مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره اول، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۱
صفحه ۲۲-۱۵

بهینه‌سازی محیط کشت تولید باکتری بومی گرمادوست *Cohnella* sp. A01، خالص‌سازی آنزیم کیتیناز و بررسی فعالیت قارچ‌کشی آن

نغمه عبیری[۱]، سعید امین‌زاده*[۲]، محمدرضا بی‌همتا [۳]

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

۲- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

۳- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:aminzade@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

کیتین جزء اصلی کوتیکول حشرات و پوسته سخت‌پوستان بوده دیواره سلولی بیشتر قارچ‌ها، بعضی از جلبک‌ها و نماتدها را تشکیل می‌دهد. کیتینازها از آنزیم‌هایی هستند که نقش تجزیه کیتین نامحلول را بر عهده دارند. باکتری‌ها کیتیناز را برای هضم کیتین تولید می‌کنند، اصولاً آنها از کیتین به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. در این پژوهش جهت بررسی حداکثر تولید آنزیم کیتیناز پنج نوع محیط کشت مختلف مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم کیتیناز از این سویه‌ی بومی ایران (*Cohnella* sp.A01) که توانایی تولید کیتیناز را دارد، خالص‌سازی شد. باکتری بعد از کشت اولیه به محیط پیش‌کشت منتقل شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت باکتری به پنج محیط کشت مختلف که همگی حاوی کیتین کلوئیدی به عنوان جزء اصلی بودند، جهت تولید کیتیناز منتقل شد. بیشترین تولید آنزیم مربوط به تیماری بود که شامل $(NH_4)_2SO_4$ 0.05% و Agar 0.1% بود. سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز به کمک معرف رنگی ۳ و ۵ دی نیترو سالیسیلیک اسید و رسوب‌دهی پروتئین‌ها توسط آمونیوم سولفات انجام شد. بعد از رسوب‌دهی پروتئین‌ها با آمونیوم سولفات میزان فعالیت آنزیمی افزایش یافت. حداکثر عملکرد این باکتری برای تولید آنزیم کیتیناز در این پنج نوع محیط کشت تولید با کمک نرم‌افزار SAS در طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. اثر مهارکنندگی آنزیم نسبتاً خالص‌سازی شده کیتیناز بر روی تعدادی از قارچ‌هایی که عوامل بیماری‌زای گیاهی محسوب می‌شوند نیز مورد بررسی قرار گرفت و اثر مهارکنندگی (ضد قارچی) آنزیم کیتیناز بر روی چهار قارچ بیماری‌زای گیاهی ثابت شد.

واژه‌های کلیدی

اثر ضدقارچی
خالص‌سازی آنزیم
فعالیت آنزیمی
کیتیناز

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.3.0]

مقدمه

کیتین، poly-β-1,4-N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)، دومین بیوپلیمر فراوان در طبیعت بعد از سلولز و جزء اصلی کوتیکول حشرات و پوسته سخت‌پوستان است. کیتین، دیواره سلولی بیشتر قارچ‌ها و بعضی از جلبک‌ها و نماتدها را تشکیل می‌دهد (Flach *et al*., 1992; Gooday, 1996). تولید کیتین و مواد تجزیه شده از آن مانند N-acetylglucosamine و chitooligosaccharides از ضایعات پوسته سخت‌پوستان، بدلیل هزینه بالا، فرآیند محدود و پیچیده‌ای است (Simpson *et al*., 1994; Martinou *et al*., 1995; Aloie *et al*., 1996; Keyhani *et al*., 1999; Khor, 2002; Tharanathan *et al*., 2003). کیتینازها یکی از آنزیم‌هایی هستند که نقش تجزیه کیتین نامحلول را بر عهده دارند. باکتری‌ها کیتیناز را برای هضم کیتین تولید می‌کنند، اصولا آنها از کیتین به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند (Wiwat, 1999). کیتیناز از خانواده آنزیمی E.C 3.2.1.14 بوده که هیدرولیز پیوندهای β-1,4 را در مولکول N-acetyl-β-D-glucosamine در کیتین و کیتین دکسترین انجام می‌دهد. از کیتیناز می‌توان در کنترل بیماری‌های قارچی در گیاهان و حشرات استفاده کرد (Patil *et al*., 2000; Wang *et al*., 2001). در بخش کشاورزی، اثرهای بیولوژیک ضد قارچی در کیتینازهای مختلف که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید شده‌اند، بسیار حائز اهمیت هستند (Tang *et al*., 2001). این اثرها به هیدرولیز کیتین در دیواره سلولی قارچ مربوط می‌شود (Sietsma *et al*., 1979; Fleuri *et al*., 2005).

در این پژوهش آنزیم کیتیناز از باکتری بومی *Cohnella* SP. A01 تولید و خالص‌سازی شد. این باکتری که از خانواده *Paenibacillaceae* و نژاد *Bacillus* است یک باکتری مقاوم به گرما است. نشان داده شده است که این باکتری بعد از قرار گرفتن در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در TS و Nutrient agars در دمای ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس به خوبی رشد می‌کند. این رشد خوب در دمای ۵۵ درجه سلسیوس نیز صورت می‌گیرد (Ash *et al*., 1994). در ادامه اثر مهارکنندگی این آنزیم بر روی سه قارچ آفت گیاهی بررسی شده است.

مواد و روش ها

تولید کیتیناز

کشت اولیه در محیط کشت زیر انجام شد.

Trace element 0.1% ,Yeast extract 0.5%, Tryptone 1%, Pepton 0.03%, NaCl 0.5%, K_2HPO_4 0.07%, KH_2PO_4 0.03%, $CaCl_2.7H_2O$ 0.013%, $MgSo_4.7H_2O$ 0.05%, $(NH4)_2SO_4$ 0.1%, Agar 2%, Glucose 0.2%, Colloid Chitin 0.5% (Zarei *et al*., 2011).

برای تهیه Trace element از ترکیبات زیر استفاده شد.

$ZnSO_4.7H_2O$ 0.014%, $MnSO_4.2H_2O$ 0.016%, $FeSO_4.7H_2O$ 0.05%, $CoCl_2$ 0.02%

بعد از کشت اولیه باکتری به محیط پیش‌کشت منتقل شد. برای محیط پیش‌کشت از ترکیبات زیر استفاده شد.

Trace element 0.1% ,Yeast extract 0.5%, Tryptone 1%, Pepton 0.03%, NaCl 0.5%, K_2HPO_4 0.07%, KH_2PO_4 0.03%, $CaCl_2.7H_2O$ 0.013%, $MgSo_4.7H_2O$ 0.05%, $(NH4)_2SO_4$ 0.1%, Agar 0.2%, Glucose 0.2%, Colloid Chitin 0.5% (Zarei *et al*., 2011).

بهینه‌سازی محیط کشت تولید باکتری *Cohnella* sp. A01 جهت تولید حداکثر آنزیم کیتیناز

جهت بررسی حداکثر تولید کیتیناز توسط باکتری *Cohnella* sp.A01 در محیط کشت تولید، پنج نوع محیط کشت تولید با اجزای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. تمامی محیط کشت‌ها شامل موارد زیر بودند.

Colloid Chitin 0.25%, K_2HPO_4 0.035%, Trace element 0.05%, Yeast extract 0.015%, Pepton 0.015%, NaCl 0.05%, $MgSo_4.7H_2O$ 0.025%, KH_2PO_4 0.015% (Zarei *et al*., 2011).

سپس pH تمامی محیط کشت‌های تهیه شده به ۷/۵ تا ۷/۸ رسانده شد. بعد از تهیه محیط‌های تولید، ۴ml از محیط پیش‌کشت حاوی باکتری *Cohnella sp.A01* که ۲۴ ساعت در محیط پیش‌کشت رشد کرده بود به این پنج محیط تولید متفاوت اضافه شد و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت سه روز بر روی یک

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.3.0]

جدول۱- تیمارهای متفاوت استفاده شده در پنج نوع محیط کشت تولید برای بررسی حداکثر تولید آنزیم کیتیناز

Table 1- Different treatments used in five media with the objective of achieving the maximum production of Chitinase

محیط کشت Culture	تیمارهای متفاوت محیط کشت تولید Different treatment for production culture	منبع Source
1	$(NH_4)_2SO_4$ 0.05%	نیتروژن (شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها) و سولفور (شامل انواع کوآنزیم‌ها) Nitrogen (including amino acids and nucleic acids) and sulfur (including coenzyme)
2	$(NH_4)NO_3$ 0.1%.	نیتروژن (شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها) Nitrogen (including amino acids and nucleic acids)
3	$(NH_4)_2SO_4$ 0.05%, Agar 0.1%	نیتروژن (شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها) و سولفور (شامل انواع کوآنزیم‌ها) Nitrogen (including amino acids and nucleic acids) and sulfur (including coenzyme)
4	Agar 0.1%, $CaCl_2.7H_2O$ 0.0065%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.05%	نیتروژن (شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها) و سولفور (شامل انواع کوآنزیم‌ها) و کلسیم (کوفاکتور برخی آنزیم‌ها) Nitrogen (including amino acids and nucleic acids) and sulfur (including coenzyme) and calcium (cofactor of some enzymes)
5	$(NH_4)_2SO_4$ 0.05%, NaCl 0.25% (افزایش increase)	نیتروژن (شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها) و سولفور (شامل انواع کوآنزیم‌ها) Nitrogen (including amino acids and nucleic acids) and sulfur (including coenzyme)

شیکر با ۱۶۰ دور در دقیقه نگهداری شدند.

سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز

سنجش فعالیت آنزیمی به کمک معرف رنگی ۳ و ۵ دی نیترو سالیسیلیک اسید یا DNS (1gr DNS, 30gr Potassium sodium tartrate, 1.6 gr NaOH) به روش Miller (۱۹۵۹) انجام شد. یک واحد فعالیت آنزیمی به صورت تشکیل یک میکرو مول N-acetylglucosamine در شرایط سنجش در نظر گرفته شد.

خالص‌سازی نسبی توسط آمونیوم سولفات

در دمای ۴ درجه سلسیوس، آمونیوم سولفات به محلولی که از سانتریفوژ محیط کشت (روشناور) بدست آمد، اضافه شد و به

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.3.0]

جدول ۲- پنج قارچ مورد بررسی در این پژوهش

Table 2- plant pathogenic fungus

Rhizctonia solani	قارچ عامل بیماری شیت بلایت برنج و مرگ گیاهچه لوبیا The fungi responsible for Sheath blight of Rice and seedling death of Bean
Bipolaris sp.	عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج Responsible for brown spot disease of Rice
Botrytis cinerea	عامل بیماری کپک خاکستری Responsible for grey mould disease
Macrophomina phaseolina	عامل بیماری پوسیدگی زغال چوب Responsible for Charcoal Rot disease
Alternaria brassicocola	عامل بیماری سوختگی کلزا Responsible for burn Rapeseed disease

مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده و سپس در ۱۷۰۰۰g به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده در حداقل ممکن بافر (بافر Tris- base ۲۰ میلی مولاربا ۸/۵ = pH) حل شد. سپس محلول حاصل در کیسه دیالیز (با اندازه ۱۰kDa) ریخته و دیالیز شد. کیسه دیالیز حاوی محلول به درون ارلن بزرگی که حاوی دو لیتر بافر (بافر Tris- base ۲۰ میلی مولار با ۸/۵ = pH) بود؛ انتقال داده شد. بافر هر ۱۲ ساعت تعویض شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و از بین رفتن نمک محلول داخل کیسه دیالیز، محلول از کیسه خارج شده و سنجش آنزیمی بر روی محلول برای اثبات وجود آنزیم انجام شد(Harrison *et al*., 1993).

بررسی اثرهای ضد قارچی آنزیم خالص‌سازی شده

برای این منظور از پنج قارچ آفت گیاهی استفاده شد. انتخاب این قارچ‌ها به دلیل خسارت بالا و اهمیت آنها است.

ایزوله‌های قارچ در مرکز پتری‌دیش در محیط PDA، کشت داده شدند و برای رشد به مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور ۳۰ ˚C منتقل شدند. زمانی که قطر کلنی قارچ‌ها تقریبا به ۲cm رسید، چهار دیسک کاغذی استریل در فاصله ۲۵ میلیمتری از مرکز پتری‌دیش و در حوالی میسیلیوم‌های قارچ‌ها قرار داده شد و مقادیر مساوی (۵۰ µl) از آنزیم نسبتا خالص شده (بعد از رسوب‌دهی با استن)، آنزیم جوشانده شده به مدت ۱۵ دقیقه، بافر ۲۰ mM Tris- Base و محیط کشت تولید به ترتیب به دیسک‌های یک تا چهار در شرایط استریل اضافه شد. در مرحله بعد پتری‌ها در دمای اتاق و دور از نور، انکوبه شده تا زمانی که رشد کلنی، دیسک‌های کنترل را پوشانده و در عین حال یک هلال در اطراف دیسک حاوی آنزیم با خاصیت ضد قارچی پدید آورد (Lam *et al*., 2000; Ye *et al*., 2000).

تجزیه آماری

داده‌های بدست آمده در این پژوهش در یک طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS (SAS Institute, 1994) تجزیه آماری شدند. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از پنج تیمار محیط کشت تولید در سه تکرار محاسبه شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

تولید آنزیم کیتیناز توسط باکتری *Cohnella* SP. A01 در پنج نوع محیط کشت تولید

پس از سه روز رشد باکتری *Cohnella* SP. A01 در پنج نوع محیط کشت تولید با اجزای متفاوت، سنجش آنزیمی نمونه‌ها در سه تکرار انجام شد و میزان جذب در ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.3.0]

جدول ۳- تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار و سه تکرار که توسط نرم‌افزار SAS بدست آمد.
Table 3- variance analysis in CRD with five treatments and three replications with SAS software

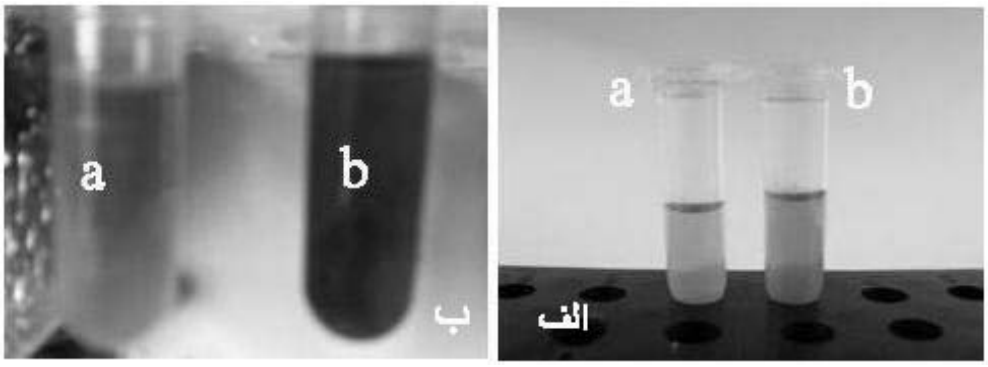
منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی Degrees of Freedom	مجموع مربعات Sum of Squares	میانگین مربعات Mean Square	ارزش F F value
تیمار Treatment	4	1.00185	0.25046	70.46**
خطا Error	10	0.03554	0.00355	
کل Total	14	1.03739		C.V-11.33%

جدول تجزیه واریانس

همانطور که در جدول (۳) مشاهده می‌شود F در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار است یعنی بین تیمارها تفاوت معنی‌داری وجود دارد. همچنین مقدار ضریب تغییرات (C.V) که نشان‌دهنده دقت آزمایش است در حد پایینی است یعنی خطای آزمایشی کم است.

مقایسه میانگین تیمارها

بیشترین تولید آنزیم در تیمار سه که شامل 0.05% $(NH_4)_2SO_4$ و 0.1% Agar بود، بدست آمده است. با توجه به اینکه تفاوت تیمار سه و یک فقط در 0.1% Agar است و نتایج نشان دادند که تفاوت معنی‌داری بین تیمار سه و یک وجود دارد، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که حضور مقدار کمی از آگار در محیط کشت تولید باعث افزایش تولید آنزیم کیتیناز می‌شود و آگار به عنوان یک محرک در محیط کشت عمل کرده است. با بررسی‌های انجام شده از آنجاییکه شباهت زیادی بین ساختار شیمیایی آگار و کیتین مشاهده شد می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مقدار کم آگار در محیط کشت همانند کیتین خاصیت القا کنندگی برای تولید آنزیم کیتیناز را ایفا می‌کند.



شکل ۱- سنجش فعالیت آنزیم الف) قبل از رسوب‌دهی ب) بعد از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات
a) شاهد حاوی سوبسترای کیتینی و بافر
b) نمونه سنجش فعالیت آنزیم حاوی سوبسترای کیتینی و آنزیم

Figure 1- Enzyme Assay A) before precipitation B) After precipitation with Ammonium sulfate
a) substrate (colloidal chitin) and buffer as Control
b) substrate (colloidal chitin) and Enzyme as sample for enzyme assay

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.3.0]

جدول ۴- مراحل خالص‌سازی نسبی کیتیناز از *Cohnella* sp. A01

Table 4- Steps of Chitinase partially purification from *Cohnella* sp. A01

مراحل خالص‌سازی Purification step	فعالیت Activity (Unit)	فعالیت ویژه Special activity (U/mg)	غلظت پروتئین Protein (mg/ml)	Recovery (%)	خلوص (Fold)
محلول ناخالص Unpurified Supernatant	0.9	2.66	0.34	100	1
$(NH_4)_2SO_4$	0.7	3.95	0.18	77	0.9

تولید کیتیناز

سنجش فعالیت آنزیم قبل و بعد از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات نشان داد که رسوب‌دهی موجب تخلیص بیشتر می‌شود. این نتایج در شکل (۱) مشهود است.

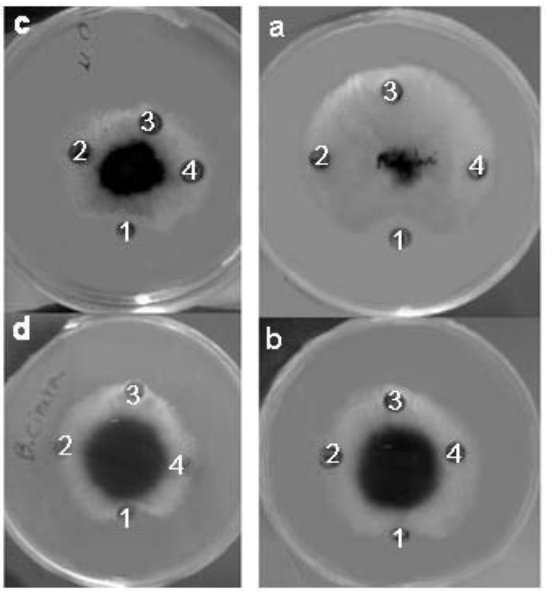
مراحل خالص‌سازی آنزیم کیتیناز مقاوم به گرما از باکتری *Cohnella* sp. A01

بعد از خالص‌سازی نسبی پروتئین برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین از روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده شد. در هر مرحله فعالیت ویژه آنزیم (unit per mg) بررسی شد. نتایج به صورت جدول ۴ است.

فعالیت ویژه معیاری برای خلوص پروتئین است. همانطور که در جدول ۴ مشخص شده است علیرغم اینکه فعالیت آنزیم کاهش پیدا کرده است فعالیت ویژه آنزیم بعد از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات افزایش یافته است یعنی خلوص آنزیم بیشتر شده است

اثرهای کیتیناز خالص شده (بعد از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات) بر روی قارچ‌ها

از میان قارچ‌هایی که در این پژوهش استفاده شد آنزیم کیتیناز توانست رشد چهار قارچ را مهار کند. همانطور که در شکل‌ها مشاهده می‌شود در بخش دیسک یک که آغشته به آنزیم بود قارچی رشد نکرده است. بدین ترتیب خاصیت ضدقارچی آنزیم کیتیناز بر روی چهار قارچ *Rhizctonia solani, Bipolaris sp.*, *Macrophomina phaseolina* , *Botrytis cinerea* مشخص شد.



شکل ۲- اثر مهارکنندگی آنزیم کیتیناز خالص‌سازی شده بر روی قارچ‌های مورد بررسی در این پژوهش.

Figure 2- Antifungal effect of purified chitinase on plant pathogenic fungus.

۱. دیسک ۱ آغشته به آنزیم است (بعد از رسوب با آمونیوم سولفات)

1. Disc 1 enzyme (After precipitation with Ammonium sulfate)

۲. دیسک شماره ۲ آغشته به محیط کشت باکتری

2. Disc 2 bacteria culture

۳. دیسک شماره ۳ آغشته به بافر Tris- Base

3. Disc 3 Tris- Base Buffer

۴. دیسک شماره ۴ آغشته به آنزیم جوشانده شده (۱۵ دقیقه)

4. Disc 4 Inactivated enzyme (boiled 15 min)

5. a) *Rhizctonia solani* b) *Bipolaris sp.* c) *Macrophomina phaseolina* d) *Botrytis cinerea*

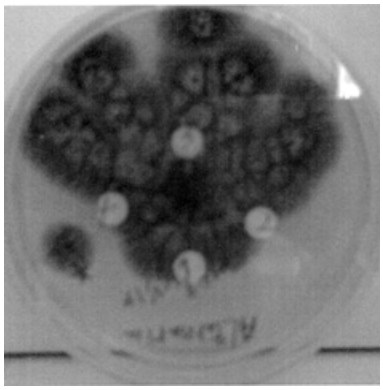
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.3.0]

اثر مهاری کیتیناز حاصل از باکتری بومی جدا شده روی رشد برخی از گونه‌های قارچی و عدم مهار آن را شاید بتوان به نوع سوبسترای کیتینی آن یعنی درصد استیلاسیون کیتین و محل قرارگیری گروه‌های استیل مربوط دانست؛ بدین صورت که دیواره گونه‌های قارچی با زیر نوع‌های (subtypes) کیتینی مختلف بوده به نحوی که کیتیناز حاصل تنها روی برخی از آنها عمل می کند (Sasaki *et al*., 2002).

در پژوهشی که توسط Dahiya و همکاران انجام شد فعالیت ضد قارچی کیتیناز استخراج شده از *Enterobacter* sp. NRG در برابر قارچ پاتوژن گیاهی *R. solani* اثبات شده است (Dahiya *et al*., 2005). همچنین کیتینازهایی با فعالیت ضد قارچی از *Bacillus subtilis* CH426 (Yang *et al*., 2009)، *Bacillus cereus* J1-1 (Wang *et al*., 2001)، *Bacillus* sp. DAU101 (Lee *et al*., 2007) و *Cellulosimicrobium cellulans* 191 (Fleuri *et al*., 2009) استخراج شده است.

بررسی بر روی انتقال و بیان ژن کیتیناز گرمادوست از این باکتری بومی در حال انجام است و امید است در آینده‌ای نزدیک بتوان این ژن را به گیاه هدف انتقال داد. با استفاده از پژوهش‌های صورت گرفته کاندیدای اول برای انتقال این ژن گیاه برنج در نظر گرفته شده است. با انتقال این ژن به گیاه برنج و بیان آنزیم کیتیناز باکتریایی در گیاه برنج می‌توان گیاه برنج را در برابر دو بیماری مهم قارچی، بیماری شیت بلایت که توسط قارچ *Rhizoctonia solani* و بیماری لکه قهوه‌ای که توسط دو گونه قارچ *Bipolaris sp.* ایجاد می‌شود، تا اندازه‌ای مقاوم کرد. همچنین استفاده از کیتیناز به تنهایی (به صورت پاشیدن بر روی گیاه) و هم به صورت ترکیبی با قارچ‌کش‌ها در آینده بسیار مؤثر بوده و از نظر اکولوژیک نیز برای کنترل بیولوژیک بیماری‌های قارچی ایمن خواهد بود (Singh *et al*., 2007).



شکل ۳- قارچ *Alternaria brassicocola* توسط آنزیم خالص شده کیتیناز مهار نشده است. دیسک ۱ آغشته به آنزیم است (بعد از رسوب با آمونیوم سولفات)، دیسک شماره ۲ آغشته به محیط کشت باکتری، دیسک شماره ۳ آغشته به بافر Trise- Base، دیسک شماره ۴ آغشته به آنزیم جوشانده شده (۱۵ دقیقه)

Figure 3- The growth of the *Alternaria brassicocola* is not inhibited by purified chitinase. Disc 1 enzyme (After precipitation with Ammonium sulfate), Disc 2 bacteria culture, Disc 3 Tries- Base Buffer, Disc 4 Inactivated enzyme (boiled 15 min).

منابع

1. Aloise PA, Lumme M, Haynes CA (1996) N-acetyl D-glucosamine production from chitin waste using chitinase from Serratia marcescens. In: Muzzarelli RAA (ed) Chitin enzymology, vol 2. Eur Chitin Soc, Grottammare, pp 581–594.
2. Ash, C., Priest, F. G. & Collins, M. D. (1994). Paenibacillus gen. nov. In Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List no. 51. Int J Syst Bacteriol 44, 852.
3. Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
4. Clewer, A.G., and D.H. Scarisbrick. (2001). Practical Statistics and Experimental Design for Plant Crop Science. John Wiley and Sons, Ltd. England.
5. Dahiya, N.; Tewari, R.; Tiwari, R.P.; Hoondal, G.S. (2005) Chitinase from *Enterobacter sp.* NRG4: its purification, characterization and reaction pattern. *Electronic Journal of Biotechnology* 8:134-145.
6. Flach. J., Pilet P. E., and Jollès P.(1992). Chitin and chitinases research. Experientia 48, pp-701-716.
7. Fleuri, L.F; Sato, H.H. (2005). Produce, Purification, and application the enzyme. Quim. Nova. 28, 871-879.
8. Fleuri, L.F.; Kawaguti, H.Y.; Sato, H.H. (2009) Production, purification and application of extracellular

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.3.0]

chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Braz. J. Microbiol*. 40: 623-630.
9. Gooday G. W. (1996). Aggresive and Defensive Roles for Chitinases. In: Chitin Enzymology, R.A.A. Muzzarelli (ed). Atec Edizioni, Italia. 2:125- 133.
10. Harrison, Roger G., *Protein Purification Process Engineering*, New York: Marcel Dekker, 1993. 115-208.
11. Keyhani, N. O. and S. Roseman (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. Biochim. Biophys. Acta 1473: 108-122.
12. Khor E. (2002). Chitin: a biomaterial in waiting. Curr Opin Solid State Mater Sci; 6:313–7.
13. Lam, Y.W., Wang, H.X., Ng, T.B., (2000). A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive *Allium tuberosum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 279(1):74-80. [doi:10.1006/ bbrc.2000.3821].
14. Lee, Y.S.; Park, I.H.; Yoo, J.S.; Chung, S.Y.; Lee, Y.C.; Cho, Y.S.; Ahn, S.C.; Kim, C.M. Choi, Y.L. (2007) Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus sp*. DAU101 *Bioresour. Technol* 98:2734-2741.
15. Martinou, A., D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis (1995) Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. Carbohydr. Res. 273: 235-242.
16. Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducingSugar, Anal. Chem. 31 426–428.
17. Patil, R.S.; Ghormade, V.; Desphande, M.V. (2000). Review: Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microbial Technol*. 26, 473-483.
18. Peighambari, S.A. (2009). Experimental designs in agricultural sciences, University of Tehran press, 3: 35-69. (In Farsi).
19. Sasaki, C.; Yokoyama, A.; Itoh, Y.; Hashimoto, M.; Watanabe, T.; Fukamizo, T. (2002) Comparative Study of the Reaction Mechanism of Eamily 18 Chitinases from Plants and Microbes. *J Biochem* 131:557-564.
20. SAS Institute. (1994) The SAS System for Windows. Release 6.10. SAS Inst., Cary, NC. USA.
21. Sietsma, J.H. and J.G.H. Wessels, (1979). Evidence for covalent linkages between chitin and β-glucan in fangul wall. J.Gen. Microbiol., 114: 99-108.
22. Singh, P. P., Y. C. Shin, C. S. Park, and Y. R. Chung. (2007). Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology 89:92–99.
23. Simpson, B.K.; Gagne, N. and Simpson, M.V. (1994). Bioprocessing of chitin and chitosan. In: Fisheries Processing: Biotechnological applications. A.M. Martin
24. (Ed.). Chapman and Hall. London. 155-173.
25. Tang, Y., Zhao, J., Ding, S., Liu, S. and Yang, Z. (2001). Purification and properties of chitinase from *Enterobacter aerogenes*. *Wei Sheng Wu Xue Bao (Acta Microbiologica Sinica)*, vol. 41, no. 1, p. 82-86.
26. Tharanathan RN, Kittur FS. (2003) Chitin: the undisputed biomolecule of great potential. Crit Rev Food Sci Nutr; 43:61–87.
27. Wiwat, C., P. Siwayaprahm. (1999). Purification and characterization of chitinase from Bacillus circulans No. 4.1. Cur. Microbiol. 39: 134-140.
28. Wang X, Bunkers GJ, Walters MR, Thoma RS. (2001). Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malava parviflora*). Biochem Biophys Res Commun 282: 1224-1228.
29. Wang, S.L.; Hwang, J.R. (2001) Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. *Enzyme Microb. Technol.* 28:376-382.
30. Yang, C.Y.; Ho, Y.C.; Pang, J.C.; Huang, S.S.; Tschen, J.S.M. (2009) Cloning and expression of an antifungal chitinase gene of novel *Bacillus subtilis* isolated from Taiwan patato field *Bioresour. Technol* 100:1454-1458.
31. Ye, X.Y., Ng, T.B., (2000). Sativin: a novel antifungal miraculin-like protein isolated from legumes of the sugar snap Pisum sativum var. macrocarpon. Life Sciences 67, 775–781.
32. Zarei M, Aminzadeh S, Zolgharnein H, Safahieh A, Daliri M, Akbari Noghabi K, Ghoroghi A, Motallebi A (2011), Characterization of a Chitinase with Antifungal Activity from a Native *Serratia Marcescens* B4A, Brazilian Journal of Microbiology 42: 1017-1029.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-02]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1391.1.1.3.0]