جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بهینه سازی تولید آنزیم کیتیناز به وسیله قارچ *Penicillium aculeatum* PTCC 5167 در محیط کشت غوطه ور

فاطمه آقائی زاده[۱]، محمد فائزی قاسمی*[۲]، ناصر قائمی[۳]، کتایون داستان[۴]

۱،۲*و۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۳- دانشگاه تهران، پردیس علوم، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵- ۱۴۱۵۵

faezi_m@yahoo.com

چکیده

کیتینازها، آنزیمهایی هستند که قادرندکیتین را به الیگومر ها و یا مونومرها هیدرولیز نمایند. این آنزیمها نقش مهمی را در تغذیه و بیماریزایی باکتریها و قارچها بازی می‌کنند. آنها همچنین در شکل زایی و اتولیز قارچها شرکت دارند. از کیتینازها در صنایع مختلف و همچنین اصلاح زیستی آب دریا استفاده می شود ودارای کاربرهای کلینیکی و داروسازی نیز می باشند. هدف از این تحقیق، بهینه سازی ترکیبات غذایی و همچنین شرایط کشت جهت بهبود تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* PTCC 5167 با استفاده از روش تغییر یک فاکتور در یک زمان وتاگوچی بود. در این مطالعه اثرات منابع کربنی و نیتروژنی مختلف مانند گلوکز، لاکتوز، مالتوز، سوکروز، نشاسته، کلوئیدال کیتین نیترات پتاسیم، فسفات آمونیوم، عصاره مالت، عصاره مخمر، عصاره گوشت و باکتوپپتون همراه با کیتین کلوئیدی برروی تولید آنزیم و همچنین اثر غلظتهای مختلف کیتین کلوئیدی به تنهایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که مالتوز به عنوان منبع کربنی، نیترات پتاسیم به عنوان منبع نیتروژنی غیرآلی و عصاره مالت بعنوان یک منبع نیتروژنی آلی اثر مثبت روی تولید کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* PTCC 5167 داشته و غلظت بهینه کلوئیدال کیتین جهت تولیدکیتیناز ۳٪ تعیین گردید. pH و حرارت بهینه ۵/۵ و ۵۰°C بدست آمد. میزان تولید آنزیم در محیط کشت پایه ۱۰/۶۲۷ یونیت به ازای میلی لیتر بود که پس از بهینه سازی میزان تولید به روش تغییر یک فاکتور در یک زمان به میزان ۲۱/۱۸۰ یونیت به ازای میلی لیتر رسید و به این ترتیب مقدار تولید آنزیم به میزان تقریباً ۲ برابر افزایش نشان داد.

کلمات کلیدی: کیتیناز، *P. aculeatum* PTCC 5167 ، بهینه سازی ،کیتین کلوئیدی.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

کیتین پس از سلولز فراوان ترین پلی ساکارید در طبیعت می باشد که در اسکلت خارجی سخت پوستان مانند میگو، خرچنگ، آرتمیا و همچنین در کوتیکول حشرات و دیواره سلولی بعضی قارچها یافت می شود (۱۱و۱۲). اما کیتین نیز همانند سلولز توسط حیوانات مهره دار قابل هضم نمی باشد و به طور کلی تجزیه کیتین کار دشواری است و به همین دلیل به صورت کربوهیدراتی غیر قابل دسترس در رژیم غذایی جانوران می باشد. از طرفی سرعت واکنش هیدرولیز کیتین بسیار کند بوده و به زمان طولانی برای بازیافت از محیط نیاز دارد. کیتین توسط آنزیمهای کیتیناز تولید شده توسط باکتریها و قارچها تجزیه می گردد (۲، ۷، ۸ و۱۱).

تجزیه آنزیمی کیتین توسط کیتیناز موجب تولید محدوده وسیعی از مشتقات کیتینی مثل استیل گلوکز آمین و دی استیل کتوبیوز می شود که یک دی ساکارید با ارزش اقتصادی و پتانسیل کاربردهای بیوتکنولوژیکی می باشد (۷و۱۲). آنزیم کیتیناز کاربردهای مختلفی در کشاورزی، صنعت، پزشکی، داروسازی و همچنین برطرف کردن آلودگی آب دریاها و در نتیجه حفظ محیط زیست دارد. از این آنزیم می توان برای تهیه آفت کشها از جمله قارچ کشها استفاده نمود. از طرفی در صنایع غذایی تولید کننده محصولات دریایی مقادیر بسیار زیادی مواد زاید حاوی کیتین تولید می‌گردد که با استفاده از این آنزیم می‌توان این پس ماندها را به ترکیبات مفید تبدیل نمود (۱، ۲، ۳و ۷). کیتینازها به طور معمول در موجوداتی یافت می‌شوند که نیاز دارند کیتین خود را تغییر شکل دهند یا اینکه کیتین قارچ ها و حیوانات را تجزیه نمایند (۱۴، ۱۵، ۱۶و ۱۸). موجودات کیتین خوار شامل بسیاری از باکتریها، بعضی از قارچها وگیاهان می باشند که وجود آنزیم کیتیناز در این موجودات موجب مقاومت آنها در برابر قارچهای بیماریزا و حمله حشرات می شود. طبق یک اصل علمی کیتین بصورت زیر در آزمایشگاهها تجزیه می گردد (۴، ۷، ۸، ۹و ۱۷).

$$\text{Chitin} + H_2O \xrightarrow{\text{chitinase}} \text{Chitobiose}$$

$$\text{Chitobiose} + H_2O \xrightarrow{\beta\text{-N-Acetylglucosaminidase}} \text{N-Acetyl-D-Glucosamine}$$

یکی ازمیکروارگانیزمهایی که در زمینه تولید این آنزیم حائز اهمیت می باشد، قارچ پنی سیلیوم به ویژه *P. aculeatum* می باشد که انتشار وسیع دارد و روی مرکبات، میوه ها، ژله ها، مربا، نان و سایر مواد خوراکی ایجاد کپکهائی به رنگ سبز یا آبی می‌کند. کنیدی‌های پنی سیلیوم مانند کنیدی‌های آسپرژیلوس در هوا و خاک و در هر کجا وجود دارد و به همین جهت در این تحقیق، بررسی ها در زمینه بهینه سازی کیتیناز روی سویه ای از این قارچ صورت گرفته است (۵، ۱۰، ۱۵و ۱۸).

در زمینه بهینه سازی، روشهای مختلفی وجود دارد که یکی از رایج ترین آنها، روشهای کلاسیک می‌باشد. مهمترین روش کلاسیکی که می توان از آن نام برد روش تغییر یک فاکتور برحسب زمان می باشد که در آن تعداد زیادی از محتویات محیط کشت جهت بدست آوردن بهترین نتیجه، آزمایش می شود. بدین معنی که یک متغیر مستقل در یک سطح خاص تغییر و سایر پارامترها ثابت نگه داشته می شود و بدین ترتیب نقطه مطلوب آن متغیر بدست می آید و این روش برای تک تک پارامترهای دیگر تکرار می گردد که بسیار وقت گیر و هزینه بر است. اشکال روش مذکور این

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

است که بر همکنش بین فاکتورها در نظر گرفته نمی‌شود یعنی نقطه حداکثر و حداقل در این محدوده لحاظ نمی گردد و به همین جهت، مرحله بعد، طراحی پروسه بهینه سازی فضای مطلوب بوده که هدف از آن بدست آوردن تصویر کامل اثر هر ترکیب محیط کشت در تولید محصول می باشد. بعد از این مرحله، توسط ابزارهای مختلف ریاضی و با استفاده از روش های آماری مختلف از جمله روش تاگوچی که بخصوص در سالهای اخیر در فرایندهای بهینه سازی بیوتکنولوژی ایران نیز بکار گرفته شده، حوزه مطلوب شناسایی می‌گردد (۸).

با استفاده از روشهای فوق می توان تولید این آنزیم را بهینه نمود که گامی بزرگ در جهت کمک به کشاورزی، صنعت و حفظ محیط زیست این مرز و بوم است. با توجه به اهمیت موضوع، در این تحقیق، بهینه سازی شرایط و ترکیبات محیط کشت و اثر آنها روی تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ *P.aculeatum* بررسی شد. تا جائیکه بررسی شد اطلاعاتی در زمینه بهینه سازی تولید آنزیم کیتیناز توسط این قارچ در محیط کشت غوطه ور وجود نداشته و این اولین گزارش علمی تهیه شده در این زمینه می باشد.

مواد وروشها

سویه میکروبی و شرایط کشت

قارچ *P. aculeatum* PTCC 5167 از مرکز کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی عفونی ایران واقع در سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. مواد شیمیایی و ترکیبات لازم برای تهیه محیطهای کشت از شرکت سیگما (Sigma) و مرک (Merck) تهیه شدند.

کشت اولیه در محیط کشت جامد (PDA) Potato Dextrose Agar به صورت شیب‌دار (Slant) انجام داده شد و در ۲۵°C نگهداری شد. هر دو هفته یک بار عمل کشت مجدد تکرار می شد. محیط کشت مناسب طراحی شده پایه برای رشد قارچ و اندازه گیری میزان آنزیم کیتیناز شامل ترکیبات زیر بر حسب گرم در لیتر بود:

آمونیوم دی هیدروژن فسفات (۵ گرم در لیتر)، سولفات منیزیم (۱ گرم در لیتر)، نیترات پتاسیم (۵ گرم در لیتر)، سولفات منیزیم ۷ آبه (۱ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۱ گرم در لیتر) و(V/V) ٪۱ نمکهای ضروری شامل [(سولفات منگنز (۰/۸ گرم در لیتر)، سولفات روی ۷ آبه (۱/۷ گرم در لیتر)، سولفات آهن ۷ آبه (۲/۵ گرم در لیتر)]، کیتین کلوئیدی (۱ گرم در لیتر)، سبوس گندم (۳ گرم در لیتر).

روش سنجش آنزیم

سنجش آنزیم به روش رنگ سنجی (Colorimetric) صورت گرفت. روش کار بدین صورت بود که در ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون رویی محیط کشت رادر لوله آزمایش ریخته و سپس توسط سمپلر ۰/۵ میلی لیترکلوئیدال کیتین ٪۱ در بافر فسفات با pH =5.5 به آن اضافه می شد. در مرحله بعد ۱ میلی لیتر آب مقطر به آن افزود شده و سپس لوله ها در انکوباتور ۵۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه بدون شیکر انکوبه گردید. پس از آن به لوله ها حدود ۳ میلی لیتر محلول ۵ و۳ – دی نیترو سالیسلیک اسید (DNS) اضافه شد و به مدت ۷ دقیقه در حمام آب جوش نگه داشته شد. بعد از سرد شدن، میزان تولید آنزیم، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ سنجیده گردید. یک واحد فعالیت

آنزیمی کیتیناز میزان آنزیمی است که توسط آن ۱ میکرومول ان استیل دی گلوکزآمین در هر دقیقه از کلوئیدال کیتین تحت شرایط آزمایش آزاد می شود (۶).

بررسی اثر منابع کربنی مختلف بر تولید آنزیم

۱/۵ درصد منابع کربنی مختلف شامل گلوکز، کلوئیدال کیتین، لاکتوز، مالتوز، سوکروز، نشاسته به اضافه ۱/۵ درصد کلوئیدال کیتین به صورت ثابت به هر ارلن اضافه شده و پس از تلقیح اسپور قارچ به مدت سه روز در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰°C قرار گرفت. پس از اندازه گیری وزن خشک، از سوسپانسیون صاف شده آن جهت اندازه گیری میزان آنزیم استفاده شد.

بررسی اثر منابع نیتروژنی مختلف بر تولید آنزیم

جهت بررسی اثر منابع نیتروژنی بر تولید آنزیم، به محیط کشت ۰/۵ درصد منابع نیتروژنی مختلف آلی و غیر آلی شامل عصاره گوشت، عصاره مخمر، عصاره مالت، باکتوپپتون، نیترات پتاسیم و فسفات آمونیوم اضافه شد و پس از تلقیح اسپور قارچ به مدت سه روز در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. پس از اندازه گیری وزن خشک، از سوسپانسیون صاف شده آن جهت اندازه گیری میزان آنزیم تولیدی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد.

بررسی اثر محلولهای نمکی مختلف بر تولید بهینه آنزیم

ابتدا دو محلول نمکی با ترکیبات زیر تهیه گردید

محلول نمکی یک: نیترات آمونیوم (۵ گرم در لیتر)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (۵ گرم در لیتر)، سولفات منیزیوم ۷ آبه (۱ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۱ گرم در لیتر) و(V/V) ٪۱ نمکهای ضروری شامل [(سولفات منیزیوم (۰/۸ گرم در لیتر)، سولفات روی ۷ آبه (۱/۷ گرم در لیتر)، سولفات آهن ۷ آبه (۲/۵ گرم در لیتر)].

محلول نمکی دو: آمونیوم دی هیدروژن فسفات (۵ گرم در لیتر)، سولفات منیزیوم (۱ گرم در لیتر)، نیترات پتاسیم (۵ گرم در لیتر)، سولفات منیزیوم ۷ آبه (۱ گرم در لیتر)، کلرید سدیم (۱ گرم در لیتر) و(V/V) ٪۱ نمکهای ضروری شامل [(سولفات منگنز (۰/۸ گرم در لیتر)، سولفات روی ۷ آبه (۱/۷ گرم در لیتر)، سولفات آهن ۷ آبه (۲/۵ گرم در لیتر)].

پس ۴ ارلن با ترکیبات ذکر شده در جدول ۱ تهیه شد.

جدول۱: ترکیبات محیط کشت جهت بررسی اثر محلولهای نمکی در بهینه سازی تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* PTCC 5167

محیط کشت / بالن ها	سبوس گندم ٪۳(ml)	کلوئیدال کیتین	محلول نمکی۱(ml)	محلول نمکی۲(ml)
۱	۴۰	٪۱	–	۱۰
۲	۳۵	٪۱	–	۱۵
۳	۴۰	٪۱	۱۰	–
۴	۳۵	٪۱	۱۵	–

در مرحله بعد تلقیح اسپور قارچ صورت گرفت و پس از سه روز انکوبه شدن، میزان تولید آنزیم آن مورد بررسی قرار گرفت.

اثرpH بر تولید بهینه آنزیم: پس از بدست آوردن منابع بهینه کربنی و نیتروژنی، میزان تولید آنزیم در pH های مختلف (۳/۵، ۴/۵، ۵/۵، ۶/۵، ۷/۵ و ۸/۵) جهت بدست آوردن pH بهینه مورد بررسی قرار گرفت.

شرایط بهینه تولید از نظر درجه حرارت: در این مرحله محیط‌های کشت تلقیح شده در حرارت‌های مختلف ۲۰،۳۰،۴۰،۵۰،۶۰ و۷۰ درجه سیلسیوس قرار داده شد و میزان تولید آنزیم کیتیناز در آنها بررسی شد تا حرارت اپتیمم جهت تولید آنزیم بهینه بدست آید.

اثر درصدهای متفاوت کلوئیدال کیتین در تولید بهینه آنزیم: در این قسمت درصدهای مختلف کلوئیدال کیتین ۱٪،۲٪، ۳٪، ۴٪ و ۵٪ به محیط کشت اضافه شد و اثر آن در تولید آنزیم کیتیناز بررسی شد.

اثر درصدهای متفاوت سبوس گندم در تولید بهینه آنزیم: در این مرحله درصدهای مختلف سبوس گندم ۱٪،۲٪، ۳٪، ۴٪ و ۵٪ به محیط کشت اضافه شد و اثر آن برتولید بهینه آنزیم کیتیناز بررسی شد.

اثر زمان انکوبه شدن در تولید بهینه کیتیناز: در اینجا محیط‌های کشت برای مدت زمان‌های مختلف ۱ روز، ۲ روز، ۳روز، ۴ روز، ۵ روز انکوبه گردید و اثر مدت زمان بر تولید بهینه آنزیم کیتیناز بررسی گردید.

نتایج

طبق تحقیقات به عمل آمده ازبین منابع کربنی مختلف، مالتوز با فعالیت آنزیمی ۲۱/۱۸ واحد به ازای میلی لیتر عنوان بهترین منبع کربنی با غلظت ۱/۵ درصد در تولید بهینه آنزیم کیتیناز انتخاب گردید (نمودار ۱).

بررسی نتایج حاصل از تاثیر منابع نیتروژنی آلی و معدنی مختلف بر تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* نشان دادند که نیترات پتاسیم با فعالیت آنزیمی۳/۵۷ واحد به ازای میلی لیتر به عنوان بهترین منبع نیتروژنی معدنی و عصاره مالت با فعالیت ۱۰/۹۷ به عنوان منبع نیتروژنی آلی، بیشترین اثر مثبت را در تولید بهینه آنزیم کیتیناز داشتند (نمودار ۲).

از بین ۴ محیط کشت طراحی شده، محیط کشت ۳ که محتوی ۱۰ml محلول نمکی ۲ بود یعنی دارای KNO_3, ۱۰ml $(NH_4)_2HPO_4$ بود، با فعالیت ۱۱/۷۸ واحد به ازای میلی لیتر بیشترین اثر را در تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* داشت (نمودار ۳).

طی بررسی pHهای مختلف، نتایج حاصله، حاکی از تولید بالاترین میزان آنزیم کیتیناز در pH =۵/۵ با فعالیت آنزیمی۵/۹۴۲ واحد به ازای میلی لیتر بود (نمودار ۴).

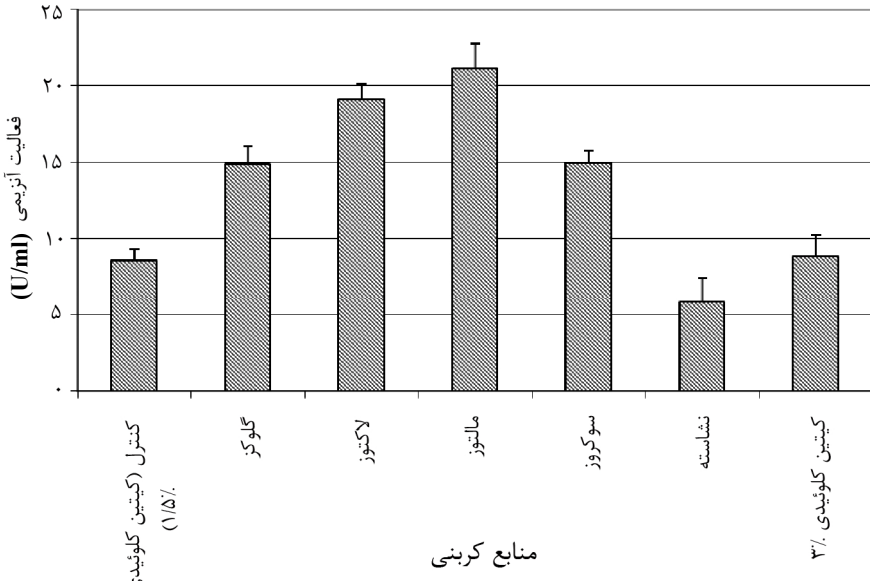
پس از بررسی دماهای مختلف، بهترین دمای محیط کشت جهت تولید بالاترین میزان تولید آنزیم توسط قارچ *P. aculeatum* ، دمای ۵۰ درجه سیلسیوس با فعالیت آنزیمی۱۳/۲۰ واحد به ازای میلی لیتر بود (نمودار ۵).

بررسی ها نشان دادند از بین درصد های مختلف کلوئیدال کیتین، کلوئیدال کیتین ۳٪ با فعالیت آنزیمی ۱۳/۵۷ واحد به ازای میلی لیتر بیشترین اثر مثبت را در تولید آنزیم کیتیناز داشته است (نمودار ۶).

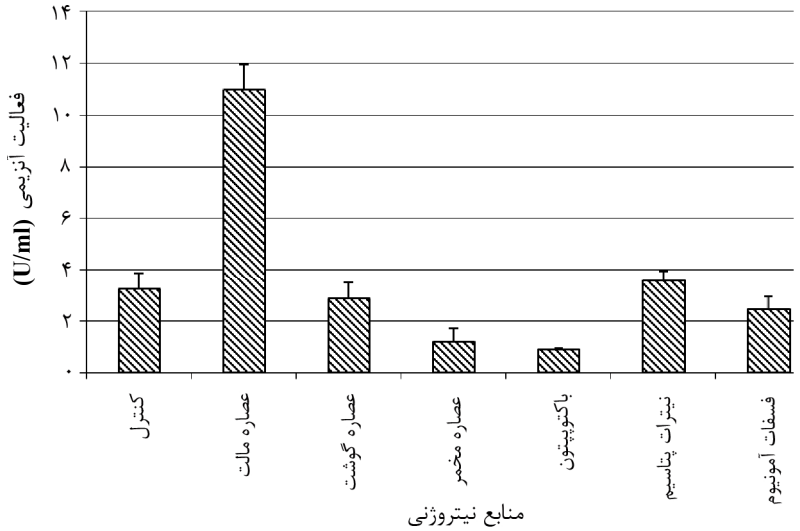
بررسی ها نشان دادند که از بین درصدهای مختلف سبوس گندم، سبوس گندم ۵٪ بافعالیت آنزیمی ۱۵/۹۵

واحد به ازای میلی لیتر بیشترین اثر را در تولید آنزیم کیتیناز دارد (نمودار ۷).

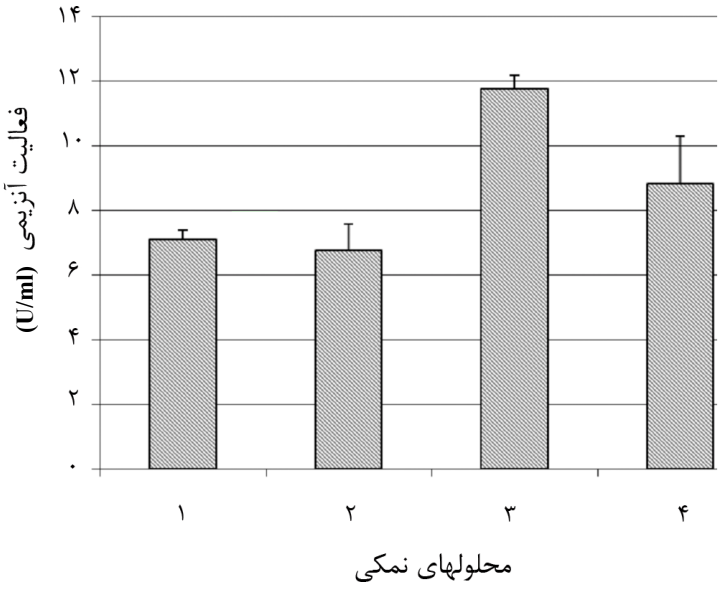
بررسی محیط های کشت طراحی شده در روزهای مختلف نشان دادند که پس از گذشت ۳ روز از زمان انکوبه شدن فعالیت آنزیمی بیشترین مقدار خود را که ۱۲/۶۴ U/ml است را دارا می باشد (نمودار ۸).



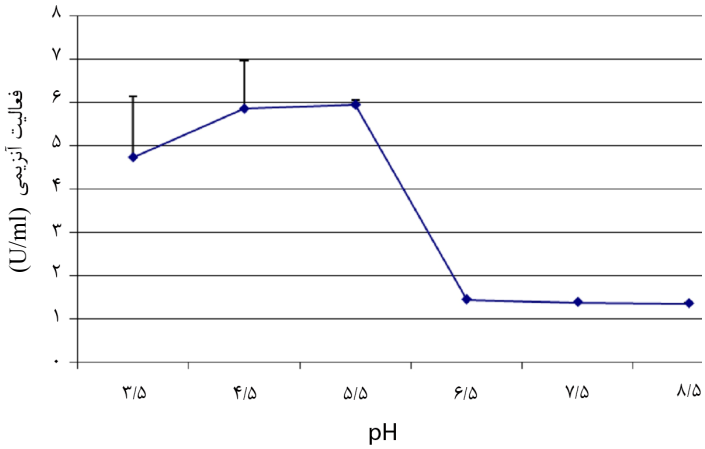
نمودار ۱: اثر منابع کربنی مختلف در تولید انزیم کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* PTCC 5167



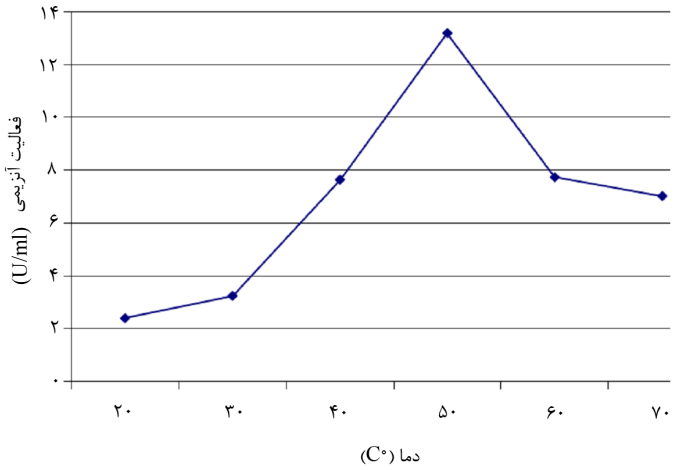
نمودار ۲: اثر منابع مختلف نیتروژنی الی و غیرالی در تولید انزیم کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* PTCC 5167



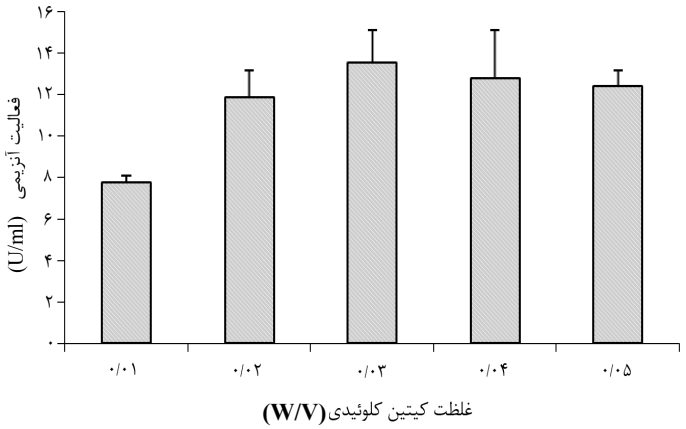
نمودار ۳: اثر محلولهای نمکی مختلف در تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ
P. aculeatum PTCC 5167



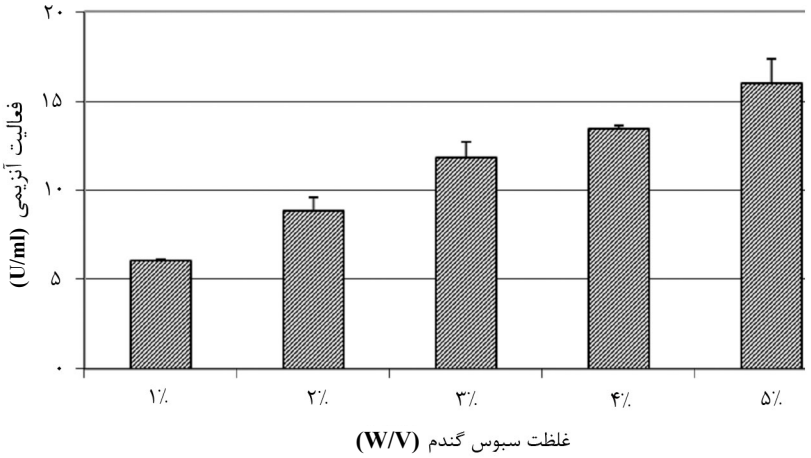
نمودار ۴: اثر pH های مختلف در تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ
P. aculeatum PTCC 5167



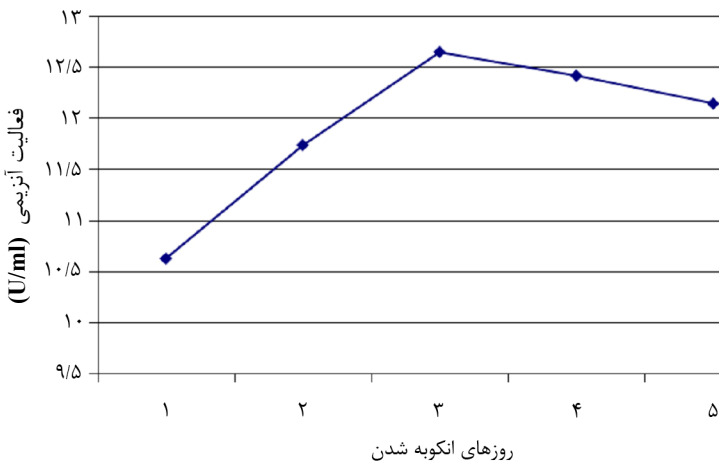
نمودار ۵: اثر دماهای مختلف در تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ
P. aculeatum PTCC 5167



نمودار ۶: اثر غلظتهای مختلف کلوئیدال کیتین در تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ
P. aculeatum PTCC 5167



نمودار ۷: اثر غلظتهای مختلف سبوس گندم در تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ
P. aculeatum PTCC 5167



بحث

آنزیمها دارای قدرت کاتالیتیک فوق العاده بوده که اغلب فراتر از کاتالیست های سنتتیک یا آلی می‌باشند. آنزیم ها برای سوبسترای خود ویژگی بالایی دارند، واکنشهای شیمیایی را به میزان خیلی زیادی تسریع می کنند و در محلولهای آبی و تحت شرایط ملایم درجه حرارت و pH عمل می نمایند. بنابراین ویژگیهای آنزیمی در شرایط فیزیکی مختلف قابل تغییر بوده و تنها در محدوده بسیار محدودی از شرایط، دارای فعالیت بیشینه یا بهینه می باشند (۴).

در این تحقیق از روشهای کلاسیک بهینه سازی محیط استفاده شد و اثر شرایط مختلف کربنی، نیتروژنی، محلولهای نمکی، دما و pH های مختلف روی تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* PTCC 5167 بررسی شد، که تغییر در هر یک از عوامل ذکر شده اثری متفاوت در میزان رشد سلولی و تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ پنی سیلیوم داشت. از آنجایی که طبق تحقیقات به عمل آمده توسط Binod و همکارانش که روی ۱۵ سویه قارچی مختلف در سال ۲۰۰۶ انجام شد سویه *P. aculeatum* NRRL 2129 دارای بالاترین توانایی در تولید آنزیم کیتیناز بود، به همین خاطرجهت انجام این تحقیق از این سویه یعنی *P. aculeatum* PTCC 5167 استفاده شد (۳).

در این بررسی اثر شرایط محیط و ترکیبات مختلف محیط کشت، روی میزان تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* بررسی شد. در نتیجه تغییر منابع مختلف کربنی مشخص گردید که قارچ *P. aculeatum* PTCC 5167 در صورت وجود قند مالتوز در کنار کلوئیدال کیتین به عنوان سوبسترای اصلی آنزیم کیتیناز، بالاترین فعالیت آنزیمی معادل ۲۱/۱۸ یونیت به ازای میلی لیتر بود و در حضور قندهای دیگر به عنوان منبع کربن، فعالیت آنزیم کمتر بود. طی تحقیقاتی که Sandhya و همکارانش بر روی تولید کیتیناز در قارچ *Trichoderma harzianum* TUBF 966 در محیط کشت غوطه ور انجام دادند ابتدا کلوئیدال کیتین و سپس مالتوز و

گلوکز به عنوان بهترین منابع کربنی جهت تولید هرچه بیشتر آنزیم کیتیناز توسط قارچ مزبور بودند (۱۳).

در تحقیق حاضر، اثر منابع مختلف نیتروژنی نیز بر تولید آنزیم کیتیناز بررسی و نتیجه گرفته شد که عصاره مالت به عنوان یک منبع نیتروژنی آلی وKNO_3 به عنوان یک منبع نیتروژنی غیرآلی بیشترین اثر را در تولید آنزیم کیتیناز دارند. در تحقیقاتی که Sandhya و همکارانش بر روی تولید کیتیناز در قارچ *T. harzianum* TUBF 966 در محیط کشت غوطه‌ور انجام داده بودند پپتون و تریپتون بیشترین اثر را در تولید بهینه آنزیم توسط قارچ تریکودرما داشتند (۱۳).

بررسی اثر محلولهای نمکی بر روی تولید کیتیناز نشان داد که محیط کشت غوطه ور شماره ۳ که حاوی ۱۰ml محلول نمکی نوع ۲ بود بیشترین اثر را در تولید آنزیم کیتیناز داشت. Binod و همکارانش نیز در تحقیق خود به همین نتیجه دست یافتند (۱۳).

مطالعه اثر دما های مختلف بر تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* PTCC 5167 نشان داد که دمای ۵۰°C به عنوان دمای اپتیمم جهت تولید بهینه این آنزیم توسط قارچ مزبور می باشد. Binod و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۶ دمای ۵۰ درجه سلیسیوس را به عنوان دمای اپتیمم جهت تولید آنزیم کیتیناز توسط قارچ *P. aculeatum* NRRL 2129 در محیط کشت جامد گزارش کردند (۲و۳).

بررسی اثر pH های مختلف در تولید آنزیم کیتیناز نشان دادند که pH بهینه جهت تولید آنزیم ۵/۵ می‌باشد. Binod و همکارانش و همچنین Sandhya و همکارانش pH =۵/۵ را به عنوان pH اپتیمم معرفی نمودند (۳و۱۵).

بررسی اثر درصدهای مختلف کلوئیدال کیتین در تولید آنزیم کیتیناز نشان دادکه غلظت ۳٪ کلوئیدال کیتین بیشترین اثر را در تولید آنزیم کیتیناز دارند طی تحقیقاتی که Sandhya و همکارانش بر روی تولید کیتیناز در قارچ *T. harzianum* TUBF 966 در محیط کشت غوطه ور انجام دادند مشخص شد غلظت ۱/۵ درصد کلوئیدال کیتین بهترین اثر را در تولید بهینه آنزیم کیتیناز دارد (۱۵).

بررسی اثر درصدهای مختلف سبوس گندم نشان داد که سبوس گندم ۵٪ بهترین اثر را در تولید بهینه آنزیم دارد.

بررسی زمان انکوبه کردن نشان داد که آنزیم مورد نظر پس از گذشت ۳ روز بیشترین میزان فعالیت را دارد. Binod و همکارانش همچنین Sandhya و همکاران به نتیجه مشابه دست یافتند (۴و۱۴). میزان فعالیت آنزیم در شرایط اولیه یعنی زمانیکه محیط کشت به صورت پایه استفاده شد ۱۱/۸۴ یونیت به ازای میلی لیتر بود و در شرایط بهینه در حضور منابع کربنی میزان فعالیت به ۲۱/۱۸ یونیت به ازای میلی لیتر رسید یعنی نزدیک به ۲ برابر فعالیت آنزیم متعاقب بهینه سازی بود. نتایج نشان می دهد که منابع کربنی اثر بسیار ویژه ای در بالابردن افزایش فعالیت توسط این قارچ دارند.

سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت های ریاست محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان جناب آقای دکتر سید حجت مهدوی و معاونت محترم پژوهشی جناب آقای دکتر سیروس بیدریغ کمال سپاس و تشکر را داریم.

منابع

1. Bierbaum, S.; Nickel, R.; Koch, A.; Lau, S.; Deichmann, K.A.; Wahn, U.; Superti-Furga, A. and Heinzmann, A., 2005. Polymorphisms and haplotypes of acid mammalian chitinase are associated with bronchial asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine pp. (12): 1505–1509.
2. Binod, P.; Sandhya, Ch.; Suma, P.; Szakacs, G. and Pandey, A., 2007. Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state. Bioresource Technology,pp. 2742-2748.
3. Binod, P.; Pusztahelyi, T.; Nagy, N.; Sandhya, Ch.; Szakacs, G.; Pocsi, I. and Pandey, A., 2004. Production and purification of extracellular chitinases from P. aculeatum NRRL 2129 under solid-state fermentation.Enzyme and microbial technology, pp(36):880-887.
4. Button, DK, ATLow. 2003. Multiple-Carbone-Source-Limited growth Kinetics of the a Marine *Coryneform bacterium*. Journal Bacteriol,pp 116-121.
5. Chupp, G.L.; Lee, C.G.; Jarjour N.; Shim, Y.M.; Holm, C.T.; He, S.; Dziura, J.D.; Reed, J.; Coyle, A.J.; Kiener, P.; Cullen, M.; Grandsaigne, M.; Dombret, M.C.; Aubier, M.; Pretolani, M. and Elias, J.A., 2005. A Chitinase-like Protein in the Lung and Circulation of Patients with Severe Asthma. The New England Journal of Medicine pp. (20): 2016–2027.
6. Collmer, J.; Ried, L. and Munt, M.S., Assay methods for pectic enzymes. Colometric Assay for chitiuase In: Methods of enzymology Biomass, Part B. Eds by Abelson J., Willis wood, Simon. M and Kellongs. Academic Press. Pp 161-169.
7. Deleon, A.; Jimenez-las, H.; Gonzalez-Cuevas; M. and Paulina, B.A., 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.
8. Faezi, G.M; Shojai-Arani, A. and Moazami, N., 2008.Optimization of bacteriorhodopsin production by *Halobacterium salinarium* PTCC 1685.pp 1-19
9. Hunt, D.E.; Gevers, D.; Vahora, N.M. and Polz, M.F., 2008. Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. Applied and Environmental Microbiology pp.(1): 44–51.
10. Hunt, D.E.; Gevers, D.; Vahora, N.M. and Polz, M.F., 2008. Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. Applied and Environmental Microbiology pp.(1): 44–51.
11. Kapat, A.; Rakshit, S.K. and Panda, T., 1996. Optimazation of carbon and nitrogen sources in the medium and environmental factors for enhanced production of chitinase by T.harzianum.Bioproc.Eng, pp(5):13-20.
12. Martin-Gil, F.J.; 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. Thermochim.Acta, vol. 211, pp.241-254.
13. Souza, R.F.; Gomes, R.C.; Coelho, R.R.R.; Alviano, C.S. and Sares, R.M.A., 2003. Purification and characterization of an endochitinase produced by colletotrichum ploeosporioides. FEMS Microbiology Letters., pp. 45-50.
14. Sámi, L.; Pusztahelyi, T.; Emri, T.; Varecza, Z.; Fekete, A.; Grallert, A.; Karanyi, Z.; Kiss, L. and Pócsi, I., 2001. Autolysis and aging of P. chrysogenum cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin. The Journal of General and Applied Microbiology. pp. (4): 201–211.
15. Sandhya, C.; Krishna, L.; Adapa, Madhavan, K; Binod, P.; Szakacsand, G. and Pandey, A., 2004. Extracellular chitinase production By Trichoderma harizianum in submerged fermentation. Basic Microbiol. pp(44); 49-58.
16. Tikhonov,V.; Lopez- Llorca, L.; Salinas, J. and Monfort, E., 2004. Journal of Biochemical and Biophysical mathodes.Issue 14. pp 29-38.

17. Yan R.; Kevin, E.W. and Chang, F.N., 2000. Deficiency of current methods in assaying endochitinase activity. Biochemical and Biophysical Research Communications .pp(268): 302-305.

18. Xiao, X.; Yin, X.; Lin, J.; Sun, L.; You, Z.; Wang, P. and Wang, F., 2005. Chitinase genes in Lake sediments of Ardley Island, Antarctica. Applied and Environmental Microbiology. pp. (12): 7904–7909.