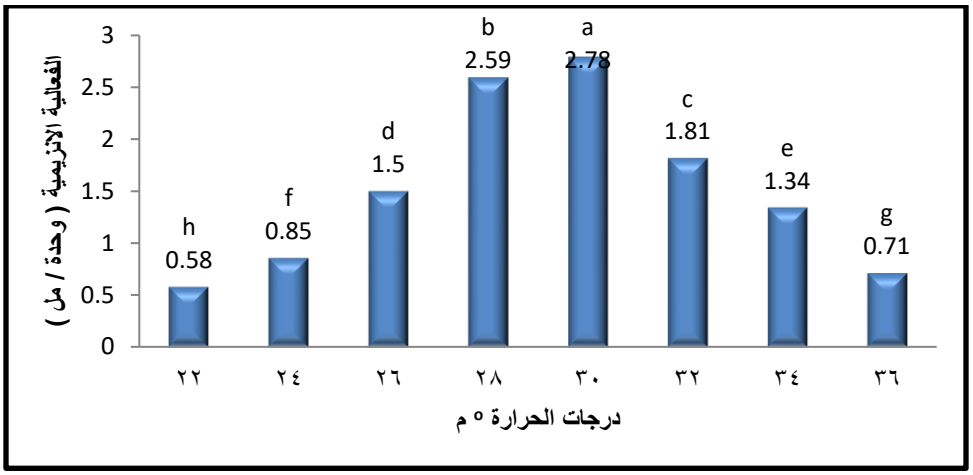


الشكل (5) تأثير أسس هيدروجينية مختلفة على انتاج انزيم Mannanase من عزلة الفطر *L. edodes*

5-درجة الحرارة

اختبرت قابلية انتاج انزيم Mannanase بدرجات حرارة مختلفة تتراوح بين 22 م° إلى 36 م° وبفارق 2 درجة مئوية، ومن الشكل (6) يتضح ان الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج الانزيم 30 م° اذ بلغت الفعالية الانزيمية 2.78 وحدة/مل، اعقبها الانخفاض في الفعالية الانزيمية مع زيادة درجة الحرارة حتى بلغت 0.7 وحدة/مل عند درجة الحرارة 36 م°، وتختلف الفطريات بدرجة الحرارة المثلى لنموها، وكذلك تختلف الدرجة الحرارية اللازمة لإنتاج الانزيم باختلاف نوع الفطر وباختلاف الوسط الزرعي. كما يمكن ان يعزى السبب لإنتاج الفطر إلى الحوامض بدلا من انتاج الانزيمات، ويمكن القول بان ومن البحوث السابقة يمكن الاستشهاد بما توصل اليه (Youssef *et al.*, 2006) إلى ان فعالية انزيم Mannanase تبلغ21 وحدة/مل عند درجة الحرارة 30 م° من عزلة الفطر *Aspergillus niger*. في حين اكد (Chantorn *et al.*,2013) ان درجة الحرارة 30 م° تعطي أفضل فعالية لانزيم Mannanase

والمستخلص من الفطر*Pencillium oxalicum* وفي صورة مغايرة فقد توصل (Saad, 2019) إلى ان أفضل درجة حرارة لإنتاج الانزيم كانت 25 م° من عزلة الفطر *Aspergillus tamarii*.و كانت النتيجة متطابقة لما وصل اليه Afolabiو Jimoh (2020) بدراسة درجات حرارية مختلفة على انتاج الانزيم من الفطر.*Candida* sp حيث بلغت الفعالية 110.03 وحدة/مل عند درجة حرارة 30 م°.



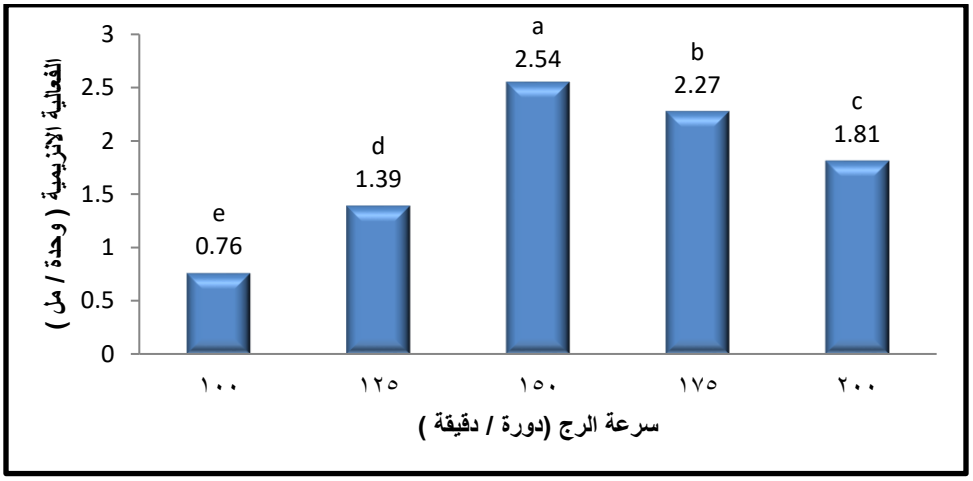
الشكل(6) تأثير درجات الحرارة على انتاج انزيم Mannanase من عزلة الفطر *L. edodes*

6-سرعة الرج

في كثير من عمليات انتاج الانزيمات الفطرية فان معدل الرج ضرورة للخلط المناسب لمحتويات الوسط والنقل الفعال للأوكسجين والمغذيات لجميع الكتلة الحية للفطر النامي في وسط النمو السائل، ومع ذلك فيمكن لسرعة الرج العالية او غير المناسبة ممكن ان تسبب هذه القوى الميكانيكية اضرارا بالكتلة الحية للفطر، وبالتالي فان معدل الرج يجب ان يقتصر بنطاق يمكن فيه تجنب ضغط عالي وضرر للخيوط الفطرية لذلك صممت التجربة وتم تحديد نطاق مناسب لسرعة الرج لتحفيز انتاج الانزيم على سرعة رج (100-250) دورة / الدقيقة (Wang *et al*.,2011).

بينت النتائج الواردة بالشكل (7) حدوث ارتفاع تدريجي بالفعالية الانزيمية بزيادة سرعة الرج إلى ان تصل اقصى فعالية انزيمية كانت بسرعة الرج 150 دورة/دقيقة بلغت 2.54 وحدة/مل بعدها يبدا الانخفاض التدريجي بالفعالية الانزيمية إلى ان تصل الفعالية الانزيمية 1.8 وحدة/مل عند سرعة رج 200 دورة/دقيقة.

ومن خلال استعراض البحوث السابقة توصل Öztürk (2008) إلى ان أفضل فعالية انزيمية لإنتاج انزيم Mannanase من الفطر *Streptomyces* sp. عند سرعة رج 250 دورة /دقيقة بلغت(421) وحدة/مل، وفي دراسة أخرى التي نشرهاالباحثون (Mazeed ,2012)إلى ان سرعة الرج المثلى لانتاج انزيم Mannanase وهي 200 دورة/دقيقة والمنقى من بكتريا *Bacillus velezensis* التي بلغت 12 وحدة/مل.



الشكل (7) تأثير سرع الرج المختلفة على فعالية انزيم Mannanase من عزلة الفطر *L. edodes*.

7-تحفيز انتاج انزيم Mannanase

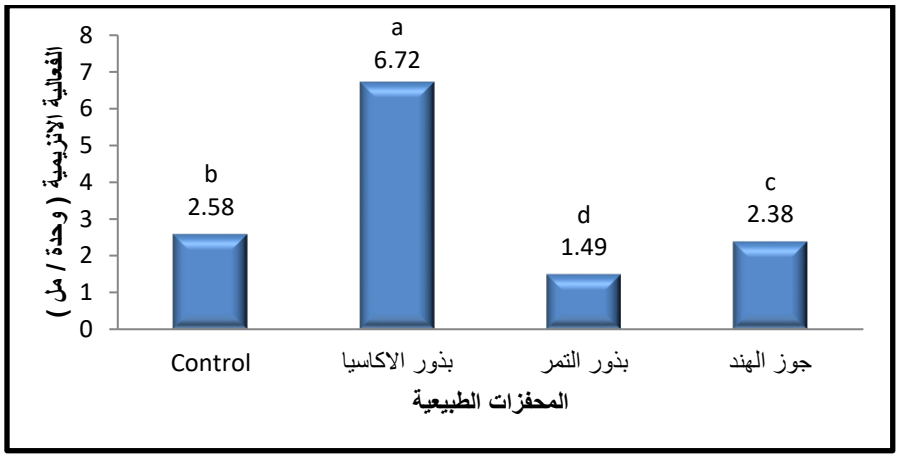
اضافة إلى جميع المصادر التي اضيفت إلى وسط النمو من المصادر النيتروجينية والكاربونية والظروف الزراعية التي ذكرت سابقا فقد لوحظ وجود بعض المركبات الطبيعية كمسحوق بذور الاكاسيا ومسحوق بذور التمر ومسحوق لب جوز الهند، وبتركيز 2%، او اضافة مركبات كيميائية وهي TalcوAL_2O_3 وتمت اضافتها كمشجعات لكي يكمل الفطر احتياجاته الغذائية ولإنتاج المواد المرغوبة ويتم اضافتها في بداية الانتاج ، وفي هذا السياق نمي الفطر بوسط غذائي غني بالمحفزات، ومن النتائج الموضحة بالشكل (8) يلاحظ ان بعض المركبات الطبيعية شجعت في زيادة انتاج انزيم Mannanase من عزلة الفطرية *Lentinula edodes* وكان أفضل المواد الطبيعية المضافة هي مسحوق بذور الاكاسيا حيث أعطت أفضل فعالية انزيمية وبلغت 6.72 وحدة/مل في حين ان انواع أخر أدت إلى انخفاض الفعالية الانزيمية بالمقارنة مع عينة السيطرة وهي مسحوق بذور التمر. في حين وضح الشكل (9) ان اضافة بعض

المواد الكيمياوية إلى وسط النمو شجع زيادة فعالية الانزيم بالمقارنة مع عينة السيطرة ، وكان أفضل هذه المواد المضافة هو المنيوم اوكسديز AL_2O_3 وبلغت الفعالية الانزيمية 3.55 وحدة /مل.

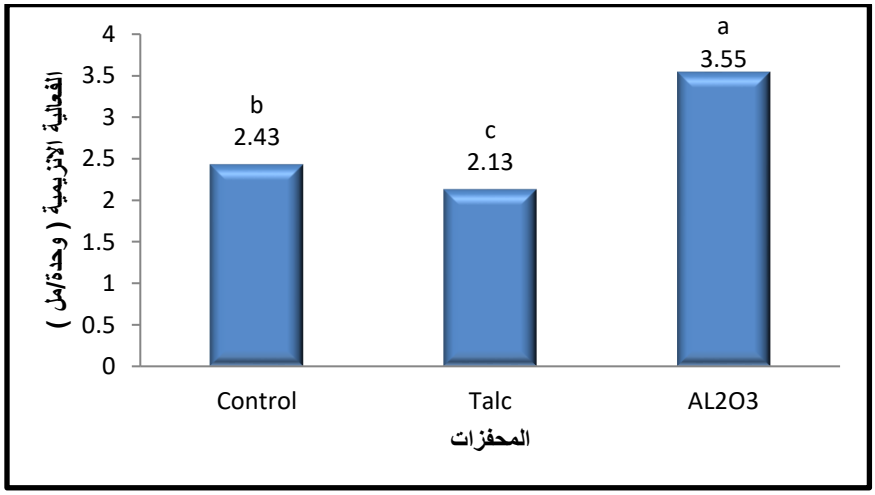
وتفسر هذه النتائج ان هذه المركبات تحتوي على نسبة عالية من المركبات العضوية والكاربوهيدرات التي قد يفضلها الفطر على المصادر الكاربونية والنيتروجينية لانتاج الانزيم كما ان اضافة الكمية المناسبة من كل مادة تزيد من انتاج الانزيم بكميات متفاوتة بالمقارنة مع معاملة السيطرة وذلك لاستعمال الفطر للمادة وتقلل من استعمال السكريات وتحسن انتاج الانزيم (Coban *et al*.,2015).

ومن الدراسات السابقة (Blibech *et al*.,2011b) حيث أشار إلى ان هنالك فعالية عالية لانزيم Mannanase والمستخلص من الفطر *Penicillium occitanis* باستعمال بذور الاكاسيا وبلغت 3.11 وحدة /مل وكانت عشرة اضعاف انتاجية وسط السيطرة وثلاثة اضعاف عن الانتاجية باستعمال مسحوق لب جوز الهند وبذلك تم استعماله كمادة اساس لإنتاج الانزيم في الصناعات كاقل تكلفة.

في حين تشير النتائج إلى ان اضافة بعض المركبات الطبيعية إلى وسط النمو حسبما اشار اليها (Youssef *et al*.,2006)لإنتاج انزيم Mannanase المستخلص من الفطر *Aspergillus* niger وجاءت مخالفة لنتائج تجربة الدراسة اذ ان مسحوق لب جوز الهند كان من أفضل المصادر الطبيعية لإنتاج الانزيم أذ بلغت الفعالية الانزيمية 1.26 وحدة /مل.في حين اشارت الدراسة التي قام بها(Yatmaz *et al*.,2016)ان اضافة التالك والالمونيوم اوكسديز أدى إلى زيادة فعالية الانزيم Mannanase هو المنيوم اوكسديز وبلغت الفعالية الانزيمية 514.0 وحدة/مل في حين كانت معاملة السيطرة الفعالية الانزيمية 199.3 وحدة/مل.



الشكل (8) تأثير اضافة محفزات طبيعية مختلفة على انتاج انزيم Mannanase من عزلة الفطر *L. edodes*.



الشكل (9) تأثير اضافة محفزات كيميائية مختلفة على انتاج انزيم Mnnanase من عزلة الفطر *L. edodes*

المصادر العربية

1- – الكسار، علي محمود.(2017).الاضافات العلفية للدواجن (الانزيمات).الطبعة الاولى.دار الكتب والوثائق:355.

المصادر الاجنبية

2−Adesina, F. C.; Oluboyede, O. A.; and Onilude, A. A. (2013). Production, purification and characterisation of a β-mannanase by *Aspergillus niger* through solid state fermentation (SSF) of Gmelina arborea shavings. African Journal of Microbiology Research, 7(4), 282-289.

3−Afolabi, F. T.; and Jimoh; Y. Z. (2020). Production, Purification and Characterization of Mannanase Obtained from *Pichia Kudriavzevii* Strain AUMC 10190 Isolated from Citrus Wastes. Department of Microbiology, University of Ibadan, Nigeria.

4−Alsarrani, A. Q. (2011). Production of Mannan-degrading enzyme by *Aspergillus niger*. Journal of Taibah University for Science, 5(1), 1-6.

5−Blibech, M.; Ellouz Ghorbel, R.; Chaari, F.; Dammak, I.; Bhiri, F.; Neifar, M.; and Ellouz Chaabouni, S. (2011b). Improved mannanase production from *Penicillium occitanis* by fed-batch fermentation using acacia seeds. International Scholarly Research Notices, 2011.

6−Cake, P. P.(2014) Research Article Production of Mannanase Enzyme Using *Aspergillus* spp. Isolated from Decaying. Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB).

7-Chantorn, S. T.; Buengsrisawat, K.; Pokaseam, A.; Sombat, T.; Dangpram, P., Jantawon, K.; and Nitisinprasert, S. (2013). Optimization of extracellular mannanase production from *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 and application for hydrolysis property. Songklanakarin J Sci Technol, 35(1),

8-Chantorn, S. T.; Pongsapipatana, N.; Keawsompong, S.; Ingkakul, A.; Haltrich, D., and Nitisinprasert, S. (2013). Characterization of mannanase S1 from *Klebsiella oxytoca* KUB-CW2-3 and its application in copra mannan hydrolysis. ScienceAsia, 39(3), 236-245.

9-Coban, H. B.; Demirci, A., and Turhan, I. (2015). Enhanced *Aspergillus ficuum* phytase production in fed-batch and continuous fermentations in the presence of talcum microparticles. Bioprocess and biosystems engineering, 38(8), 1431-1436.

10-Dawood, A.; and Ma, K. (2020). Applications of microbial β-mannanases. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 1336.

11-Dionísio, M.,and Grenha, A. (2012). Locust bean gum: exploring its potential for biopharmaceutical applications. Journal of pharmacy and bioallied sciences, 4(3), 175.

12-Kała, K.; Kryczyk-Poprawa, A.; Rzewińska, A.; and Muszyńska, B. (2020). Fruiting bodies of selected edible mushrooms as a potential source of lovastatin. European Food Research and Technology, 246(4), 713-722

13-Khongcharoen, K. O., and Rattanaporn, K. (2021). Kinetic Study of Recombinant Beta-Mannanase Production from *Escherichia coli* KMAN-3 in a Bioreactor Using Auto-Induction System (Doctoral dissertation, Kasetsart University).

14-Laursen, A. (2018). The effect of different nitrogen sources on mycelial growth of oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. Swedish University of Agriculture Sciences.

15-Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L., and Randall, R. J.(1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal Biological Chemistry, 193(1): 265-275.

16-Maijala, P.; Kango, N.; Szijarto, N., and Viikari, L. (2012). Characterization of hemicellulases from thermophilic fungi. Antonie Van Leeuwenhoek, 101(4), 905-917.

17-Malik, S. K., Mukhtar, H., Farooqi, A. A., and Haq, I. (2010). Optimization of process parameters for the biosynthesis of cellulases by *Trichoderma viride*. Pak. J. Bot, 42(6), 4243-4251.

18-Mazeed, T. (2012). Optimization of Agitation and Incubation Period on production of Mannanase by *Bacillus velezensis* nrc-1 using bench-scale bioreactor. Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences, 45(1), 265-273.

19-Nisa, S. L. (2007). The production of fungal mannanase, cellulase and xylanase using palm kernel meal as a substrate. Walailak Journal of Science and Technology (WJST), 4(1), 67-82.

20-Norizan, N. A. B. M.; Halim, M.; Tan, J. S.; Abbasiliasi, S.; Mat Sahri, M.; Othman, F., and Ariff, A. B. (2020). Enhancement of β-mannanase production by *Bacillus subtilis* ATCC11774 through optimization of medium composition. Molecules, 25(15), 3516.

21-Olaniyi, O. O.; Igbe, F. O., and Ekundayo, T. C. (2013). Optimization studies on mannanase production by *Trichosporonoides oedocephalis* in submerged state fermentation. Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research, 4(7), 110-116.

22-Öztürk, B. (2008). Optimization of mannanase production from recombinant *Aspergillus sojae* and analysis of galactomannan hydrolysis (Master's thesis, Middle East Technical University).

23-Saad, A. M.; Saad, M. M.; Ibrahim, N. A.; El-Hadedy, D., Ibrahim, E. I.; El-Din, A. Z. K., and Hassan, H. M. (2019). Evaluation of *Aspergillus tamarii* NRC 3 biomass as a biosorbent for removal and recovery of heavy metals from contaminated aqueous solutions. Bulletin of the National Research Centre, 43(1), 1-9.

24-Sharma, K. R.; Giri, R., and Sharma, R. K. (2022). Efficient bioremediation of metal containing industrial wastewater using white rot fungi. International Journal of Environmental Science and Technology, 1-8.

25-Shimizu, M.; Kaneko, Y.; Ishihara, S.; Mochizuki, M.; Sakai, K.; Yamada, M., and Kato, M. (2015). Novel β-1, 4-mannanase belonging to a new glycoside hydrolase family in *Aspergillus nidulans*. Journal of Biological Chemistry, 290(46), 27914-27927.

26-Tang, C. M.; Waterman, L. D.; Smith, M. H., and Thurston, C. F. (2001). The cel4 gene of *Agaricus bisporus* encodes a β-mannanase. Applied and Environmental Microbiology, 67(5), 2298-2303.

27-Van Zyl, W. H.; Rose, S. H.;Trollope, K., and Görgens, J. F. (2010). Fungal β-mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. Process Biochemistry, 45(8), 1203-1213.

28-Wang, J.; Ogata, M.; Hirai, H., and Kawagishi, H. (2011). Detoxification of aflatoxin B1 by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. FEMS microbiology letters, 314(2), 164-169.

29-Yatmaz, E. R. C. A. N., Karahalil, E., Germec, M., Oziyci, H. R., Karhan, M. U. S. T. A. F. A., Duruksu, G. Ö. K. H. A. N., and Turhan, I. (2016). Enhanced β-mannanase production from alternative sources by recombinant *Aspergillus sojae*. Acta Alimentaria, 45(3), 371-379.

30-Youssef, A. S.; El-Naggar, M. Y.; El Assar, S. A., and Beltagy, E. A. (2006). Optimization of cultural conditions for β-mannanase production by a local *Aspergillus niger* isolate. International Journal of Agriculture and Biology, 8(4), 539-545.

31-Zakaria, M. M.; Ashiuchi, M.; Yamamoto, S.; and Yagi, T. (1998). Optimization for β-mannanase production of a*Psychrophilic bacterium*, *Flavobacterium* sp. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 62(4), 655-660.

32-Zine, A., and Peshwe, S. (2018). Isolation screening and identification of fungal mannanase producer. International Journal of Current Research in Life Sciences, 7(02), 1093.