فصلنامه انسان و محیط زیست، شماره ۴۵، تابستان ۹۷

امکان‌سنجی تولید کیتیناز از جدایه بومی *Beauveria bassiana*

معصومه کردی [۱]

الناز فهیمی [۲]

ناصرفرَخی [۳*]

n_farrokhi@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۴ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۲۴**

چکیده

کنترل بیولوژیک روش جایگزین مناسبی برای روش‌های شیمیایی مبارزه با آفات می‌باشد. قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria* spp. میزبان هدف را از طریق نفوذ در کوتیکول، با ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده کوتیکول از قبیل کیتینازها مورد حمله قرار می‌دهد. کیتینازها قادرند کیتین را هیدرولیز نمایند و در زمینه‌های مختلفی از جمله کنترل بیولوژیک، اصلاح زیستی آب دریا، تولید حشره‌کش‌ها و مواد دارویی استفاده می‌شود. در این تحقیق فعالیت‌های آنزیم کیتیناز در قارچ *Beauveria bassiana* که در سه محیط مختلف کشت داده شده بود به روش رنگ‌سنجی مورد مطالعه قرار گرفت. گونه قارچی بومی استفاده شده از مینودشت با قدرت بیماری‌زایی بالا جداسازی و شناسایی گردید، نتایج نشان داد که بیش‌ترین غلظت آنزیم کل مربوط به محیط کشت P(7) می‌باشد. بیش‌ترین فعالیت آنزیم در محلول رویی محیط کشت Pontecorvo با pH = ۷ ، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان نمونه آنزیمی، در روز سوم کشت و در حضور کیتین‌کلوئیدی ۰/۷۵ درصد اندازه‌گیری شد، که نتایج حاصله می تواند در تولید بیشتر آنزیم کیتناز بکار گرفته شود و بدین ترتیب شاهد کاربرد آن در کنترل بیولوژیک به‌منظور حفظ سلامت انسان و محیط زیست باشیم.

کلمات کلیدی: *Beauveria* spp.، کیتین، آنزیم کیتیناز، کنترل بیولوژیک.

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه علوم و زیست‌فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهرود، شاهرود، ایران.

۳- استادیار گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. *(مسوول مکاتبات)

Human & Environment., No. 45, Summer 2018

Chitinase production from a native isolate of *Beauveria bassiana*

Masoumeh Kordi [1]
Elnaz Fahimi [2]
Nasser Farrokhi [3*] *(Corresponding Author)*
n_farrokhi@sbu.ac.ir

Abstract

Biological control is a suitable substitute technique for chemical battle with pests. Enthomopathogenic fungus *Beauveria* spp. attacks its target host by penetrating into cuticle through secretion of hydrolytic enzymes such as chitinases. Chitinases are capable of hydrolyzing chitins with many other applications in biocontrol, sea bioremediation, and development of biopesticides, pharmaceuticals. In this research, chitinase enzyme activities from *Beauveria bassiana* fungus, cultured in 3 culture media, were measured through a colorimetric assay. A native isolate with high mortality rate isolated and identified from Minoodasht. The highest chitinase activity was achieved at day 3 when incubated at 50 ˚C in Pontecorvo medium containing 0.75% colloidal chitin (pH = 7). Our results might be useful for higher production of chitinase that can be implemented in biological control and further elevate human health and environmental biosafety.

Key words: *Beauveria* spp., chitin, chitinase enzyme, Biological control.

1- PhD student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti Unvirsity, Iran.
2- MSc in Agricultural Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahrood Unvirsity of Technology, Iran.
3- Assistant Professor at Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti Unvirsity, Iran. **(Corresponding Author)*

مقدمه

استفاده گسترده و روز افزون از حشره‌کش‌های شیمیایی برای کنترل آفات، توجه محققین را به نکاتی از قبیل هزینه‌های گزاف تولید سموم شیمیایی، خطرات محیط زیستی ، گسترش مقاومت در حشرات آفت، باقی‌مانده سموم در موادغذایی و اثر روی عوامل غیرهدف و حشرات مفید معطوف داشته است. از راهکارهای کاهش استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی، تولید آفت‌کش‌های بیولوژیک مبتنی بر قارچ‌های بیمارگر حشرات است، که جهت کنترل آفات اهمیت زیادی دارند. قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria* spp. با دامنه میزبانی بسیار گسترده، به عنوان آفت‌کش بیولوژیک منحصر به فردی جهت کنترل بیولوژیک بسیاری از حشرات آفت، در دنیا ثبت شده است (۱، ۲). این قارچ میزبان هدف را از طریق نفوذ در کوتیکول با ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده کوتیکول از قبیل کیتینازها، پروتئازها و سایر آنزیم‌ها مورد حمله قرار داده و بیماریزایی قارچ با تجزیه کیتین و پروتئین و سایر ترکیبات کوتیکول شروع می‌گردد (۱، ۲). کیتینازها، آنزیم‌هایی هستند که قادرند کیتین را به الیگومرها و یا مونومرها هیدرولیز نمایند (۳، ۴). تجزیه آنزیمی کیتین توسط کیتیناز موجب تولید محدوده وسیعی از مشتقات کیتینی مثل استیل‌گلوکزآمین و دی‌استیل‌کتوبیوز می‌شود، که این آنزیم‌ها نقش مهمی در تغذیه و بیماری‌زایی قارچ‌ها بازی می‌کنند. آنزیم‌های کیتیناز کاربردهای مختلفی در کشاورزی، صنعت، پزشکی، داروسازی و همچنین برطرف کردن آلودگی آب دریاها و در نتیجه حفظ محیط زیست دارند (۵). به‌طور مثال از این آنزیم‌ها می‌توان در تهیه آفت‌کش‌ها و در صنایع-غذایی تولیدکننده محصولات دریایی، جهت تولید ترکیبات‌مفید از پسماندها و مواد زاید حاوی کیتین حاصل از این‌صنایع، استفاده نمود (۴، ۶، ۷). تاکنون دانشمندان بسیاری ازجمله Smith و Grula (۱۹۸۳)، Coudron و همکاران (۱۹۸۴)، Havukkala و همکاران (۱۹۹۳)، Suresh و Chandrasekaran (۱۹۹۹) و Patidar و همکاران (۲۰۰۵) تولید کیتینازها را در گونه‌های متفاوت، محیط‌کشت‌ها و مراحل متفاوت رشد قارچ *Beauveria spp.* مورد مطالعه قرار داده-اند (۸-۱۲). هدف از این تحقیق بررسی تولید آنزیم کیتیناز توسط گونه ایرانی قارچ بیمارگر حشرات *B. bassiana* و سنجش فعالیت آنزیم در محیط‌کشت‌ها و شرایط متفاوت مورد-بررسی می‌باشد، بهینه‌سازی آنزیم کیتیناز گامی بزرگ در جهت کمک به کشاورزی، صنعت و حفظ محیط زیست این مرز و بوم خواهد بود.

مواد و روش‌ها

گونه قارچی و مواد استفاده شده

قارچ بیمارگر حشرات *Beauveria* spp. از خاک منطقه مینودشت استان گلستان با موقعیت جغرافیایی ′17 °55 (″21 ′10 °37 N،25″ E) در دانشگاه صنعتی شاهرود خالص‌سازی شد، و پس از استخراج DNA به روش CTAB و تکثیر ناحیه ITS، با توجه به توالی‌یابی ناحیه بارکدینگ ITS به عنوان گونه *Beauveria bassiana* شناسایی گردید. بعد از انجام بررسی‌های بیماری‌زایی گونه‌های جداشده از منطقه بر-روی شپشه برنج (*Sitophilus oryzae*) گونه استفاده شده در این تحقیق (*B. bassiana*) در بین سایر گونه‌ها قدرت بیماری‌زایی بالاتری از خود نشان داد (داده‌ها نشان داده نشده-اند). مواد شیمیایی و ترکیبات لازم برای تهیه محیط‌کشت‌ها از شرکت مرک (Merck) تهیه شدند.

شرایط کشت و جداسازی محیط کشت

کشت اولیه قارچ بر روی محیط کشت SDAY حاوی ۱۰ گرم پپتون، ۲۰ گرم دکستروز، ۱۵ گرم آگار و ۱۰ گرم عصاره مخمر انجام شد و پتری‌دیش‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هر دو هفته یک‌بار عمل زیرکشت انجام شد. جهت کشت قارچ در محیط غوطه‌ور، با استفاده از لوپ استریل از اسپورهای روی سطح پتری‌دیش‌های جامد برداشته شد و سوسپانسیون اسپور با فراوانی ۱×۱۰^{۷} کنیدی/ میلی‌لیتر تهیه

شد، و به میزان یک میلی‌لیتر در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تلقیح گردید.

محیط کشت‌های متفاوت استفاده شده

از سه محیط کشت متفاوت، SDY با ترکیب (۲۰ گرم دکستروز، ۲۰ گرم پپتون، ۱۰ گرم عصاره مخمر) + یک درصد وزنی/ حجمی کیتین کلوئیدی با دو اسیدیته متفاوت پنج و هفت، محیط کشت Pentecorve حاوی نمک‌های (شش گرم سدیم نیترات، ۰/۵۲ گرم پتاسیم کلرید، ۰/۵۲ گرم منیزیم سولفات، ۱/۵۲ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، ۲۰ گرم دکستروز، ۲۰ گرم پپتون، ۱۰ گرم عصاره مخمر) + یک درصد وزنی/ حجمی کیتین کلوئیدی با دو اسیدیته متفاوت پنج و هفت، و محیط کشت Pentecorve حاوی نمک‌های فوق با-کمی تغییرات (شش گرم پتاسیم نیترات، ۰/۵۲ گرم پتاسیم کلرید، ۰/۵۲ گرم منیزیم سولفات، ۱/۵۲ گرم آمونیوم دی هیدروژن فسفات، ۱۰ گرم دکستروز) + یک درصد وزنی/ حجمی کیتین کلوئیدی استفاده شد (۱۳).

آماده سازی سوبسترا جهت بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز

برای القا بیان آنزیم‌های کیتینازی در محیط کشت و نیز به عنوان سوبسترا در سنجش فعالیت کیتینازی، از کیتین کلوئیدی استفاده گردید. کیتین کلوئیدی استفاده شده در این پژوهش طبق روش Roberts و Selitrennikoff (۱۹۹۸) از کیتین حاصل از پوسته میگو تهیه شد (۱۴). ماده خمیری شکل حاصل (کیتین کلوئیدی)، خشک و پودر گردید و از آن استفاده شد (شکل ۱). یک گرم از کیتین کلوئیدی خشک شده به ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH = ۵/۵ اضافه گردید و کیتین کلوئیدی یک درصد وزنی/ حجمی تهیه شده به عنوان سوبسترا در واکنش به کار رفت.

شکل ۱- پودر کیتین کلوئیدی استخراج شده از پوسته میگو

سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز بر روی محلول‌رویی محیط‌کشت-ها بعد از کشت قارچ در ارلن‌های محیط کشت در دمای ۲۸-درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز به صورت غوطه ور با ۱۶۰-rpm در دستگاه شیکر انکوباتور صورت گرفت. محلول پروتئینی محیط کشت قارچ با استفاده از کاغذ واتمن، قیف-بوخنر و پمپ خلاء از توده میسلیومی جدا شد و جهت سنجش آنزیمی استفاده گردید.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش برادفورد

به منظور تعیین غلظت پروتئین، از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده گردید (۱۵). در این روش، غلظت پروتئین در نمونه با-استفاده از رنگ کوماسی برلیانت بلو G-250[1] در طول موج ۵۹۵ نانومتر، تعیین می‌شود. با مقایسه جذب نمونه‌های مجهول با منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های معلوم پروتئین آلبومین سرم گاوی، مقدار پروتئین نمونه‌های مجهول بدست می‌آید. برای رسم منحنی استاندارد، محلول استاندارد پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA[2])، با غلظت ۱ mg/ml تهیه شد. سپس به ترتیب مقادیر ۱، ۳، ۵، ۸، ۱۰، ۱۲ میکرولیتر از این-محلول را در ۶ میکروتیوب ریخته و حجم نهایی آن‌ها را با آب

1-Coomassie Brilliant Blue G-250
2-Bovine Serum Albumin

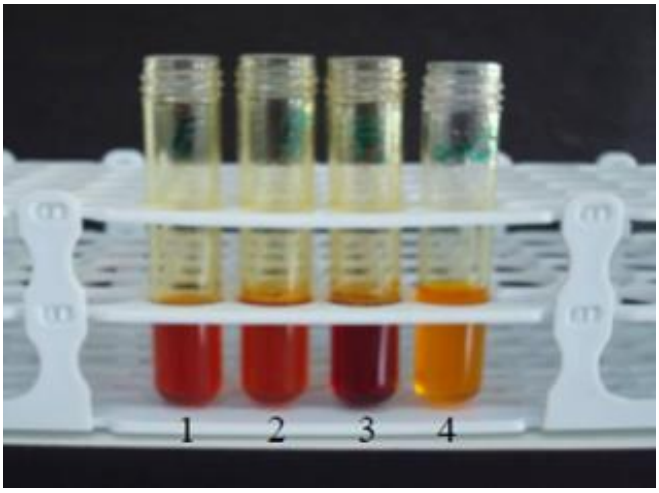
مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر می رسانیم. از یک ویال حاوی ۱۰۰- میکرولیتر آب مقطر بدون آلبومین نیز، به‌عنوان شاهد استفاده گردید. ۱ میلی‌لیتر معرف برادفورد به آن‌ها افزوده و محتویات لوله‌ها به خوبی مخلوط شد و پس از گذشت مدت‌زمان ۱۵- دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. پس از ثبت جذب محلول‌های استاندارد آلبومین سرم گاوی، منحنی استاندارد (جذب در برابر غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی) رسم شد. به‌منظور سنجش غلظت محلول پروتئینی محیط‌های‌کشت، به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌رویی محیط‌های کشت، ۱ میلی لیتر محلول برادفورد افزوده شد. از یک ویال حاوی ۱۰۰ میکرولیتر بافر نیز، به عنوان شاهد استفاده گردید. جذب نمونه‌های مجهول در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و بااستفاده از منحنی استاندارد مقدار پروتئین موجود در نمونه‌های‌مجهول، محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کیتیناز

سنجش آنزیم کیتینازی به روش رنگ‌سنجی (Colorimetric) صورت گرفت. سنجش فعالیت آنزیم به‌روش میلر (۱۹۵۹) انجام شد (۱۶) که روش کار بدین صورت بود، در ابتدا محلول رویی محیط کشت توسط کاغذ وات من جدا گردید، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی محیط کشت درلوله آزمایشی ریخته شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کیتین‌کلوئیدی یک درصد وزنی/ حجمی به آن اضافه شد. پس از آن لوله‌ها در درای بس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون شیکر انکوبه گردید. سپس به لوله‌ها ۴۰۰ میکرولیتر محلول ۳ و ۵- دی- نیتروسالیسلیک اسید (DNS) اضافه شد و به مدت ۵دقیقه در حمام آب جوش نگه‌داشته شد. بعد از سرد شدن و سانتریفیوژ میکروتیوب‌ها در g × ۸۰۰۰ به مدت پنج دقیقه میزان جذب آنزیم، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۲). در این آزمایش از تمام‌ترکیبات مورد آزمایش به غیر از محلول رویی به عنوان شاهد استفاده شد.

تعیین مدت زمان سنجش فعالیت آنزیم

جهت تعیین زمان بهینه فعالیت آنزیم، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به عنوان نمونه آنزیمی به همراه ۲۰۰ میکرولیتر از کیتین کلوئیدی یک درصد وزنی/ حجمی در درای‌بس دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰ دقیقه بدون شیکر با سه تکرار انکوبه گردید. پس از آن به لوله‌ها ۴۰۰ میکرولیتر محلول ۳ و ۵– دی‌نیتروسالیسلیک اسید (DNS) اضافه شد و طبق روش توضیح داده شده سنجش فعالیت آنزیمی صورت گرفت.



شکل ۲- سنجش آنزیم با روش دی‌نیتروسالیسیلیک اسید. ۴، شاهد و ۱، ۲ و ۳ نمونه‌های حاوی آنزیم هستند.

تعیین فعالیت آنزیم کیتیناز برحسب واحد آنزیمی

به منظور به دست آوردن فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیمی منحنی استاندارد (Standard curve) رسم شد. جهت کشیدن منحنی استاندارد غلظت‌های متفاوت و متوالی صفر تا ۱۲ میلی‌مولار N - استیل D- گلوکز آمین تهیه گردید. معادله خط منحنی به دست آمد و با استفاده از آن و میزان جذب نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر و با استفاده از فرمول زیر واحدآنزیمی نمونه‌ها محاسبه گردید.

واحد آنزیمی= N- استیل D- گلوکز آمین (میکرومول)/ زمان سنجش

بر حسب تعریف یک واحد کیتیناز مقداری از آنزیم می‌باشد که یک میکرومولار قند احیایی را در یک دقیقه آزاد می‌کند زمانی- که N- استیل D- گلوکز آمین به عنوان استاندارد مورد- استفاده قرار می‌گیرد (۱۶).

تعیین درصد سوبسترا بهینه فعالیت آنزیم

کیتین کلوئیدی با نسبت‌های ۱، ۰/۷۵، ۰/۵ و ۰/۲۵ درصد وزنی/ حجمی در بافر فسفات با pH = ۵/۵ حل شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول رویی به عنوان نمونه آنزیمی به همراه ۲۰۰ میکرولیتر سوبسترا با غلظت‌های متفاوت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد و توسط معرف DNS، فعالیت آنزیم اندازه‌گیری شد.

تعیین روز بهینه فعالیت آنزیم توسط قارچ

بعد از کشت قارچ و رشد میسلیوم‌ها از محلول رویی کشت- های سه، چهار، پنج، شش و هفت روزه به عنوان نمونه آنزیمی ۲۰۰ میکرولیتر برداشته شد و به همراه ۲۰۰ میکرولیتر از سوبسترای یک درصد وزنی/ حجمی در دمای ۳۷ درجه سانتی- گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردید و سنجش فعالیت آنزیم انجام شد.

تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم توسط قارچ

جهت تعیین دمای بهینه فعالیت آنزیم، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به همراه ۲۰۰ میکرولیتر از سوبسترای یک درصد با سه تکرار در دمای ۳۰، ۳۷، ۴۵، ۵۰، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه بدون شیکر در درای بس انکوبه گردید، و طبق روش توضیح داده شده سنجش فعالیت آنزیمی صورت گرفت.

نتایج و بحث

در این تحقیق پس از رسم منحنی استاندارد، غلظت آلبومین سرم گاوی در نمونه روی محور Xها و میزان جذب نمونه‌ها روی محور Yها وارد گردید، معادله خط منحنی به دست آمد و با جای‌گذاری مقادیر جذب محیط کشت‌های مختلف در معادله غلظت نمونه آنزیمی در محیط کشت‌های مختلف محاسبه گردید (جدول ۱). مشاهده شد که غلظت ملغمه‌ی ترشحی آنزیم گاهی در محیط کشت‌های با pH = ۷ و گاهی در محیط کشت‌های با pH = ۵ بیش‌تر است، و مقادیر جذب نشان می- دهد که بیش‌ترین غلظت آنزیم مربوط به محیط کشت P(7) می‌باشد.

میزان فعالیت آنزیم برحسب واحد آنزیم در دامنه زمانی ۳۰- ۲/۵ دقیقه با سوبسترای آنزیم (کیتین کلوئیدی یک درصد وزنی/ حجمی) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که در همه زمان‌ها بیش‌ترین میزان فعالیت کیتیناز در محیط‌کشت P (7) می‌باشد (جدول ۲)، فعالیت کیتینازی تمامی محیط کشت‌ها در بازه زمانی ۲/۵ تا ۳۰ دقیقه کاهش یافته است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که در همه محیط کشت‌ها، فعالیت کیتیناز طی زمان روند کاهشی داشته است، و براساس این‌نتایج زمان بهینه انکوباته شدن سوبسترا و آنزیم ۲/۵ دقیقه می‌باشد.

بررسی اثر دو اسیدیته متفاوت پنج و هفت در محیط کشت روی فعالیت کیتیناز نشان داد که در سه نوع محیط کشت استفاده شده در pH هفت میزان فعالیت کیتیناز بیش‌تر از محیط کشت با pH پنج است (جدول ۱). pHهای محیط واکنش طی سنجش فعالیت آنزیمی برای دو محیط کشت با - pHهای هفت و پنج به ترتیب حدود شش و پنج اندازه‌گیری شد (با استفاده از کاغذ pHسنج). بنابراین محیط کشت P (7) با pH =۷ به عنوان محیط بهینه فعالیت آنزیم کیتیناز توسط قارچ *Beauveria* spp. معرفی می‌گردد (شکل ۳). Leopold و Samsinakova (۱۹۶۹) فعالیت آنزیم را در -

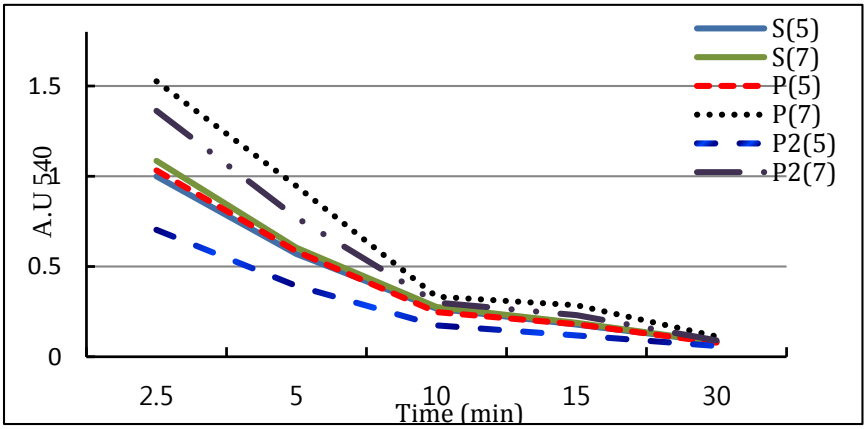
pHهای مختلف سنجش کردند، در آزمایش آن‌ها فعالیت بهینه کیتیناز در pH حدود پنج مشاهده شد و دیده شد که در اسیدیته‌های ۳/۵ و ۷ آنزیم شدیدا غیر فعال می‌شود (۱۷).

جدول ۱-غلظت آنزیم در محیط‌کشت‌های مختلف به روش بردفورد

غلظت آنزیم	جذب	محیط کشت
۱/۴۰۰۹	۰/۶۳۵	S(5)
۱/۲۸۴۷	۰/۶۱۷	S(7)
۲/۶۹۲	۰/۸۳۵	P(7)
۱/۶۰۱	۰/۶۶۶	P(5)
۰/۲۳۸۸	۰/۴۵۵	P2(7)
۲/۲۱۷۵	۰/۷۶۱۵	P2(5)
S (5). محیط کشت SDY با pH = ۵، S(7). محیط کشت SDY با pH = ۷، P (5). محیط کشت Pontecorvo با pH =۵، P (5). محیط کشت Pontecorvo با pH = ۷، P2 (5). محیط کشت Pontecorvo با کمی تغییرات با pH = ۵، P2 (5). محیط کشت Pontecorvo با کمی تغییرات با pH =۷.		

جدول ۲-میانگین فعالیت آنزیم محلول رویی تیمار شده با سوبسترا در دامنه زمانی ۳۰-۲/۵ دقیقه بر حسب میکرومول بر دقیقه

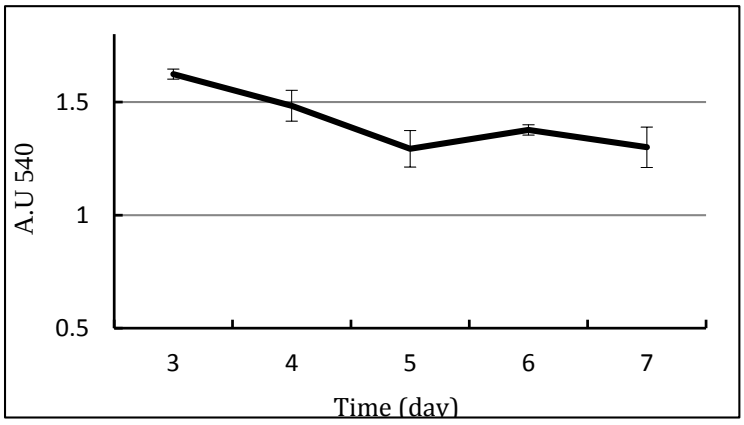
محیط کشت Medium	زمان به دقیقه Time (min)				
	۲/۵	۵	۱۰	۱۵	۳۰
S(5)	۱/۰۰۰۳۶	۰/۵۶۹۸	۰/۲۶۷۴	۰/۱۷۹۱	۰/۰۸۳۳
S(7)	۱/۰۸۶۱	۰/۶۰۴۲	۰/۲۷۵۷	۰/۱۸۸۶	۰/۰۸۳۴۴
P(5)	۱/۰۳۲۵	۰/۵۸۳۷	۰/۲۴۸۱	۰/۱۸۰۵	۰/۰۷۹۰
P(7)	۱/۵۲۶۵	۰/۹۴۶۰	۰/۳۳۳۶	۰/۲۸۵۴	۰/۱۱۳۲
P2(5)	۰/۷۰۳۳	۰/۳۹۲۵	۰/۱۷۴۶	۰/۱۱۸۹	۰/۰۶۰۴
P2(7)	۱/۳۶۲۴	۰/۷۷۰۳	۰/۳۰۰۸	۰/۲۳۱۱	۰/۰۹۱۵
S (5): محیط کشت SDY با pH = ۵، S (7): محیط کشت SDY با pH = ۷، P (5): محیط کشت Pontecorvo با pH = ۵، P (5): محیط کشت Pontecorvo با pH = ۷، P2(5): محیط کشت Pontecorvo با کمی تغییرات با pH = ۵، P2 (5): محیط کشت Pontecorvo با کمی تغییرات با pH = ۷.					



شکل ۳- واحد آنزیمی در دامنه زمانی ۳۰-۲/۵ دقیقه در محیط‌کشت‌های مختلف. S(5): محیط‌کشت SDY با pH = ۵ ، S(7): محیط‌کشت SDY با pH = ۷، P (5): محیط‌کشت Pontecorvo با pH = ۵، P (7): محیط‌کشت Pontecorvo با pH = ۷، P2 (5): محیط‌کشت Pontecorvo با کمی تغییرات با pH = ۵، P2 (5): محیط‌کشت Pontecorvo با کمی تغییرات با pH = ۷ را نشان می‌دهد.

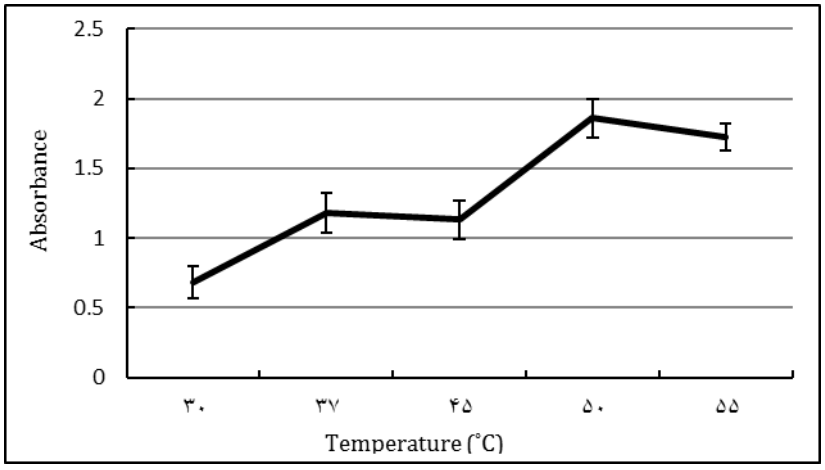
بررسی‌ها نشان داد از بین درصدهای مختلف کیتین کلوئیدی، کیتین کلوئیدی ۰/۷۵ درصد بیش‌ترین اثر مثبت روی فعالیت آنزیم کیتیناز داشته است. در تحقیقات انجام شده توسط Leopold و Samsinakova (۱۹۶۹) تغییرات فعالیت آنزیم در مواجهه با ۱ درصد کیتین کلوئیدی، به عنوان غلظت بهینه سوبسترا بر طبق کتاب Schoorl و همکاران (۱۹۲۹) بررسی گردید (۱۷).

بررسی محیط‌های کشت طراحی شده در روزهای مختلف نشان داد که پس از گذشت سه روز از زمان انکوبه شدن فعالیت آنزیمی بیش‌ترین مقدار خود را دارا می‌باشد (شکل ۴). در این-آزمایش بیش‌ترین میزان فعالیت کیتیناز در روزهای سه تا چهار اندازه‌گیری شد. Leopold و Samsinakova (۱۹۶۹) بعد از اندازه‌گیری میزان فعالیت کیتیناز در محیط کشت‌های ۱۲-۲ روزه در قارچ *B. bassiana* مشاهده کردند که بیش‌ترین فعالیت آنزیم در روزهای چهار تا پنج می‌باشد (۱۷). نتایج متفاوت حاصل از این آزمایش و آزمایشات مشابه احتمالا به-دلیل تفاوت شرایط کشت، روش سنجش فعالیت آنزیم و ایزوله قارچی مورد استفاده می‌باشد.



شکل ۴- تعیین بهترین مدت زمان انکوباسیون قارچ *Beauveria bassiana* در میزان فعالیت آنزیم کیتیناز. سه روز پس از کشت قارچ بر روی محیط بیشترین فعالیت آنزیم دیده می شود.

پس از بررسی دماهای مختلف، بهترین دمای واکنش جهت حصول بالاترین میزان فعالیت آنزیم کیتیناز قارچ *Beauveria bassiana* دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. همچنین مشخص گردید آنزیم مورد بررسی در دمای ۵۵ درجه سانتی-گراد دارای بیش از ۹۰ درصد فعالیت حداکثر می‌باشد. این آنزیم در دماهای ۳۷ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد دارای ۵۹ درصد فعالیت بیشینه می‌باشد (شکل ۵). در پژوهش Coudron و همکاران (۱۹۸۴) اثر دما روی فعالیت کیتیناز در قارچ *B. bassiana* اندازه‌گیری شد نتایج تحقیق آنها نشان داد که، از دمای ۴۰-۱۰ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت آنزیم با وجود افت و خیزها، روند افزایشی داشته است اما از دمای ۵۵-۴۰ فعالیت آنزیم روند کاهشی از خود نشان داد (۱۸).



شکل ۵- بررسی تاثیر دما بر میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در قارچ *Beauveria bassiana* در حضور سوبسترای کیتین کلوئیدی، آنزیم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد دارای فعالیت بیشینه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حمایت‌های جناب آقای دکتر سعید امین زاده، استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1- Kim, J. S. & Je, Y. H. 2010. A novel biopesticide production: attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. Applied Microbiology and Biotechnology, VOL. 87, PP. 1639-1648.

2- Pathan, A. A., Devi, K. U., Vogel, H. & Peineke, A. 2007. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. Fungal Genetics and Biology, VOL. 44, PP. 1231-1241.

3- Martin-Gil, F., Leal, J. A., Gomez-Miranda, B., Martin-Gil, J., Prieto, A. and Ramos-Sanchez, M. C. 1992. Low temperature thermal behaviour of chitins and chitin-glucans. Thermochimica Acta, VOL. 211, PP. 241-254.

4- De León, A., Jimenez-islas, H., Gonzalez-cuevas, M. & Rosa, A. P. 2004. Analysis of the expression of the *Trichoderma harzianum* ech42 gene in two isogenic clones of *Escherichia coli* by surface response methodology. Process Biochemistry, VOL. 39, PP. 2173-2178.

5- Raaijmakers, J. M., Leeman, M. & Oorschot, V. 1995. Dose-response relationships in biological control of Fusarium wilt of radish by *Pseudomonas spp*. Phytopathology, VOL. 85(10), PP. 1075-1081.

6- Bierbaum, S., Nickel, R., Koch, A., Lau, S., Deichmann, K., Wahn, U., Superti-Furga, A. & Heinzmann, A. 2005. Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, VOL. 172, PP. 1505-1512.

7- Binod, P., Pusztahelyi, T., Nagy, V., Sandhya, C., Szakacs, G., Pocsi, I. & Pandey, A. 2005. Production and purification of extracellular chitinases from*Penicilliumaculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. Enzyme and Microbial Technology, VOL. 36, PP. 880-887.

8- Smith, R. J. & Grula, E. A. 1986. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology, VOL. 42, PP. 319-326.

9- Coudron, T. A., Kroha, M. J. & Ignoffo, C. M. 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, VOL. 3, PP. 339-348.

10- Havukkala, I., Mitamura, C., Hara, S., Hirayae, K., Nishizawa, Y. & Hibi, T. 1993. Induction and Purification of *Beauveria bassiana* Chitinolytic Enzymes. Plos pathogens, VOL. 61, PP. 97-102.

11- Suresh, P. V. & Chandrasekaran, M. 1998. Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. World Journal of Microbiology & Biotechnology, VOL.14, PP. 655-660.

12- Patidar, P., Agrawal, D., Banerjee, T. & Patil, S. 2005. Chitinase production by *Beauveria felina* RD 101: optimization of parameters under solid substrate fermentation conditions. World Journal of Microbiology & Biotechnology, VOL. 21, PP. 93-95.

13- 13-Pontecorvo, G. 1953. The genetic of *Aspergillus nidulans*. Department of Genetics, the university, Glasgow Scotland.Advances in Genetics, VOL. 5, PP. 141–239.

14- 14-Roberts, W. K. & Selitrennikoff, C. P. 1998. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. Journal of General Microbiology, VOL. 134, PP. 426-428.

15- 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, VOL. 72, PP. 248-252.

16- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing suger.

Analytical Chemistry, VOL. 3, PP. 426-428.

17- 17-Leopold, J. & Samsinakova, A. 1970. Quantitative estimation of chitinase and Severalother enzymes in the fungus *Beuuveria bassiana*. Journal of Invertebrate pathology, VOL. 15, PP. 34-42.

18- 18-Coudron, T. A., Kroha, M. J. & Ignoffo, C. M. 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, VOL. 3, PP. 339-348.