دراسات كيميائية حيوية على إنزيمات الكايتينيز الميكروبية

رسالة مقدمة من

أحمد محيى الدين عبد السميع
بكالوريوس في العلوم الزراعية (كيمياء حيوية زراعية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، ١٩٨٩
ماجستير في العلوم الزراعية (كيمياء حيوية زراعية)- كلية الزراعـــة - جامعة القاهرة ، ١٩٩٦

للحصول على درجة

دكتوراه الفلسفة

في

العلوم الزراعية
(كيمياء حيوية زراعية)

قســـــم الكيمياء الحيوية الزراعية
كليـــــة الزراعـــة
جـامعــة القــاهرة
مصـــــــر

٢٠٠٩

دراسات كيميائية حيوية على إنزيمات الكايتينيز الميكروبية

رسالة دكتوراه الفلسفة
فى العلوم الزراعية
(كيمياء حيوية زراعية)

مقدمة من

أحمد محيى الدين عبد السميع
بكالوريوس في العلوم الزراعية (كيمياء حيوية زراعية) - كلية الزراعة - جامعة القاهرة ، ١٩٨٩
ماجستير في العلوم الزراعية (كيمياء حيوية زراعية) - كلية الزراعـــة - جامعة القاهرة ، ١٩٩٦

لجنة الإشراف

دكتور/ سمير عبد المنعم أحمد
أستاذ الكيمياء الحيوية- كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور/ جابر الباز الدسوقى
أستاذ الكيمياء الحيوية – كلية الزراعة - جامعة القاهرة

دكتور/ سمير على السيد
رئيس بحوث الميكربيولوجى – معهد بحوث الأراضى و المياه و البيئة – مركز البحوث الزراعية

دراسات كيميائية حيوية على إنزيمات الكايتينيز الميكروبية

رسالة دكتوراه الفلسفة
في العلوم الزراعية
(كيمياء حيوية زراعية)

مقدمة من

أحمد محيى الدين عبد السميع
بكالوريوس فى العلوم الزراعية (كيمياء حيوية زراعية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ١٩٨٩
ماجستير فى العلوم الزراعية (كيمياء حيوية زراعية)- كلية الزراعة - جامعة القاهرة، ١٩٩٦

لجنة الحكم

دكتور / محمد صلاح الدين على فوده .....
أستاذ باحث الميكروبيولوجيا – المركز القومي للبحوث

دكتور / محمد فايز فؤاد .....
أستاذ الميكروبيولوجيا – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

دكتور / سمير على السيد .....
رئيس بحوث الميكروبيولوجيا – معهد بحوث الأراضى و المياه و البيئة – مركز البحوث الزراعية

دكتور / سمير عبد المنعم احمد .....
أستاذ الكيمياء الحيوية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

التاريخ / / ٢٠٠٩

استمارة معلومات الرسائل التى تمت مناقشتها

الكلية / المعهد : **الزراعة** **القسم :** الكيمياء الحيوية

١ - **الدرجة العلمية :** ماجستير ☐ دكتوراه ☑

٢ - بيانات الرسالة :

عنوان الرسالة باللغة العربية : دراسات كيميائية حيوية على إنزيمات الكايتينيز الميكروبية

عنوان الرسالة باللغة الأجنبية : Biochemical studies on microbial chitinase

التخصص الدقيق : كيمياء حيوية

تاريخ المناقشة : ٢٠٠٩/٦/٢٨

٣ - بيانات الطالب :

الاسم : أحمد محى الدين عبد السميع الجنسية : مصرى

النـوع :

العنوان : يافع بن يزيد المتفرع من ش مراد بالجيزة رقم التليفون :٣٥٧١٥٩٠٩

جهة العمل : مركز البحوث الزراعية رقم الفاكس : البريد الإلكترونى :

٤ - المشرفون على الرسالة :

الاسم	القسم	الكلية	الجامعة
١ أ.د/ سمير عبد المنعم أحمد	الكيمياء الحيوية/	كلية الزاعة/	جامعة القاهرة
٢ أ.د/ جابر الباز الدسوقى	الكيمياء الحيوية/	كلية الزاعة/	جامعة القاهرة
٣ أ.د/ سمير على السيد	الميكروبيولوجى/	معهد الأراضى/	مركز البحث الزراعية

٥ - مستخلص الرسالة (Abstract)

٥ - ١ باللغة العربية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

(**الكلمات الدالة :** كايتينيز، كايتين، ستربتومايسيتس، تخمر)

تم عزل و تعريف *St. sparsogenes* و *St. Nigrifaciens* و نميت على بيئتى كايتين A و B باستخدام التربتون و البيبتون بتركيز ٠.٢ % و ٠.١٥ % ، على ٤٥ °م، درجة pH = ١٠ و ٩ و مايسيليا فطر *A. niger* الميته الغنية بالكايتين حيث بلغ نشاط الكايتينيز ٨٩٧ و ٦٦٣ وحدة/ المللى لتر على الحضان الهزاز و ١٤٦٩ و ٢١٢٩ وحدة/مللى لتر فى المخمر، على التوالى. الإنزيم CD-٨٥% المفصول للسلالة الثانية أعطى ٤٨٧٢ وحدة/مجم بروتين على ٤٥°م و عند pH = ١٠، بينما دراسات التفريد الكهربى على الجيل والتنقية بإستخدام عامود السيفادكس G-١٠٠ لل أظهرت إحتوائه على إنزيمى كايتينيز.

٥ ـ ٢ باللغة الأجنبية : بشرط ألا يزيد عن ٧ أسطر

(Key Words : chitinase, chitin, streptomycetes, fermentation**)**

St. sparsogenes and *St. nigrifaciens* were isolated and identified. They were grown on chitin medium B and A using tryptone and peptone (0.2% and 0.15%), 45°C, pH 10 and 9, for 50 hrs, utilized fungal chitin and gave chitinolytic activity 897 and 663 U/ml on incubator shaker, while in the fermentor 1469 and 2129 U/ml, respectively. CD-85% fraction of first strain had activity of 4872 U/mg at 45°C and pH 10. Chromatographic studies revealed that it was composed of 2 chitinases.

٦ - **<u>أهم النتائج التطبيقية التى تم التوصل إليها</u>** :

(لا تزيد عن سطرين لكل منها)

٦ - ١ تأكيد وجود ميكروبات منتجه للكايتينيز فى بيئة الرايزوسفير و بعض انواع الكومبوست

٦ - ٢ تمكن بعض العزلات الميكروبية المحلية من تحليل المخلفات الكايتينية المحلية

٦ - ٣

٦ - ٤

٧ – ما هى الجهات التى يمكن أن تستفيد من هذا البحث :

(اذكر هذه الجهات مع شرح أهمية البحث لهذه الجهة بما لا يزيد عن أربعة سطور لكل جهة)

٧ – ١ جهات بحوث امراض النبات و أمراض التربة ، حيث أمكن اثبات اهمية المخلفات الكايتينية المحلية فى استحثاث انتاج الكايتينيز من ميكروبات الرايزوسفير و بالتالى زيادة عددها فى التربة لمقاومة الافات الزراعية الفطرية و الحشرية و النيماتودا

٧ – ٢ شركات اعداد الكومبوست ، حيث ان استخدام كومبوست المصنع من المخلفات البحرية الغنية بالكايتين يمكنه زيادة الميكروبات المقاومة للآفات الزراعية عند استخدامه فى فترة اعداد الارض للزراعة

٧ – ٣

٧ – ٤

٨ – هل توجد علاقة قائمة بإحدى هذا الجهات : **نعم** [نعم] **لا** [ ]

فى حالة نعم اذكر هذه الجهات :

٨ – ١ مركز البحوث الزراعية ، معهد الأراضى و المياه و البيئة

٨ – ٢

٨ – ٣

ما هى طبيعة العلاقة :

مشروع بحثى [ ]

تعاون أكاديمى [ ]

مشروع ممول من جهة ثالثة [ ] (اذكر ما هى :)

أخرى [✓] (تذكر : مقر عمل الباحث و تنفيذ أبحاثه)

٩ - <u>هل توافق على التعاون مع جهات مستفيدة من خلال الجامعة :</u>

لا ☐ **(لماذا**)

نعم ☒

(I) لتطبيق البحث : ☒

(II) لاستكمال البحث : ☒

(ج) أخرى ☐ **(تذكر**)

١٠ - <u>هل تم نشر بحوث مستخرجة من الرسالة في مجلات أو مؤتمرات علمية</u>

(تذكر مع جهة النشر و المكان و التاريخ)

١٠ - ١

لا

١٠ - ٢

١٠ - ٣

١١ - <u>هل سبق التقدم لتسجيل براءات اختراع</u> (تذكر مع الجهة و المكان و التاريخ)

لا

١٢ - <u>هل توافق على إعطاء البيانات المذكورة في هذه الاستمارة لجهات أخرى</u>

نعم ☐ لا ☒

توقيع الطالب : توقيع المشرفين :

-

-

-

-

وكيل الكلية (المعهد) للدراسات العليا و البحوث : التاريخ

BIOCHEMICAL STUDIES ON MICROBIAL CHITINASES

By

AHMED MOHY ELDIN ABD ELSAMIE

B.Sc. Agric. Sci. (Agric. Biochem.), Fac. Agric., Cairo Univ., 1989
M.Sc. Agric. Sci. (Agric. Biochem.), Fac. Agric., Cairo Univ., 1996

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY

In

Agricultural Sciences

(Agricultural Biochemistry)

Department of Agricultural Biochemistry
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2009

APPROVAL SHEET

BIOCHEMICAL STUDIES ON MICROBIAL CHITINASES

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sci. (Agricultural Biochemistry)

By

AHMED MOHY ELDIN ABD ELSAMIE

B.Sc. Agric. Sci. (Agric. Biochem.), Fac. Agric., Cairo Univ., 1989
M.Sc. Agric. Sci. (Agric. Biochem.), Fac. Agric., Cairo Univ., 1996

Approval Committee

Dr. MOHAMED SALAH ELDIN ALY FODA .....
Research Professor of Microbiology, NRC, Giza

Dr. MOHAMED FAYEZ FOAD .....
Professor of Microbiology, Fac. Agric., Cairo University

Dr. SAMIR ALY ELSAID .....
Head of Research of Microbiology, SWERI, ARC, Giza

Dr. SAMIR ABD ELMONEIM AHMED .....
Professor of Biochemistry, Fac. Agric., Cairo University

Date: 28 /6 / 2009

SUPERVISION SHEET

BIOCHEMICAL STUDIES ON MICROBIAL CHITINASES

Ph.D. Thesis
In
Agric. Sci. (Agricultural Biochemistry)

By

AHMED MOHY ELDIN ABD ELSAMIE
B.Sc. Agric. Sci. (Agric. Biochem.), Fac. Agric., Cairo Univ., 1989
M.Sc. Agric. Sci. (Agric. Biochem.), Fac. Agric., Cairo Univ., 1996

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. SAMIR ABD ELMONEIM AHMED
Professor of Biochemistry, Fac. Agric., Cairo University

Dr. GABER ELBAZ ELDESOKY
Professor of Biochemistry, Fac. Agric., Cairo University

Dr. SAMIR ALY ELSAYED
Head of Research of Microbiology, SWERI, ARC, Giza

Name of Candidate: Ahmed Mohy Eldin Abd ElSamie **Degree:** Ph.D.
Title of Thesis: Biochemical Studies on Microbial Chitinases
Supervisors: Dr. Samir Abd ElMoneim Ahmed
Dr. Gaber Elbaz ElDesoky
Dr. Samir Aly ElSayed
Department: Agricultural Biochemistry
Branch: …… **Approval:28/6/2009**

ABSTRACT

Two chitinolytic bacterial candidates were isolated from mango tree rhizosphere and mature compost, after which they were purified. The isolates were identified as *Streptomyces sparsogenes* and *Streptomyces nigrifaciens,* respectively. Optimization of growth conditions on 250ml shaker flask test in 50 ml medium at 150 rpm was accomplished to obtain the highest chitinolytic activity. *St. sparsogenes* was grown on chitin medium B using tryptone as nitrogen source at a concentration of 0.2%, 45°C, pH 10 for 50 hrs that increased its chitinolytic production from 63 to 367 U/ml, while *St. nigrifaciens* was grown on chitin medium A using peptone as nitrogen source at a concentration of 0.15%, 45°C, pH 9 for 50 hrs that increased its chitinolytic production from 58 to 197 U/ml. Both isolates utilized many local chitinic wastes efficiently among which the fungal chitin (*Aspergillus niger* dead mycelia) gave the highest chitinolytic activity (897 and 663 U/ml, respectively). Scaling up in a fermentor, charged with 1L medium and 1 vvm air flow rate, raised the production to 1469 U/ml after 48 hr at 200 rpm and to 2129 after 48 hr at 300 rpm, respectively. *St. nigrifaciens* finaly was grown on local chitinic wastes in the fermentor to produce raw chitinase which was subjected to partial purification by ammonium sulphate precipitation. Three partially purified chitinases separated from the supernatant named SUP-25%, SUP-65% and SUP-85%, had specific activites of 1414, 616 and 641 U/mg, respectively. While from the chitinic debris, two fractions of high affinity to chitin were separated and named CD-65% and CD-85% of specific activites 745 and 2137 U/mg, raising the purification fold to 6.5 and 18.8, while their yield reached 4.3% and 2%, respectively. The optimization of temperature test revealed the superiority of CD-85% fraction, as its chitinolytic specific activity increased to 3650 U/mg at 45°C. The CD-85% optimum pH for hydrolyzing colloidal chitin was found to be pH 10 (4872 U/mg) and remarkably another one at the control pH 6.8 (3507 U/mg). Gel electrophorasis (silver stained) and sephadex G-100 column purification studies on the CD-85% fraction revealed that it might be composed of two chitnases.

Key words: chitinase, chitin, streptomycetes, fermentation.

DEDICATION

I dedicate this work to to my father, my late mother (may God bless her sole), my wife and my two beloving sons Omar and Ismaeil for every thing.

ACKNOWLEDGEMENT

Praise and thanks are to mighty ***God*** *, the most merciful for assisting and directing me always to the right way.*

A worm of gratitude is devoted to ***Dr. Samir Abd Elmoneim,*** *Professor of Agricultural Biochemistry, Fac. Agric., Cairo Univ., for taking the responsibility of supervising this work. His valuable and endless knowledge crownd with his patience virtue and encouragement have helped me always throughout my whole experience and I will always be proud to be his student.*

I would like to express my deep thanks and ultmost gratitude to ***Dr. SAMIR ALY ELSAYED****, Head of Research of Agricultural Microbiology, Agricultural research center, for proposing the research program and plan of study, for his sincere supervision and for giving every possible help and advice he could throughout this work.*

My gratitude is due to the whole staff members of the Agricultural Biochemistry Departement, Fac. Agric., Cairo univ., and Agricultural Microbiology Department, SWERI, Agricultural Research Center, for their endless suplementation of knowledge, sincere help offered through my whole scientific career.

Endless thanks to my beloving father ***Dr. Mohy ElDin Abd Elsamie Farag ElSheikh,*** *the Researcher Professor of Microbial Biotechnology and to my late mother* ***Dr. Awatef Hassan Morsi,*** *Head of Research of Agricultural Microbiology, for their raising me up on the love and eagerness of knowledge on the bases of faith, patience and virtue of Islam.*