عزل ووصف خصائص الكايتين والكايتنيز مع وصف التركيب الجزيئي لجين الكايتنيز من سلالات محلية، المملكة العربية السعودية

سجى الحسين الجدعاني

بأشراف د. معالي حسن علي

د. جيهان خان

المستخلص

الكايتين عبارة عن مركب حيوي طبيعي، ويعتبر من المركبات الاكثر وفرة في الطبيعة بعد السيليلوز. ومن الممكن ان يتحلل الى منتجات اقل في الوزن الجزيئي عن طريق انزيم الكايتنيز. في هذه الدراسة، تم عزل الكايتين من مخلفات الجمبري والصراصير المجموعة من مناطق محلية للملكة العربية السعودية، حيث وجد ان نسبة الكايتين كانت ١٨,٩% و ١,٤% لكل من مخلفات الجمبري و الصراصير، بالتتابع. تم فحص خصائص الكايتين المعزول باستخدام جهاز مطيافية الأشعة تحت الحمراء، التحليل باستخدام حيود الأشعة السينية، والمجهر الالكتروني الماسح. النتائج تم مقارنتها بالكايتين المعزول مسبقا في الابحاث السابقة، وكانت الخصائص متشابهة. من ناحية اخرى، فإن انتاج انزيم الكايتنيز يتضمن اختلاف في النشاط بين الكائنات المختلفة. في هذا البحث، عزلات جديدة تنتمي الى *Streptomyces laurentii* strain ATCC 31255 و*Cellulosimicrobium funkei* strain W6122 عُرفت للمرة الاولى باستخدام تحليل تسلسل جين 16S rDNA فيما يخص انتاجها لإنزيم الكايتنيز، و وجد انها تعطي نشاط انزيمي بمقدار0.٥٣٧ و ٠,٥٣٣ (وحده/مل)، بالتتابع. اعلى نشاط للإنزيم تم الحصول عليه للسلالتين حين نميت البكتيريا في مرق بيئية Luria-Bertani (LB) المحتوية على ١% كايتين غروي، بعد يوم واحد، وفي درجة حرارة 30^0 مئوية. الرقم الهيدروجيني المثالي وجد انه ٤ لـ*S. laurentii*، و٧ لـ *C. funkei*. تم تنقية الانزيم للسلالتين باستخدام كروماتوغرافي الترشيح الهلامي عن طريق هلام Sephadex G-100 و DEAE-Cellulose، ووجد ان لديها وزن جزيئي متشابه قياسه 50 kDa. بالإضافة الى ذلك، فإن الجين المنتج لإنزيم الكايتنيز فحص وعُرف باستخدام ادوات المعلوماتية الحيوية لسلالة *S. laurentii*، بما ان الجينوم الكامل لها موجود. الجين المعرف وجد انه يتكون من إطار القراءة المفتوح لـ٦٨٧ من زَوجُ القَواعد، المشفرة لـ٢٢١ حمض اميني، و نسبة قواعد G+C ٦٨,٢ %. وعلى اية حال، فإنه من الممكن استخدام هذه السلالات لتجربة التطبيقات العديدة للكايتنيز و في اعادة تدوير المخلفات المحتوية على الكايتين.

Isolation and Characterization of Chitin and Chitinase with the Molecular Structure Screening of Chitinase Gene from a Local area strain, Saudi Arabia

By

Saja Alhussain Aljadaani

Supervised By

Dr. Maaly Hassan Ali

Dr. Jehan Khan

ABSTRACT

Chitin is a natural biopolymer, and considered as the most abundant material in earth after cellulose. This biopolymer could be degraded into low molecular weight products through chitinolytic enzymes. In this research, the chitin have been extracted from shrimp shell wastes and cockroaches obtained from local area of Saudi Arabia. The chitin percent were found to be 18.9 and 1.4 % for shrimp shell wastes, and cockroach, respectively. The extracted chitin was characterized using infrared spectroscopy, X-ray diffractometry, and scanning electron microscope. The results were compared with previously isolated chitin in the literatures, and they were quite similar. In other hand, the production of the chitinolytic enzymes implies change in the activity of different species. In this research, a new isolates belonging to *Streptomyces laurentii* strain ATCC 31255 and *Cellulosimicrobium funkei* strain W6122 have been characterize for the first time for their chitinase activity. They were identified using 16S rRNA gene analysis, and in the liquid medium, the two isolates have an enzyme activity of 0.533 and 0.537 (U/ml), respectively. The maximum chitinase production were obtained when those bacterial strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth amended with 1% colloidal chitin, for 1 day, and at temperature of 30 ^{0} C. The optimum pH value were found to be 4 for *S.laurentii* and 7 for *C.funkei*. The enzyme have been purified using Sephadex G-100 and DEAE-Cellulose chromatography column, and found to have a similar molecular size of ~50 kDa. Also, the chitinase encoding gene were screened for *S.laurentii* using bioinformatics based tools, since there complete genome is available. The identified gene were found to have an ORF of 687 bp, encoding 221 amino acid, and a percentage of 68.2 % for G+C. However, those bacterial species could be used to test the different applications of chitinase enzyme and in recycling of disposable chitin wastes.