Menoufia J. Agric. Biotechnology Volume 9 Issue 4 (2024): 73 – 77

**MENOUFIA JOURNAL OF
AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY**

https://mjab.journals.ekb.eg

Title of Thesis	:	Genetic Improvement of Some Trichoderma Isolates for Second-Generation Biofuel Production from Agricultural Wastes.
Name of Applicant	:	Muhammad Alaa Eldin Muhammad El-Sobky
Scientific Degree	:	Ph. D.
Department	:	Genetics
Field of study	:	Genetics
Date of Conferment	:	Mar. 13, 2024

Supervision Committee:

- Dr. Ragaa A. Eissa : Prof. of Genetics, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. A. I. Fahmi : Prof. of Genetics, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. A. M. El-Zanaty : Prof. of Genetics, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. Kh. S. Abdel-Lateif: Prof. of Genetics, Fac. of Agric., Menoufia Univ.

Summary

Twenty-six isolates of *Trichoderma spp.* collected from various Egyptian locations were screened for their Cellulase activities via qualitative and quantitative tests. The main objective was to choose the best isolates that can degrade lignocellulosic biomass.

First, we carried out qualitative screening of Cellulases in Congo red dye medium. Six isolates showed clear zones larger than other isolates namely, MNF-MAS-*Tricho*1, 6, 23, and ASI-MAS-*Tricho*26. In addition, another qualitative test was done using 1% PASC media. Full plate radial growth was shown in isolates MNF-MAS-*Tricho* 2 ,3 ,5 ,6 ,12 ,15 ,18 ,21 , and 23 after 48 h incubation and the sporulation type was detected.

Second, quantitively enzymes activities (filter paper activity (FPase) assay, carboxymethyl cellulase assay for endo- β - 1,4-gluconase and cellobiose assay for β-glucosidase) were carried out for 2,3,4,6 and 7 days in Mandel’s Media with CMC 0.5% as a substrate of Cellulases. We detected four isolates that showed highly significant FPase activities after seven days of incubation namely, MNF-MAS-*Tricho* 2, MNF-MAS-*Tricho* 3 MNF-MAS-*Tricho* 15 and MNF-MAS-*Tricho* 17(0.49, 0.47, 0.47 and 0.45 IU mL^{-1}, respectively).

Furthermore, Cellulase enzyme activities (FPase, CMCase and β-glucosidase) were measured in Mandel’s Media with Avicel 1% in SmF cultures for all isolates. Three isolates demonstrated highly significant FPase activities namely, MNF-MAS-*Tricho*1, MNF-MAS-*Tricho* 2 and MNF-MAS-*Tricho* 3 (0.50, 0.39 and 0.49 IU mL^{-1}, respectively). While MNF-MAS-*Tricho* 1 showed the highest significant CMCase activity (0.80 IU mL^{-1}). Concerning β-glucosidase activity, MNF-MAS-*Tricho* 1 was the highest (0.78 IU mL^{-1}), while MNF-MSH-*Tricho* 11 and MNF-MAS-*Tricho*15 were the lowest (0.36 IU mL^{-1}).

Cellulase enzyme activities (FPase, CMCase and β-glucosidase) were measured in SSF (Rice straw) for all isolates. Generally, all isolates indicated outstanding endoglucanase activity, when compared to FPase and β-glucosidase. Five isolates demonstrated highly significant FPase activities namely, MNF-MAS-*Tricho*2, 6,12,18 and 23 (0.114 ,0.102, 0.103, 0.105 and 0.103 IU g^{-1} , respectively). MNF-MAS-*Tricho* 13 showed the lowest FPase activity (0.06 IU g^{-1}). While, MNF-MAS-*Tricho* 2,12,22 and 23 showed the highest significant CMCase activity (0.156, 0.159, 0.176 and 0.168 IU g^{-1} , respectively) and the lowest were MNF-MAS-*Tricho* 8,11,14, and 16 (0.112 IU g-1). As for β-glucosidase MNF-MAS-*Tricho* 2,6,12,18 and 23 were the highest in the same level without significant (0.15 IU g^{-1}), while MNF-MSH-*Tricho*1 was the lowest (0.076 IU g^{-1}).

In SSF of wheat straw, two isolates demonstrated highly significant FPase activities namely, MNF-MAS-*Tricho*2, and 18 (0.076 and 0.070 IU g^{-1} , respectively). MNF-MAS-*Tricho* 13 showed the lowest FPase activity (0.04 IU g^{-1}). While MNF-MAS-*Tricho* 22 and 23 showed the highest significant CMCase activity (0.112 and 0.117 IU g^{-1} , respectively) and the lowest were MNF-MAS-*Tricho* 8,11,14, and 16 (0.075 IU g^{-1}). As for β-glucosidase, MNF-MAS-*Tricho* 2 and 23 were the highest in the same level without significant (0.103 IU g^{-1}) while MNF-MSH-*Tricho* 20 was the lowest (0.070 IU g^{-1}).

After all these tests we can compare enzyme production by SmF and SSF. Firstly, Using SmF production for high yield and high quality, but silt it can't be used in second generation biofuel. Moreover, SmF still very expensive. Secondly, SSF are producing low yield of enzymes and can be used in second generation biofuel. So, we need to improve the isolates that have high yield of enzyme and releasing high amount of glucose in SSF.

Moreover, the genetic diversity among the tested isolates was tested using rep-PCR marker. The polymorphism percentage ranged from 46.15 to 83.33%. (GTG)5 marker produced the maximum number of polymorphic loci (13 loci out of 18 loci) with about 83.33% polymorphism, followed by rep-10 with 69.2% polymorphism. Furthermore, the polymorphism information content (PIC) values ranged between 0.285 for Rep-10 and 0.340 for (GTG)5 with an average of 0.306. The tested primers exhibited high discriminating and resolving power.

Moreover, we extract total genomic DNA to detect Cellulase genes by using Chb gene cellobiohydrolase (CBH), Bgl gene β-glucosidase (BGL) and Egl gene endoglucanase (EG).

In order to select the *Trichoderma harzianum* isolates to improve the cellulase production for second-generation biofuel, we selected the best isolates in SSF for FPase and β-glucosidase activities. Moreover, selection of the best isolates that have high concentrations of glucose level after the incubation periods that refers to didn't have feedback inhibition. After this selection we select MNF-MAS-*Tricho* 2, 6,12 ,18, and 23 to improve them with the protoplast fusion and genome shuffling. *FU*7 showed the highest number of observed colonies (45) in plate. *FU*1, *FU*5 and *FU*6 showed the lowest number of colonies (12,11 and 14, respectively). We selected 11 fusions from stability test.

We can conclude that the protoplast fusion improves FPase enzyme activity in all fusants strains except (*FU*2.1 and *FU*2.2) in SmF, (*FU*1.1 and *FU*4.1) in SSF of untreated rice straw and (*FU*3.1 and *FU*3.2) in SSF of pretreated rice straw. CMCase enzyme activity was improved in all fusant strains except (*FU*2.2, *FU*3.1, *FU*6.1 and *FU*7.2) in SmF, and (*FU*4.1 and *FU*7.1) in SSF of untreated rice straw. β-glucosidase enzyme activity was improved in all fusant strains except (*FU*2.2) in SmF.

In general, the highest improvement of FPase activity was detected in SmF with about 153 % in *FU*1.1, SSF untreated rice straw, 283.8 % in *FU*4.2 and in SSF pretreated straw 431% in *FU*4.2. Moreover, the highest improving in CMCase was shown in SmF 200% in *FU*4.2, SSF untreated rice straw 350% (*FU*2.1 and *FU*2.2) and SSF pretreated straw 540% in *FU*7.1. Whereas β-glucosidase activity showed highest improvement in SmF 189% in *FU*5.1, SSF untreated rice straw, in 365.8% *FU*4.1 and SSF pretreated straw 406%.

The results of genome shuffled indicated higher improving in *SH1* in SSF of pretreated straw in CMCase 560% (0.56 IU/g) higher than the lower parent, and 412.9 % FPase (0.266 IU/g) from lower parent. The improvement was detected in each SSF and SmF. Moreover, Improvement reached 310 % in β-glucosidase (0.62 IU/g) higher than the lowest parent. Finaly, it was clear that the glucose concentration in pretreated straw SSF was the highest (10.1 mg/ml).

The bioethanol production by fermentation process started by the addition of *Saccharomyces cerevisiae* cells 8x108 cfu /mL. The glucose was consumed rapidly during the first 4 h of fermentation, and then it was highly consumed after 72 h this increased ethanol production which was significantly higher after 7 days. whereas the bioethanol was the lowest showed in SmF (2.23 ± 0.05g/l, 0.02 g/g) and shown maximum ethanol production by the saccharification of SSF (4.20 ± 0.13 g/l , 0.04 g/g).

عنوان الرسالة: التحسين الوراثي لبعض عزلات التريكوديرما لإنتاج الجيل الثاني من الوقود الحيوي من المخلفات الزراعية

اسم الباحـث : محمد علاء الدين محمد السبكي
الدرجة العلمية: دكتور الفلسفة فى العلوم الزراعية
القسم العلمى : الكيمياء الحيوية الزراعية

تاريخ موافقة مجلس الكلية : ٢٠٢٤/٣/١٣

لجنة الإشراف: أ.د. رجاء عبد العزيز عيســـى أستاذ الوراثة، كلية الزراعة، جامعة المنوفية
أ.د. ا.د عبد الفتاح مندي الزناتي أستاذ الوراثة ، كلية الزراعة، جامعة المنوفية
أ.د. عبد المجيد إبراهيم فهمـــي أستاذ الوراثة ، كلية الزراعة، جامعة المنوفية
أ.د. خالد صلاح الدين محمـــد أستاذ الوراثة، كلية الزراعة، جامعة المنوفية

الملخص العربي

ستة وعشرون عزلة من فطر التريكودرما تم جمعها من مواقع مصرية مختلفة تم فحصها لنشاط لهدم السيليلوز من خلال الاختبارات النوعية والكمية. كان الهدف الرئيسي هو اختيار أفضل العزلات التي يمكن أن تؤدي إلى تحلل الكتلة الحيوية اللجنوسليلوزية.

أولاً، قمنا بإجراء الفحص الوصفي للعزلات في اطباق مع CMC. أظهرت ست عزلات مناطق واضحة أكبر من العزلات الأخرى وهي ١و٦و ٢٣ و ٢٦بالإضافة إلى ذلك، تم إجراء اختبار، وصفي آخر باستخدام وسائط PASC بنسبة ١%. وقد ظهر نمو شعاعي كامل في العزلات ٢و ٣و٥و٦و ١٢و ١٥و ١٨و ٢١و ٢٣ بعد التحضين لمدة ٤٨ ساعة وتم الكشف اشكال وطبيعة التجرثم.

ثانيًا، تم اختبار نشاط الإنزيمات كميا في التخمرات السائلة من خلال (FPase, CMCase and β-glucosidase) لمدة ٢،٣،٤،٦ و٧ أيام في وسائط ماندل معCMC 0.5 ٪ كركيزة. اكتشفنا أربع عزلات أظهرت أنشطة FPase ذات أهمية كبيرة بعد سبعة أيام من الحضانة وهي العزلة رقم ٢و ٣و ١٥ و ١٧ كانت (٠.٤٩، ٠.٤٧، ٠.٤٧ و ٠.٤٥ وحدة دولية/ مل، على التوالي)

علاوة على ذلك، تم قياس أنشطة إنزيم (FPase وCMCase وβ-glucosidase) في وسط ماندل باستخدام Avicel 1% في مزارع التخمرات السائلة لجميع العزلات. أظهرت ثلاث عزلات أنشطة FPase ذات أهمية كبيرة وهي العزلة رقم ١و ٢و٣ (٠.٥٠، ٠.٣٩ و٠.٤٩ وحدة دولية مل، على التوالي). بينما أظهر ١ أعلى نشاط مهم لـ CMCase (٠.٨٠ وحدة دولية مل-١). فيما يتعلق بنشاط β-glucosidase، كان ١هو الأعلى (٠.٧٨ وحدة دولية / مل)، في حين كان العزلات رقم ١١ و ١٥ و الأدنى (٠.٣٦ وحدة دولية / مل).

تم قياس نشاط إنزيم هدم السيليلوز (FPase، CMCase وβ-glucosidase) في التخمرات الصلبة (قش الأرز) لجميع العزلات. بشكل عام، أشارت جميع العزلات إلى نشاط إندوجلوكانيز متميز، بالمقارنة مع FPase وβ-glucosidase. أظهرت خمس عزلات أنشطة FPase ذات أهمية كبيرة وهي العزلات رقم ٢، ٦،١٢،١٨ و٢٣ (٠.١١٤، ٠.١٠٢، ٠.١٠٣، ٠.١٠٥ و٠.١٠٣ وحدة دولية / الجرام، على التوالي). أظهر العزلة رقم ١٣ أقل نشاط FPase (٠.٠٦ وحدة دولية/ جم). بينما أظهر العزلة ٢ و١٢ و٢٢و٢٣ أعلى نشاط CMCase مهم (٠.١٥٦، ٠.١٥٩، ٠.١٧٦ و٠.١٦٨ وحدة دولية / الجرام، على التوالي) وكان أدنى نشاط في العزلات رقم ٨ و١١و ١٤، و ١٦ (٠.١١٢ وحدة دولية/ جم). أما بالنسبة لـلعزلات رقم ٢ و٦و ١٢و ١٨. اما بالنسبة β-glucosidase فالعزلة رقم ٢٣ فكانت الأعلى في نفس المستوى بمعنوية (٠.١٥ وحدة دولية / جم) بينما كان العزلة رقم ١هو الأدنى (٠.٠٧٦ وحدة دولية / جم) .

في التخمرات الصلبة من قش القمح، أظهرت عزلتان نشاط FPase عالي الأهمية وهما العزلة رقم ٢ و١٨ (٠.٠٧٦ و٠.٠٧٠ وحدة دولية/ جم، على التوالي). أظهر Mالعزلة رقم ١٣أقل نشاط FPase (٠.٠٤ وحدة دولية جم-١). بينما أظهر العزلات رقم ٢٢ و٢٣ أعلى نشاط CMCase مهم (٠.١١٢ و٠.١١٧ وحدة دولية/ جم، على التوالي) وكان أدنى نشاط العزلة قم ٨ و ١١ و ١٤ و١٦ (٠.٠٧٥ وحدة دولية/ جم) . أما بالنسبة لـ β-glucosidase، فقد كان العزلة رقم ٢ و٢٣ هو الأعلى في نفس المستوى بدون معنوية (٠.١٠٣ وحدة دولية/ جم) بينما كان العزلة رقم ٢٠ هو الأدنى (٠.٠٧٠ وحدة دولية/ جم).

بعد كل هذه الاختبارات يمكننا مقارنة إنتاج الإنزيم بواسطة التخمرات السائلة والتخمرات الصلبة. أولاً، استخدام إنتاج التخمرات السائلة للحصول على إنتاجية عالية وجودة عالية، ولكن الطمي لا يمكن استخدامه في الجيل الثاني من الوقود الحيوي. وعلاوة على ذلك، التخمرات السائلة لا تزال مكلفة للغاية. ثانيًا، ينتج التخمرات الصلبة إنتاجًا منخفضًا من الإنزيمات ويمكن استخدامه في الجيل الثاني من الوقود الحيوي. لذلك، نحن بحاجة إلى تحسين العزلات التي لديها إنتاجية عالية من الإنزيم وتطلق كمية عالية من الجلوكوز في التخمرات الصلبة.

علاوة على ذلك، تم اختبار التنوع الوراثي بين العزلات المختبرة باستخدام معلمات Rep-PCR. وتراوحت نسبة تعدد الأشكال من ٤٦.١٥ إلى ٨٣.٣٣%. أنتجت علامة (GTG)5 الحد الأقصى لعدد المواقع متعددة الأشكال (١٣ موقعًا من أصل ١٨ موقعًا) مع حوالي ٨٣.٣٣% من تعدد الأشكال، تليها مندوب-١٠ مع تعدد الأشكال بنسبة ٦٩.٢%. علاوة على ذلك، تراوحت قيم محتوى معلومات تعدد الأشكال (PIC) بين ٠.٢٨٥ لـ Rep-10 و٠.٣٤٠ لـ (GTG)5 بمتوسط ٠.٣٠٦. أظهرت البادئات التي تم اختبارها قوة تمييز وحل عالية. علاوة على ذلك، قمنا استخدام PCR للكشف عن جينات هدم السيليلوز باستخدام جين Chb، جين Bgl

من أجل التحسين تم انتخاب عزلات Trichoderma harzianum لتحسين إنتاج انزيمات هدم السيليلوز للوقود الحيوي من الجيل الثاني، قمنا باختيار أفضل العزلات في التخمرات الصلبة لأنشطة FPase وβ-glucosidase. علاوة على ذلك، فإن اختيار أفضل العزلات التي تحتوي على تراكيز عالية من مستوى الجلوكوز بعد فترات الحضانة المشار إليها لم يكن لها تثبيط التغذية الراجعة. بعد هذا الاختيار نختار ٢، ١٨، ٦،١٢، و٢٣ لتحسينها من خلال اندماج البروتوبلاست وخلط الجينوم. أظهر FU7 أكبر عدد من المستعمرات المرصودة (٤٥) في اللوحة. أظهرت FU1 وFU5 وFU6 أقل عدد من المستعمرات (١١،١٢ و١٤، على التوالي). لقد اخترنا ١١ اندماجًا من اختبار الثبات.

يمكننا أن نستنتج أن اندماج البروتوبلاست يحسن نشاط إنزيم FPase في جميع سلالات المنصهرات باستثناء (FU2.1 و FU2.2) في التخمرات السائلة ، (FU1.1 و FU4.1) في التخمرات الصلبة من قش الأرز غير المعالج و (FU3.1 و FU3. ٢). في التخمرات الصلبة من قش الأرز المعالج. تم تحسين نشاط إنزيم CMCase في جميع السلالات المدمجة ماعدا (FU2.2، FU3.1، FU6.1 و FU7.2) في التخمرات السائلة، و (FU4.1 و FU7.1) في التخمرات الصلبة من قش الأرز غير المعالج. تم تحسين نشاط انزيم β-glucosidase في جميع سلالات المدمجة ما عدا (FU2.2) في التخمرات السائلة.

بشكل عام، تم اكتشاف أعلى تحسن في نشاط FPase في التخمرات السائلة بحوالي ١٥٣% في FU1.1، قش الأرز غير المعالج التخمرات الصلبة، ٢٨٣.٨% في FU4.2 وفي القش المعالج مسبقًا التخمرات الصلبة ٤٣١%في FU4.2. علاوة على ذلك، ظهر أعلى تحسن في CMCase في التخمرات السائلة ٢٠٠%في FU4.2، وقش الأرز غير المعالج التخمرات الصلبة ٣٥٠% (FU2.1 وFU2.2) والقش المعالج مسبقًا التخمرات الصلبة ٥٤٠% في FU7.1. في حين أظهر نشاط β-glucosidase أعلى تحسن في التخمرات السائلة ١٨٩%في FU5.1، قش الأرز غير المعالج التخمرات الصلبة، في ٣٦٥.٨% FU4.1 والقش المعالج مسبقًا التخمرات الصلبة ٤٠٦%.

أشارت نتائج خلط الجينوم إلى تحسن أعلى في SH1 في التخمرات الصلبة للقش المعالج مسبقًا في CMCase بنسبة ٥٦٠٪ (٠.٥٦ وحدة دولية / جم) أعلى الاب الأعلى، و٤١٢.٩٪ FPase (٠.٢٦٦ وحدة دولية / جم) من الاب الأقل. تم الكشف عن التحسن في كل التخمرات الصلبة والتخمرات السائلة. علاوة على ذلك، وصل التحسن إلى ٣١٠% في β-glucosidase (٠.٦٢ وحدة دولية/جرام) أعلى من الاب الأقل. وأخيرا، كان من الواضح أن تركيز الجلوكوز في القش المعالج مسبقا كان الأعلى (١٠.١ ملغم / مل).

بدأ إنتاج الإيثانول الحيوي بعملية التخمير بإضافة خلايا Saccharomyces cerevisiae. تم استهلاك الجلوكوز بسرعة خلال أول ٤ ساعات من التخمير، ثم تم استهلاكه بشكل كبير بعد ٧٢ ساعة، مما أدى إلى زيادة إنتاج الإيثانول والذي كان أعلى بشكل ملحوظ بعد ٧ أيام. في حين كان الإيثانول الحيوي هو الأدنى الموضح في التخمرات السائلة (٢.٢٣ ± ٠.٠٥ جم / لتر، ٠.٠٢ جم / جم) وأظهر أقصى إنتاج للإيثانول عن طريق تسكر التخمرات الصلبة (٤.٢٠ ± ٠.١٣ جم / لتر، ٠.٠٤ جم / جم).