خالص سازی آنزیم کیتیناز ٤٢ از *Trichoderma atroviride* PTCC5220

محمدجواد حریقی[۱و۲]، مصطفی مطلبی[۲] و محمدرضا زمانی[۲]

[۱]پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

[۲]گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه

چکیده

قارچها یکی از عوامل مهم بیماریزا در گیاهان زراعی مختلف می باشند. یکی از راههای کنترل بیماریهای قارچی، محدود کردن رشد قارچها در ریزوسفر گیاه می باشد. از مؤثرترین روشهای مورد استفاده می توان از ژنهای کیتینازی در گیاه جهت تولید آنزیمهای کیتینازی نام برد. این آنزیمها، غالبا با فروپاشیدن اجزای ساختاری قارچها، به مبارزه با این عوامل بیماریزا می پردازند. در میان اجزای ساختاری قارچ، دیواره قارچی، نخستین و مهم ترین سدی است که در برابر اثر آنزیمهای هیدرولازی قرار می گیرد. از این رو، بسیاری از آنزیمهای هیدرولازی بویژه آنزیمهای کیتینازی، وظیفه اختصاصی از بین بردن اجزای تشکیل دهنده دیواره قارچی را بر عهده می گیرند. . باتوجه به اهمیت ویژه آنزیم کیتیناز ٤٢ کیلو دالتونی در این فرآیند، و جهت بررسی تأثیر این آنزیم بر دیواره قارچهای بیماریزا، خالص سازی آن ضروری می باشد. در این تحقیق ۳۱ جدایه مختلف قارچ تریکودرما از نظر تولید آنزیمهای کیتینازی در محیط کشت مایع CZ-DOX واجد کیتین با هم مقایسه شد. جدایه *Trichoderma atroviride* PTCC5220 با فعالیت ویژه آنزیمی ۰/۹۷ U/mg آنزیم کیتیناز بعنوان جدایه برتر انتخاب گردید. جهت خالص سازی آنزیم کیتیناز ٤٢ کیلو دالتونی (Chit42)، از کروماتوگرافی تعویض یونی در بستر CM-Sepharose Fast Flow و DEAE- Sepharose Fast Flow استفاده گردید. نتایج مربوط به خالص سازی با استفاده از بستر CM-Sepharose نشان داد که آنزیم Chit42 همراه با سه پروتئین دیگر بصورت یک قله با فعالیت آنزیمی در ناحیه غلظت نمکی ۰/۵ تا ۰/٦ مولار و در ستون DEAE- Sepharose این آنزیم در ناحیه غلظت نمکی ۰/۲۵ تا ۰/۳۵ مولار خالص می گردد. نتایج حاصل از SDS-PAGE قله بدست آمده از ستون DEAE ، وجود یک باند با وزن ملکولی حدود ٤٢ کیلو دالتون را نشان می دهد. بازده خالص سازی با استفاده از کرماتوگرافی تعویض یونی CM-Sepharose و DEAE بترتیب ٤١/٢ و ٦١/٨ برابر حالت غیر خالص (در محیط کشت مایع) می باشد.

واژه های کلیدی: *Trichoderma atroviride* ،آنزیمهای کیتینازی، CM-sepharose, DEAE-sepharose

مقدمه

کیتین، پلیمری خطی از واحدهایN-acetylglucosamine است که علاوه بر نقش ساختاری که در بدن حشرات و سخت پوستان ایفا می کند، یکی از اجزای مهم دیواره قارچها محسوب می شود. آنزیمهای کیتینازی با شکستن پیوندهای گلیکوزیدی β-1,4 میان زیر واحدها، پلیمر کیتین را به اجزای سازنده اش تجزیه می کنند (۳ و ۱۲). این آنزیمها در طیف وسیعی از موجودات زنده از قبیل باکتریها، قارچها، گیاهان عالی ، حشرات ، سخت پوستان دریائی و برخی از مهرداران یافت می شوند(۲، ۱۱ و ۱۸). قارچهای رشته ای *Terichoderma* sp.، بدلیل ترشح انواعی از آنزیمهای کیتیناز، علاوه بر نقشی که در رشد و تقسیم سلولهای قارچی دارد، بعنوان عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیماریهای ناشی از قارچها مورد استفاده قرار می گیرند (٦، ۱۰ و ۱۱). آنزیمهای کیتینازی این قارچها نسبت

Archive of SID
www.SID.ir

به کیتینازهای ارگانیسمهای دیگر از جمله کیتینازهای گیاهی دارای مزایای متعددی می باشند، بعنوان مثال کیتینازهای گیاهی بر خلاف کیتینازهای قارچی فقط رأس (نوک) هیفهای قارچ پاتوژن را تحت تأثیر قرار می دهند و قادر به تجزیه ساختارهای سخت کیتینی نیستند. همچنین این آنزیمها بتنهایی دارای اثرات ضد قارچی ضعیفی بوده و فقط بر گونه‌های محدودی از قارچها مؤثر می باشند. از سوی دیگر بررسیها نشان داده است که تمام پاتوژنهای دارای کیتین در دیواره نسبت به کیتینازهای قارچ *Trichoderma* sp. حساس می باشند، در عین حال غلظتهای بالای این آنزیمها برای گیاهان اثرات سمی ندارد (۱٤).

از آنزیمهای کیتینازی در زمینه های مختلف از جمله کنترل بیولوژیک بیماریهای گیاهی (۵، ۸ و ۱۵)، تهیه مواد دارویی (۲۲) و بیوتکنولوژی (۱٦) و نیز تولید single-cell proteins (۱۷) و حشره کشها استفاده می شود (۹).

بطور کلی کیتینازهای قارچی به دو دسته اندوکیتینازها و اگزوکیتینازها تقسیم می شوند که از میان آنها کیتیناز ٤۲ کیلو دالتونی نسبت به سایر کیتینازها نظیر کیتیناز ۳۳ و ۳۷ کیلو دالتونی و اگزوکیتینازها نقش مؤثرتری در تجزیه کیتین موجود در دیواره قارچها دارد (۱۳ و ۱۵). بنابراین در این تحقیق ابتدا جدایه برتر از نظر تولید آنزیمهای کیتینازی انتخاب و نسبت به خالص سازی آنزیم Chit42 آن اقدام گردید.

مواد و روشها

جدایه های قارچ تریکودرما و محیط کشت نگهداری : ۳۱ جدایه از قارچ *Trichoderma* که در طول این تحقیق مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته اند عمدتاً از مناطق مختلف ایران جمع آوری شده اند (۷). جهت نگهداری این جدایه ها از محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) استفاده گردید.

آماده سازی سوبسترا جهت بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز: برای القاء آنزیمهای کیتینازی در محیط کشت و نیز بعنوان سوبسترا در سنجش فعالیت کیتینازی، از کیتین کلوئیدی استفاده گردید. برای تهیه سوبسترای مورد نظر، به ۱۰ گرم پودر کیتین، ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد افزوده شده و مخلوط حاصل بمدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای ایجاد Polysaccharide swelling ، به مخلوط فوق، آب اضافه شد و با پارچه صاف گردید. مراحل افزودن آب و صاف کردن محلول، چندین بار تکرار تا اسید موجود در مخلوط کاملا از بین برود. ماده خمیری شکل حاصل، خشک و پودر شد و از آن بعنوان منبع کربن در محیط کشت و سوبسترا در واکنش آنزیمی استفاده شد.

تولید و سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز: جهت تولید آنزیمهای کیتینازی از جدایه های مختلف قارچ تریکودرما در روزهای ۲، ۳، ٤ و ۵ استفاده شد. برای سنجش فعالیت آنزیمهای کیتینازی از روش تغییر یافته Zeilinger و همکاران استفاده گردید (۲۳). مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۲۰۰ میکرولیتر آنزیم و ۲۰۰ میکرولیتر بافر استات سدیم ۱۵ میلی مولار (pH= ٤) دارای ۰/۵ درصد سوبسترا (کیتین کلوئیدی) بود. پس از یک ساعت و در دمای ٤۰ درجه سانتی گراد، با افزودن ۱ میلی لیتر از NaOH یک درصد و سانتریفیوژ محلول حاصل در ٦۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۵ دقیقه، واکنش آنزیمی متوقف شد. برای سنجش میزان N-acetylglucosamine آزاد شده در طول واکنش، پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر بافر پتاسیم تترا بورات (۰/۸ مولار با pH برابر ۸/۹)، مخلوط حاصل، بمدت ۳ دقیقه در آب جوش حرارت داده شد و با افزودن ۳ میلی لیتر واکنش گر DMAB، (ده گرم پودر dimetyl amino benzaldehyde(DMAB) در ۱۰۰ میلی لیتر مخلوط اسید استیک گلاسیال و اسید کلریدریک ۱۰ نرمال بترتیب به نسبتهای ۱۲/۵ و ۸۷/۵ درصد) محلول حاصل بمدت ۲۰

Archive of SID

www.SID.ir

دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس جذب نوری محلول، بلافاصله در طول موج ٥٤٤ نانومتر خوانده شد.

در این آزمایش از N-acetylglucosamine بعنوان استاندارد استفاده گردید. هر واحد فعالیت آنزیمی (U)، عبارت از مقدار آنزیمی است که می تواند در طول یک ساعت واکنش، در دما و pH مشخص، یک میکرومول از N-acetylglucosamine یا الیگومرهایی از آن را آزاد کند (۲۱).

تعیین pH مناسب برای اتصال پروتئین به بستر: جهت تعیین pH مناسب برای اتصال پروتئینهای موجود در محیط کشت به ستون، دامنه pH از ۳ تا ۷/۵ با فواصل ۰/۵ برای ستون CM-Sepharose Fast Flow و ٤ تا ۸/۵ با فواصل ۰/۵ برای ستون DEAE -Sepharose Fast Flow در نظر گرفته شد. به هر لوله یک میلی لیتر از بستر مورد نظر همراه با ۱۰ میلی لیتر بافراستات پتاسیم (۵۰ میلی مولار) با هر یک از pH های مورد مطالعه اضافه گردید. برای به تعادل رساندن بستر، بافر مذکور ۵ بار تعویض گردید. سپس به هر لوله مقادیر مساوی از محلول پروتئینی مورد مطالعه اضافه و بمدت ٢٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. مقدار جذب محلول رویی در ۲۸۰ نانومتر و نیز فعالیت آنزیمی آنها اندازه گیری شد.

کروماتوگرافی تعویض یونی بر بستر CM-Sepharose: جهت خالص سازی آنزیم کیتیناز ٤۲ کیلودالتونی یک ستون کروماتوگرافی به ابعاد ۲۵ × ۲ سانتیمتر (ارتفاع × قطر) انتخاب گردید. مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از بستر CM-Sepharose که بصورت تجاری و به فرم سوسپانسیون می باشد (Pharmacia)، درون بشر ریخته و بر روی آن بافر متعادل کننده استات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH برابر ٤ اضافه گردید. پس از چند بار تعویض بافر، بستر به کمک یک میله شیشه ای بطور یکنواخت و همگن با زاویه ٦۰ درجه به ستون اضافه شده و به سردخانه منتقل گردید. ستون بمدت یک شبانه روز به همان حالت باقی ماند، تا بستر بصورت فشرده درآید. مقدار ۲۰ میلی لیتر از محلول آنزیمی تغلیظ شده که توسط کیسه دیالیز با cut off برابر ۱۲-۱۰ کیلودالتون بمدت ۱۲ ساعت دیالیز گردیده بود به آرامی و با دقت بر روی ستون قرار گرفت. سپس خروجی ستون باز شده تا نمونه وارد بستر شود. ورودی و خروجی ستون را به دستگاه سیرکولاتور متصل، خروجی ستون را باز کرده تا کلیه پروتئینهای موجود در بستر با چرخش درون ستون، فرصت اتصال به بستر را پیدا کنند.

پس از ۱۲ ساعت، ستون را با ١٦۰ میلی لیتر بافر متعادل کننده بصورت یک مرحله ای با سرعت جریان ۲ میلی لیتر در دقیقه شستشو داده و زمان کافی رادر نظر گرفته تا شستشوی پروتئینهای متصل نشده به بستر در نظر گرفته شد. محلول خروجی ستون، مربوط به مرحله شستشو در نمونه‌های ٤ میلی لیتری توسط دستگاه نمونه گیر (Fraction Collector) جمع آوری و مقدار جذب نوری پروتئینهای متصل نشده در ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری گردید. بعد از اینکه مقدار جذب خروجی ستون به صفر رسید، برای جداسازی پروتئینهای متصل شده به بستر، از بافر گرادیان استفاده شد. جهت تهیه بافر در ظرف اول ۲۰۰ میلی لیتر بافر شستشو دهنده و در ظرف دوم ۲۰۰ میلی لیتر بافر جدا کننده (1M NaCl) ریخته شد و به کمک همزن مغناطیسی (با ایجاد گرادیان خطی بافر جدا کننده (۰-1M NaCl) پروتئینهای متصل شده به ستون جدا شدند.گرادیان نمک از نمونه شماره ٤۲ اعمال و سرعت جریان بافر ۲ میلی لیتر در دقیقه و حجم نمونه‌های جمع آوری شده (فراکسیون) بمیزان ٤ میلی لیتر تنظیم گردید. سپس نمونه‌های حاوی بیشترین فعالیت آنزیمی جمع آوری و مخلوط شده و پس از افزودن حجم برابر از استون سرد (۲۰- درجه سانتی گراد)، بوسیله سانتریفوژ در ١٤۰۰۰ rpm رسوب داده شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

کروماتوگرافی تعویض یون بر بستر DEAE-Sepharose: کروماتوگرافی تعویض یونی در رزین DEAE-Sepharose یک تعویض کننده آنیونی ضعیف، انجام شد. مقدار ۱۵ میلی لیتر از رزین با مقدار کافی از بافر استات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH=7.5 (برای تعیین pH بافر مجدداً از تست ده لوله استفاده گردید) شستشو داده شد. ژل آماده شده به ستون دست ساز با قطر۱/۵ سانتیمتر و ارتفاع ۱۶ سانتیمتر منتقل شد.سپس با بافر تا برابر شدن pH بافر ورودی و خروجی ستون ، شسته شد. پس از آن محلول پروتئینی به ستون اضافه گردید و محلول خروجی در حجمهای ۵ میلی لیتر از زیر ستون جمع آوری گردید، تا اینکه جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر به کمتر از ۰/۰۱ رسید. برای جدا شدن پروتئینهای متصل به بستر، از شیب غلظت صفر تا یک مولار کلرید سدیم استفاده شد. جذب کلیه فراکسیونها در طول موجهای ۲۸۰ و ٥٤٤ نانومتر اندازه گیری شد.

بررسی الگوی پروتئینی: جهت بررسی پروتئینهای ترشحی و رسوب دهی آنها از دو روش استفاده گردید: استفاده از استون و نمکهای معدنی. در روش رسوب دهی با استفاده از استن ، محلول حاوی پروتئین ترشحی با حجمی برابر از استون سرد (۲۰- درجه سانتی گراد) به آرامی مخلوط گردید و حدود ۱۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس مخلوط فوق با سرعت ۱٤۰۰۰ rpm و بمدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر، حل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در روش رسوب دهی با نمکهای معدنی از سولفات آمونیوم ۹۰ درصد استفاده گردید. پس از حل کردن مقدار محاسبه شده از نمک سولفات آمونیوم در محلول حاوی پروتئین ترشحی ، محلول نیمه اشباع حاصل حدود ۱۲ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد قرار داده شد. آنگاه پس از ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱٤۰۰۰rpm، رسوب حاصل در یک میلی لیتر آب مقطر دو بار تقطیر کاملاً حل و پس از انتقال به لوله های اپندورف، در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

برای اندازه گیری مقدار پروتئین از روش Bradford استفاده شد (۱) که در آن از پروتئین Bovine (BSA) Serum Albomin بعنوان استاندارد استفاده گردید. برای مشخص کردن خلوص پروتئین از SDS-PAGE استفاده گردید (۲۰). الکتروفورز در سیستم ناپیوسته (Stacking برابر ۵ درصد و Resolving برابر ۱۲ درصد) انجام شد. رنگ آمیزی ژلها با استفاده از رنگ آمیزی Comassiee blue انجام گردید. برای تخمین وزن ملکولی ، از مارکرهای وزن ملکولی استاندارد ساخت شرکت Pharmacia و برنامه نرم افزاری *UVIDoc* استفاده گردید.

نتایج و بحث

قارچ تریکودرما بدلیل ترشح آنزیمهای کیتینازی بعنوان عاملی قوی در کنترل بیولوژیک قارچهای بیماریزا مورد استفاده قرار می گیرد (۵، ۱۵، ۱۹ و ۲۰). این آنزیمها با تجزیه اجزای سازنده دیواره قارچها باعث کنترل عوامل بیماریزا می شوند.

علاوه براین، آنزیمهای کیتینازی در صنایع مختلف کاربردهای فراوانی دارند از جمله در تهیه مواد دارویی (۲۲) و بیوتکنولوژی (١٦). از طرفی با توجه به اینکه کیتین فراوان ترین پلیمر موجود در طبیعت پس از سلولز بشمار می رود لذا می توان با تجزیه آن جهت تأمین منبع کربن و نیتروژن در تولید single-cell proteins استفاده نمود (۱۷). همچنین در تولید حشره کشها از مواد شیمیایی مختلفی استفاده می شود که باعث خطرات زیست محیطی می گردد. از آنجا که در ساختار پوششی حشرات مقدار قابل توجهی کیتین وجود دارد لذا از آنزیمهای کیتینازی که فاقد اینگونه مخاطرات است می توان جهت تولید حشره کشها استفاده نمود (۹). باتوجه به اهمیت ویژه

Archive of SID
www.SID.ir

آنزیم کیتیناز ٤٢ کیلو دالتونی نسبت به سایر آنزیمهای کیتینازی (۱۵)، در این تحقیق تولید و خالص سازی این آنزیم مورد مطالعه قرار گرفت.

با توجه به تنوع گونه ای موجود در ۳۱ ایزوله جمع آوری شده از قارچ تریکودرما، برای شناسایی جدایه برتر از نظر تولید آنزیم کیتینازی از این جدایه ها که در محیط کشت PDA واجد آنتی بیوتیک رشد داده شده بودند، اسپور تهیه و جهت تلقیح محیط مایع CZ-DOX حاوی گلوکز (محیط مناسب برای تندش اسپور و تولید میسلیوم) استفاده گردید. میسلیومهای تولید شده جهت تلقیح محیط مایع CZ-DOX حاوی کیتین کلوئیدی مورد استفاده قرار گرفت. کیتین کلوئیدی موجود در محیط کشت از طرفی بعنوان منبع کربن جهت تولید آنزیمهای کیتینازی عمل نموده ضمن اینکه بعنوان یک عامل القاء کننده تولید آنزیمهای مذکور محسوب می گردد. برای بررسی و مقایسه تولید و فعالیت آنزیم کیتیناز در این ۳۰ جدایه تریکودرما، جدایه ها در این محیط کشت جهت تولید آنزیمهای کیتینازی کشت داده شده و فعالیت آنزیمی آنها مقایسه گردید (جدول ۱). بررسی فعالیت آنزیمی جدایه های مورد مطالعه نشان می دهد که این جدایه ها، از نظر تولید آنزیم کیتینازی، تنوع نسبتاً زیادی را از خود نشان می دهند، ضمن اینکه، جدایه *T. atroviride* (PTCC 5220) با فعالیت آنزیمی U/ml ۲/۹۷ و فعالیت ویژه آنزیمی U/mg ۰/۹۷ (روز سوم) بعنوان فعالترین جدایه از نظر تولید آنزیمهای کیتینازی مشخص گردید .

با توجه به اینکه برخی گیاهان، قارچها و باکتریها دارای آنزیمهای کیتینازی می باشند لذا گزارشهای متعددی در خصوص خالص سازی این آنزیمها با استفاده از ستونهای کروماتوگرافی مختلف وجود دارد. Chao-Yun و همکارانش برای جداسازی کیتیناز دانه گیاه *Benincasa hispida* از کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از بستر CM-Sepharose استفاده کردند (۲). Kazuo Kando و همکارانش اقدام به جداسازی و تخلیص آنزیم کیتیناز قارچ *Trichoderma viride* توسط ستون کروماتوگرافی جذبی نمودند (۱۰). همچنین Wen و همکارانش با استفاده از ستون کروماتوگرافی Hydrophobic Penyl sepharose) (interaction column و سپس کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون بر روی بستر Sephadex G-75 آنزیم کیتیناز *Bacillus sp. NCTU2* را بطور خالص تهیه و مورد بررسی و مطالعه قرار دادند (۲۲).

در این تحقیق آنزیم کیتیناز ٤٢ کیلو دالتونی از جدایه *T. atroviride* خالص سازی و برخی از خصوصیات ملکولی آن مورد مطالعه قرار گرفت. خالص سازی آنزیم مذکور با استفاده از روش کروماتوگرافی تعویض یونی دو مرحله ای انجام شد. در مرحله اول از ستون کاتیونی CM Sepharose استفاده گردید. جهت افزایش کارائی ستون، شرایطی مورد بررسی قرار گرفت که در آن بیشترین مقدار از پروتئین مورد نظر بصورت اختصاصی به ستون متصل شود و پروتئینهای دیگر تا حد امکان به بستر متصل نگردند. اتصال به بستر با واسطه برهم کنشهای الکترواستاتیک صورت می پذیرد که خود این برهم کنشها تابع pH و قدرت یونی محیط می باشند. از آنجائیکه pI کیتیناز ٤٢ کیلودالتونی، حدود ٦ می باشد (٤) بنابراین کیتیناز در pH=4 بار مثبت پیدا کرده به ستون فوق متصل می شود. بنابراین با تهیه بسترهای ستون تعویض یونی با pH های مختلف بین ۳ تا ۷/۵ با فاصله های ۰/۵، مقادیر یکسانی از نمونه پروتئینی اولیه در این بسترها وارد گردید. نتایج بررسی میزان آنزیم کیتیناز متصل نشده به بسترها در pH های مختلف نشان داد که مناسبترین pH جهت خالص سازی توسط کروماتوگرافی تعویض یونی ٤ می باشد (شکل ۱). زیرا در این pH مقدار پروتئین آزاد و نیز فعالیت آنزیمی کاهش محسوسی را نشان می دهد. جذب پائین در ۲۸۰ نانومتر نشان دهنده اتصال بیشتر پروتئینها به بستر بوده ضمن اینکه فعالیت آنزیمی کم محلول روی

Archive of SID

www.SID.ir

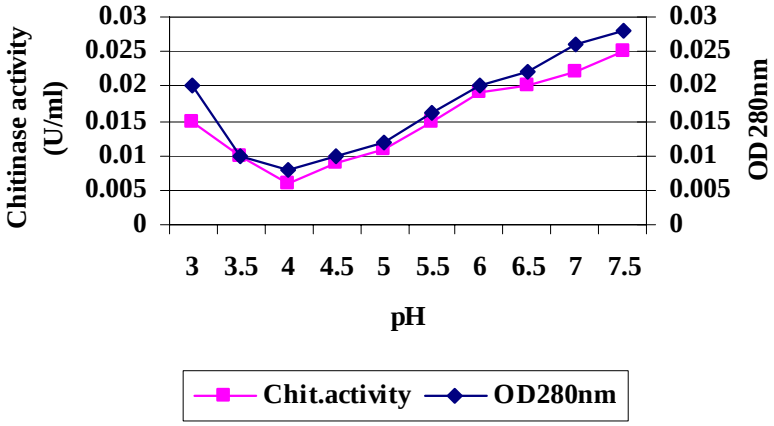
جدول ۱) میزان تولید آنزیمهای کیتینازی در جدایه های مختلف قارچ تریکودرما در روزهای دوم، سوم، چهارم و پنجم براساس میزان فعالیت آنزیم (U/ml) و فعالیت ویژه آنزیمی (U/mg).

نام جدایه	دوم	روز	سوم	روز	چهارم	روز	پنجم	روز
	U/ml	U/mg	U/ml	U/mg	U/ml	U/mg	U/ml	U/mg
Trichoderma sp.(T1)	0.105	0.175	0.136	0.136	0.1	0.06	0.1	0.17
Trichoderma sp.(T2)	0.231	0.42	0.31	0.41	0.2	0.23	0.25	0.25
Trichoderma sp.(T3)	1.15	0.4	1.6	0.47	0.9	0.23	0.15	0.03
Trichoderma sp.(T4)	0.257	0.4	0.36	0.36	0.2	0.125	0.2	0.13
Trichoderma sp.(T6)	1.431	0.54	1.86	0.2	1	0.23	0.1	0.44
Trichoderma sp.(T7)	0.11	0.38	0.19	0.27	0.06	0.075	0.05	0.05
Trichoderma sp.(T9)	0.22	0.47	0.31	0.38	0.1	0.095	0.1	0.13
Trichoderma sp.(T10)	0.3	0.16	0.92	0.41	0.2	0.06	0.12	0.03
Trichoderma sp.(T11)	2.1	0.84	2.86	0.91	1.8	0.51	1.5	0.39
Trichoderma sp.(T12)	2.64	0.87	3.11	0.95	2.3	0.58	0.2	0.05
Trichoderma sp.(T13)	0.142	0.36	0.48	0.53	0.1	0.07	0.09	0.05
Trichoderma sp.(T24)	1.17	0.7	1.73	0.66	0.9	0.25	0.08	0.02
Trichoderma sp.(T26)	0.36	0.3	0.85	0.37	0.2	0.06	0.15	0.04
T. harzianum (T7)	0.48	0.3	1.23	0.51	0.31	0.1	0.26	0.07
T. harzianum (T8)	0.19	0.41	0.65	0.59	0.12	0.08	0.1	0.19
*T. longibrachiatu*m (T5)	0.26	0.68	0.38	0.54	0.21	0.23	0.18	0.15
T. longibrachiatum (T6)	0.27	0.54	0.5	0.5	0.21	0.16	0.19	0.12
T. hamatum (T12)	0.37	0.42	0.53	0.48	0.31	0.19	0.26	0.13
T. viride(T1)	0.13	0.11	0.27	0.12	0.09	0.03	0.07	0.02
T. viridae (T2)	0.157	0.14	0.3	0.11	0.1	0.29	0.08	0.02
T. virens (T9)	0.53	0.48	0.7	0.3	0.3	0.1	0.27	0.03
T. virens (T10)	1.36	0.46	1.73	0.66	0.9	0.3	0.24	0.08
T. koningii (T11)	0.184	0.184	0.36	0.18	0.1	0.26	0.08	0.02
T.parceramosum (T3)	0.150	0.3	0.31	0.28	0.1	0.18	0.1	0.16
T. parceramosum (T4)	0.126	0.315	0.21	0.21	0.09	0.06	0.05	0.021
T. atroviride (PTCC5220)	2.18	**0.87**	2.9	**0.97**	1.6	**0.4**	1	**0.23**
Trichoderma Sp. (PTCC5138)	0.12	0.34	0.83	0.8	0.08	0.04	0.07	0.03
T. koningii (PTCC5139)	0.13	0.41	0.67	0.65	0.07	0.07	0.06	0.05
T. lebgibrachiatum (PTCC5140)	0.2	0.45	0.56	0.78	0.12	0.12	0.1	0.12
T. reesei (PTCC5142)	0.136	0.28	0.59	0.58	0.1	0.15	0.08	0.04
T. viride (PTCC5157)	0.16	0.41	0.36	0.4	0.1	0.12	0.08	0.05

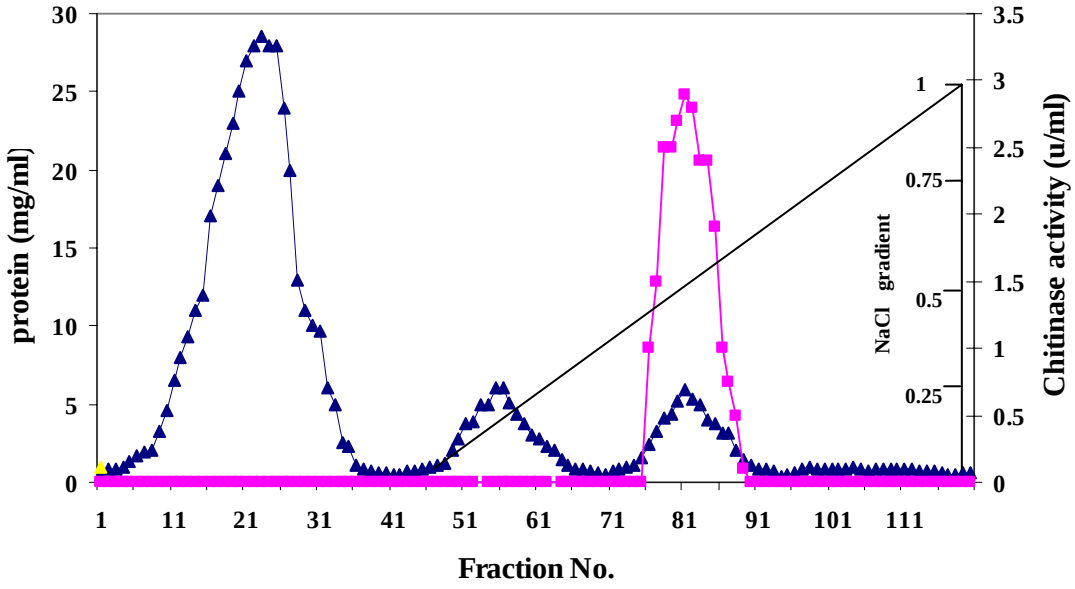
بستر بیانگر اتصال اختصاصی آنزیم به بستر می باشد (شکل ۱). آنزیم کیتیناز بدست آمده از جدایه *T. atroviride* که در محیط مایع CZ-Dox واجد کیتین کلوئیدی بعنوان محیط القایی کشت داده شده بود، پس از رسوب دهی با سولفات آمونیوم و انجام دیالیز (cut off برابر ۱۲- ۱۰ کیلو دالتون) جهت خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ستون با استفاده از بافر استات سدیم (pH برابر ٤) به تعادل رسید. سپس مقدار ۲۰ میلی لیتر از محلول نمونه پروتئینی با فعالیت ویژه آنزیمی U/mg ۲ به ستون اضافه گردید. در این مرحله ستون با بافر اولیه تا هنگامی شستشو داده شد که تمام پروتئینهایی که به ستون متصل نشده بودند از ستون خارج گردیدند. در مرحله شستشو تعداد ٤۲ فراکسیون ٤ میلی لیتری جمع آوری گردید. اندازه گیری مقدار پروتئین این فراکسیونها نشان داد که فراکسیونهای شماره ۲ تا ۳۹ حاوی مقادیر مختلف پروتئین بوده ولی فاقد فعالیت آنزیمی می باشند (شکل ۲).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱) مقدار پروتئین و میزان فعالیت آنزیمی محلول روی بستر CM-Sepharose در pH های مختلف در تست ۱۰ لوله



شکل ۲) کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی با استفاده از ستون CM-Sepharose Fast Flow

برای جدا کردن پروتئینهای متصل شده به ستون از فراکسیون ٤٣ به بعد، از شیب غلظت نمکی صفر تا یک مولار NaCl استفاده گردید. اندازه گیری مقدار پروتئین، فعالیت آنزیمی و فعالیت ویژه آنزیمی هر یک از فراکسیونهای شماره ٤٣ تا ١٢٠ نشان داد که فراکسیونهای ٥٠ تا ٦٨ و ٧٦ تا ٩٣ حاوی مقادیر مختلف پروتئینی بوده در حالیکه فقط فراکسیونهای شماره ٧٦ تا ٨٩ فعالیت آنزیم کیتینازی (٠/٧ U/ml– ٠/٢) از خود نشان می دادند (شکل ٢). این فراکسیونها (٧٦ تا ٨٩) در ناحیه غلظت نمکی بین ٠/٥ تا ٠/٦ مولار از ستون خارج شده اند. بررسی فعالیت ویژه آنزیمی فراکسیونهای مختلف نشان داد که فراکسیونهای ٧٦ تا ٨٩ (مرحله اعمال شیب نمکی) دارای فعالیت ویژه ای برابر ٠/٦٦ U/mg– ٠/٤١ می باشند. روش خالص سازی آنزیم کیتیناز ٤٢ کیلو دالتونی در کروماتوگرافی تعویض یونی (CM-Sepharose) نشان داد که این روش می تواند میزان فعالیت ویژه آنزیمی را از

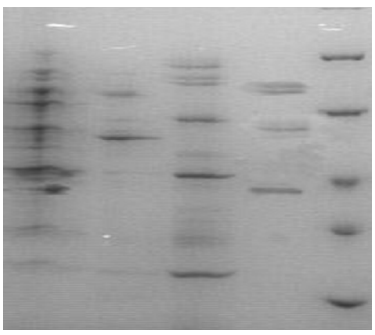
www.SID.ir

۰/۹۷ U/mg قبل از رسوب دهی و خالص سازی به U/mg ٤٠ بعد از خالص سازی و به میزان ٤١/٢ برابر افزایش دهد (جدول ٢).

جدول ٢) مراحل و میزان خالص سازی آنزیم Chit42 جدایه *Trichoderma atroviride* با استفاده از دو ستون CM-Sepharose و DEAE-Sepharose.

مراحل	Protein (mg)	Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield	Purification fold
محیط صاف شده	2350	2300	0.97	100	1
رسوب	600	1200	2	52.1	2
CM-Sepharose	8	160	40	6.9	41.2
DEAE- Sepharose	0.5	30	60	1.3	61.8

برای مشاهده میزان خلوص آنزیم از SDS-PAGE استفاده گردید. بدین منظور فراکسیونهای شماره ٧٦ تا ٨٩ که دارای فعالیت آنزیمی بودند با یکدیگر مخلوط و پروتئینهای موجود در نمونه های مخلوط شده پس از رسوب دهی با استون سرد مورد مطالعه قرار گرفتند. الگوی پروتئینی بدست آمده نشان داد که در این فراکسیونها (٧٦ تا ٨٩ بعد از اعمال شیب غلظت نمک)، علاوه بر یک باند پروتئینی با وزن ملکولی تقریبی ٤٢ کیلو دالتون، سه باند پروتئینی با وزن ملکولی بالاتر نیز مشاهده می شوند (شکل ٣).



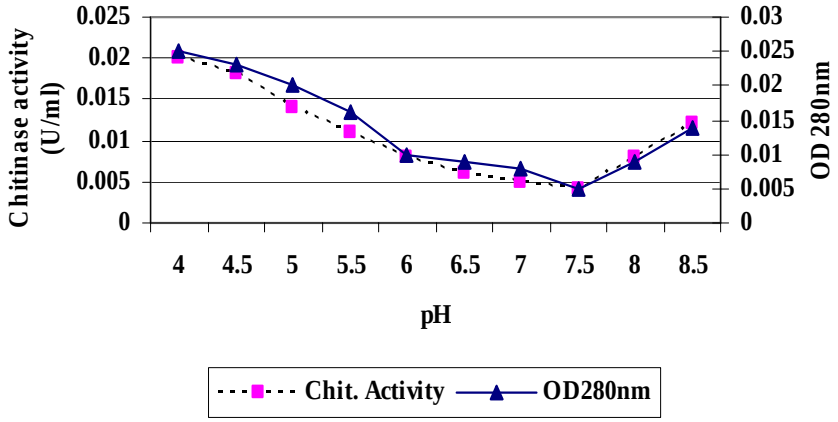
شکل ٣) الگوی پروتئینی مربوط به پروتئینهای جدایه *T. atroviride* قبل و بعد از خالص سازی بوسیله ستون کروماتوگرافی CM-Sepharose ، ١) قبل از خالص سازی، ٢) فراکسیونهای شماره ٦٨-٥٠ (مربوط به قله دوم خالص سازی)، ٣) فراکسیونهای شماره ٣٩-٢ (مربوط به قله اول خالص سازی)، ۴) فراکسیونهای شماره ٩٣-٧۶ (مربوط به قله سوم خالص سازی)، M مارکر

در مرحله دوم خالص سازی از ستون DEAE Sepharose استفاده گردید. در این مرحله نیز جهت اتصال بیشتر آنزیم مورد نظر به ستون، pH های مختلف بین ٤ تا ٨/٥ با فاصله های ٠/٥ مورد بررسی قرار گرفت. مقدار پروتئین و میزان فعالیت آنزیمی در محلول رویی بسترها نشان داد که مناسبترین pH برابر ٧/٥ می باشد (شکل ٤). جهت خالص سازی آنزیم کیتیناز ٤٢ کیلو دالتونی از سایر پروتئینهای موجود، محتویات فراکسیونهای ٧٦ تا ٨٩ بدست آمده از ستون CM Sepharose پس از رسوب دهی به ستون DEAE Sepharose اضافه گردید. . ابتدا ستون با استفاده از بافر استات سدیم (pH برابر ٧/٥) به تعادل رسید. سپس مقدار ٢/٥ میلی لیتر محلول نمونه پروتئینی فراکسیونهای ٧٦ تا ٨٩ مرحله اول با فعالیت ویژه آنزیمی ٤٠ U/mg به ستون اضافه گردید. در این مرحله ستون با بافر اولیه تا هنگامی شستشو داده شد که تمام پروتئینهایی که به ستون متصل نشده بودند از ستون خارج گردیدند. در مرحله شستشو تعداد ٢٥ فراکسیون ٥ میلی لیتری جمع آوری گردید. اندازه گیری مقدار پروتئین این فراکسیونها نشان داد که فراکسیونهای شماره ٤ تا ٢٣ حاوی مقادیر مختلف پروتئین بوده ولی فاقد فعالیت آنزیمی می باشند.

برای جدا کردن پروتئینهای متصل به ستون از فراکسیون ٢٦ به بعد، از شیب غلظت نمکی صفر تا یک مولار NaCl

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده گردید. اندازه گیری مقدار پروتئین، فعالیت آنزیمی و فعالیت ویژه آنزیمی هر یک از فراکسیونهای شماره ۲۶ تا ۸۰ نشان داد که فراکسیونهای ۲۸ تا ۵۲ و ۵۶ تا ۷۰ حاوی مقادیر مختلف پروتئینی بوده در حالیکه فقط فراکسیونهای شماره ۳۶ تا ۴۰ فعالیت آنزیم کیتینازی (۱–۲/۵ U/ml) از خود نشان می دادند. این فراکسیونها (۳۶ تا ۴۰) در ناحیه غلظت نمکی بین ۰/۲۵ تا ۰/۳۵ مولار از ستون خارج شده اند.



شکل ۴) مقدار پروتئین و میزان فعالیت آنزیمی محلول روی بستر DEAE-Sepharose در pH های مختلف در تست ۱۰ لوله

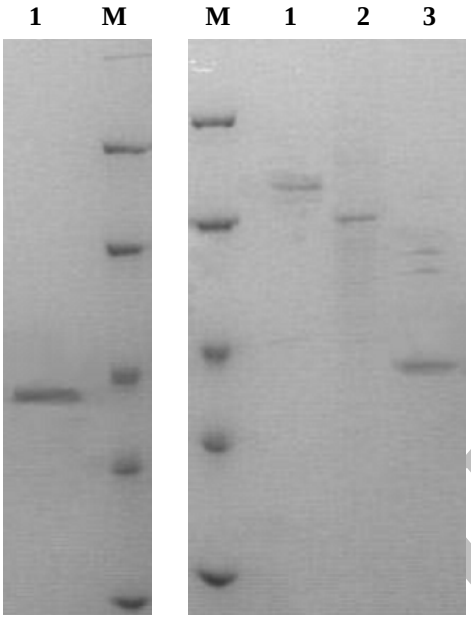
بررسی فعالیت ویژه آنزیمی فراکسیونهای مختلف نشان داد که فراکسیونهای ۳۶ تا ۴۰ (مرحله اعمال شیب نمکی) دارای فعالیت ویژه ای برابر ۱–۰/۳۳ U/mg می باشند. روش خالص سازی آنزیم کیتیناز ۴۲ کیلو دالتونی در کروماتوگرافی تعویض یونی (DEAE-Sepharose) نشان داد که این روش می تواند میزان فعالیت ویژه آنزیمی را از ۴۰ U/mg قبل از خالص سازی توسط این ستون به ۶۰ U/mg بعد از خالص سازی و به میزان ۱/۵ برابر افزایش دهد (جدول ۲). همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود میزان خلوص آنزیم کیتیناز از ۰/۹۷ U/mg در محیط کشت اولیه قبل از رسوب دهی توسط آمونیوم سولفات و در مرحله خالص سازی توسط ستونهای CM Sepharose و DEAE به ۶۰ U/mg و بمیزان ۶۱/۸ برابر خالص سازی شده است.

برای مشاهده میزان خلوص آنزیم از SDS-PAGE استفاده گردید. بدین منظور بخشی از محلول حاوی پروتئین فراکسیونهای شماره ۳۶ تا ۴۰ که دارای فعالیت آنزیمی بودند با یکدیگر مخلوط و پروتئینهای موجود در نمونه های مخلوط شده پس از رسوب دهی با استون سرد مورد مطالعه قرار گرفتند. الگوی پروتئینی بدست آمده نشان داد که علاوه بر یک باند قوی پروتئینی با وزن ملکولی حدود ۴۲ کیلو دالتون، دو باند ضعیف با وزن ملکولی بیشتر نیز در این فراکسیونها دیده می شود (شکل ۵ الف). نتایج SDS-PAGE مربوط به دو فراکسیون شماره ۳۷ و ۳۸ نشان داد که این فراکسیونها حاوی فرم خالص آنزیم کیتیناز ۴۲ دالتونی می باشند (شکل ۵ ب).

از آنزیم chit42 خالص شده می توان جهت مطالعه ملکولی این آنزیم و نیز بررسی اثر آن بر دیواره قارچهای بیماریزا در شرایط *in vitro* و همچنین نحوه استفاده از آن در سایر کاربردهای صنعتی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی: هزینه های اجرای این تحقیق از محل طرح شماره ۲۴۸ پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تأمین شده است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می گردد.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۵) الف: الگوی پروتئینی مربوط به پروتئینهای جدایه *T. atroviride* قبل و بعد از خالص سازی بوسیله ستون کروماتوگرافی DEAE-Sepharose ، ۱) فراکسیونهای شماره ۲۳-۴ (مربوط به قله اول خالص سازی)، ۲) فراکسیونهای شماره ۷۰-۵۶ (مربوط به قله سوم خالص سازی)، ۳) فراکسیونهای شماره ۵۲-۲۸ (مربوط به قله دوم خالص سازی)،

ب: فرم خالص شده پروتئینهای فراکسیونهای شماره ۳۷ و ۳۸، M مارکر

منابع

1-Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry *72*, 248-254.

2-Chao-Yun T. SHIH, Anwar A . KHAN, Shifang J IA, Junlin Wu, and Ding S. SHIH2.(2001).Purification, Characterization, and Molecular Cloning of a Chitinase from the Seeds of *Benincasa hispida*.Biosci, Biotechnol, Biochem.,65(3), 501-509

3-Cohen-Kupiec R., Chet I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. Current Opinion in Biotechnology *9*, 270-277.

4-De la Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benítez, T., Pintor-Toro, J.A. & Llobell, A. (1992) Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. *Eur. J. Biochem.* 206, 856–867

5-De la Vega H., Specht C.A., Liu Y., and Robbins P.W. (1998). Chitinases are a muti-gene family in *Aedes*, *Anopheles* and *Drosophila*. Insect Molecular Biology. 7: 233-239.

6-De Marco J. L., Lima L. H. C. , De Sousa M. V., Felix C. R. (2000). A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathoge *Crinipellis perniciosa* , the causal agent of witches' broom disease of cocoa. World journal of Microbiology and Biotechnology *16*, 383-386.

7-Ghoujeghi F., M**.** Motallebi**.** and M.R. Zamani. 2005. "Enzyme production and amplification of cellobiohydrolase (CBH) gene from *Trichoderma* sp.". Iranian Journal of Biology. 18(1): 15-23.

8-Haran S., Shickler H., Chet I. (1996). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology *142*, 2321-2331.

9-Herrera-Estrella A., and Chet I., (1999). Chitinases in biological control. Exs. 87: 171-184.

Archive of SID
www.SID.ir

10-Kazuo Kondo, Michiaki Matsumoto and Shizuo Nishide. (1999). Production of Chitinase from *Trichoderma Viride* and the Enzymatic Property. Kyotanabe 610- 0321, Japan

11-Kuranda M.J. and Robbins P.W..(1991).Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*.The Journal of biological chemistry. 266(29):19758- 19767

12-Li S., Zhao Z.A., Li M., Gu Z.R., Bai C., and Huang W.D. (2002). Purification and chracterization of a novel chitinase from *Bacillus brevis*. ACTA Biochimica et Biophysica Sinica. 34(6): 690-696.

13-Limon M. C., Lora J. M. , Garcia I., De la Cruz J., Liobell A., Benitez T., Pintor-Toro J. A. (1995). Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. Curr. Genet. *28*, 478-483.

14-Lorito M., Harman G. E. , Hayes C. K., Broadway R. M., Tronsmo A., Woo S. L., Di Pietro A. (1993). Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*; Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. Phytopathology *83*, 302-307.

15-Lorito M., Woo S.L., fernandez I.G., Colacci C., Harman G.E., Pintor Toro J.A., Filippone E., Muccifora S., Lawrence C.B., Zoina A., Tuzun S., and Scala F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proceeding of the National Academy of Sciences, USA. 95: 7860-7865.

16-Muzzarelli R.A.A. and Peter M.G. (1997). Chitin handbook. European Chitinase Society, Atec Grottammare, Italy.

17-Revah-Moiseev S. and Carroad A. (1981). Conversion of the enzymatic hydrolysate of shellfish waste chitin to single-cell protein. Biotechnol. Bioeng. 23: 1067-1078.

18-Rojas-Avelizapa L. I., Cruz-Camarillo R. , Guerrero M. I., Rodriguez-Vazquez R., Ibarra J. E. (1999). Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. World journal of Microbiology and Biotechnology *15*, 261-268.

19-Sreenivasaprasad S., Manibushanrao K. (1993). Efficacy of *Glyocladium virens* and *Trichoderma longibrachiatum* as biological control agents of groundnut root and stem rot diseases. International journal of Pest Management 39, 167-171.

20-Tronsmo A., Hjeljord L. G. (1995). *Trichoderma harzianum* used in biological control of diseases on apples in Norway. In Fifth international Trichoderma and Glyocladium workshop (Beltsville).

21-Ulhoa C. J., Peberdy J. F. (1992). Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. Enzyme Microb. Technol. *14*, 236-240.

22-Wen C.M., Tseng C.S., Cheng C.Y., and Li Y.K.,(2002).Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus sp. NCTU*2 .Biotechnol. Appl. Biochem. 35’ 213- 219 (Printed in Great Britain)

23-Zeilinger S., Galhaup C. , Payer K., Woo S. L., Mach R. L., Fekete C., Lorito M., Kubicek C. P. (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genetics and Biology *26*, 131-140.

Archive of SID

www.SID.ir

Purification of chitinase 42 from *Trichoderma atroviride* PTCC5220

Harighi M.J[1,2.], Motallebi M[1]., and Zamani M.R.[1]

[1]National Institute for Genetic Engineering & Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

[2]Biology Dept., Faculty of Science, Razi Univ., Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

Chitinases are widely distributed in nature and play important roles in degradation of chitin. Chitin, a linear polymer of N-acetylglucosamine residues, has been the most abundant polymer in nature after cellulose. It plays a major role in fungal cell walls. Chitinase enzymes degrade the chitin polymer into its component residues by breaking the β-1,4 glycosidic bonds. As a producer of a variety of chitinase enzymes, the filamentous fungus, *Trichoderma* sp., has become an important means of biological control for fungal diseases.

The aim of this study was to identify a *Trichoderma* sp. isolate with over production of chitinase. *Trichoderma atroviride* PTCC5220 was selected as over producer of chitinase enzyme among 31 different isolates of *Trichoderma* sp. Also chitinase 42 kDa (Chit42) was purified from supernatants of *T. atroviride* grown in medium supplemented with colloidal chitin as the sole carbon source. Enzyme purification was achived in two steps ion exchange chromatography using CM-Sepharose and DEAE-Sepharose. Elution of the column was carried out with 1 M NaCl gradient. The purity of chit42 was investigated by SDS-PAGE. The results showed one band about 42 kDa after the second step of chromatography. The purified protein showed chitinase activity in enzyme assay technique.

Key words: *Trichoderma atroviride*- chitinase- CM-Sepharose- DEAE- Sepharose.

Archive of SID

www.SID.ir