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.

اسم الطالب: أحمد محيى الدين عبد السميع	**الدرجة:** الدكتوراه
عنوان الرسالة: دراسات كيميائية حيوية على إنزيمات الكايتينيز الميكروبية	
المشرفون : **دكتور :** سمير عبد المنعم **دكتور :** جابر الباز الدسوقى **دكتور :** سمير على السيد	
قسم: الكيمياء الحيوية **فرع:**	**تاريخ منح الدرجة: 2009/6/28**

المستخلص العربي

الهدف الرئيسي لهذا البحث هو عزل و تعريف بكتيريا محلية ذات قدرة عالية لانتاج انزيم الكايتينيز و رفع قدرتها على انتاج المزيد منه بتحسين ظروف النمو و الانتاج و من ثم دراسة مقدرتها على تحليل مخلفات محلية غنيه بالكايتين. يضاف الى هذا دراسة العوامل البيئية المؤثرة على عمل إنزيم الكايتينيز الخام الذى تم فصله و بعض من خصائصه.

تبنت الدراسة عزل سلالتين بكتيريتين من عينة التربه المحيطة بجذور شجر المانجو و كذلك من الكومبوست و تنقيتهما و تعريفعهما، حيث صنفت الأولى *Streptomyces sparsogenes* و صنفت الثانية *Streptomyces nigrifaciens*. تم تحسين ظروف انتاج الكايتينيز بواسطة السلالتين لأعلى نشاط من خلال تطوير ظروف النمو فى 50 مللى لتر من بيئة النمو الموجودة فى دوارق مخروطية سعة 250 مللى لتر باستخدام الحضان الهزاز و سرعة الرج كانت 150 لفة/ق . تمت تنمية *St. sparsogenes* فى بيئة chitin medium B باستخدام التربتون كمصدر وحيد للنتروجين بتركيز 0.2 %، على 45 °م، درجة pH = 10 لمدة 50 ساعة ليزداد الانتاج من الكايتينيز و يرتفع نشاطها من 63 الى367 وحدة/ المللى لتر، بينما تمت تنمية *St. nigrifaciens* فى بيئة chitin medium A باستخدام البيبتون كمصدر وحيد للنتروجين بتركيز 0.15 %، على45 °م، درجة pH = 9 لمدة 50 ساعة ليزداد الانتاج من الكايتينيز و يرتفع نشاطها من 58 الى197 وحدة/ المللى لتر. كل من السلالتين استهلكت النفايات المحليه الغنية بالكايتين و كانت أفضل هذه المصادر المايسيليا الميته من فطر *Aspergillus niger*و التى اعطت معها السلالتين أعلى نشاط لإنزيم الكايتينيز بلغ 897 و 663 وحدة/ المللى لتر، على التوالى. بتنمية كل من السلالتين فى 1 لتر بيئة بالمخمر فقد تعاظم انتاج كل منهما للكايتينيز حيث بلغ نشاط الانزيم المنتج 1469 و 2129 وحدة/مللى لتر بعد 48 ساعة و بإستخدام سرعة قلاب 200 و 300 لفة/ق ، على التوالى.

أختيرت سلالة *St. nigrifaciens* لتنميتها فى المخمر على خليط من مخلفات غنية بالكايتين. فصل الإنزيم الخام الناتج بالترسيب بتركيزات مختلفة من كبريتات الأمونيوم حيث فصل من الراشح ثلاثة إنزيمات كايتينز SUP-%25، SUP-%65 و SUP-%85 و نشاطها النوعى كان 1414 ، 616 و 641 وحدة/مجم بروتين على التوالى. بينما فصل أنزيمى كايتينيز 65% -CD و 85%-CD من الراسب و نشاطهما النوعى كان 745 و 2137 وحدة/مجم بروتين لتبلغ درجة نقاوتهما 6.5 و 18.8 ضعف الأنزيم الخام، بينما بلغا لإسترجاع 4.3% و 2% على التوالى. سجل 85%-CD نشاط نوعى 3650 وحدة/مجم بروتين على 45°م و ازداد الى 4872 وحدة/مجم بروتين عند pH = 10. دراسات التفريد الكهربى على الجيل (مصبوغا بالفضه) و التنقية بإستخدام عامود السيفادكس G-100 لل 85 % -CD أظهرت إحتوائه على إنزيمى كايتينيز.

الكلمات الدالة: كايتينيز، كايتين، ستربتومايسيتس، تخمر.

CONTENTS

pages

INTRODUCTION **1**

REVIEW OF LITERATURE **3**

1. The substrate and the enzyme **3**

2. The physiological roles of chitinases **15**

3. Chitinases from microorganisms **19**

4. Advantages of using chitinolytic Streptomycetes in Biocontrol **31**

5. Purification and properties of chitinases isolated from different microbial sources **32**

MATERIALS AND METHODS **47**

1. Materials **47**

a. Chitin **47**

b. Buffers used **47**

c. Soil samples **47**

d. Microbiological media **48**

2. Methods **53**

a. Chemical methods **53**

1. Determination of soil pH **53**

2. Colloidal chitin preparation **53**

3. Determination of chitinase activity in soil **54**

4. Determination of chitinase activity in microbial culture filtrate **55**

5. N-acetyl-glucosamine reducing end determination **56**

6. Effects of initial pH on chitinase production and activity **57**

7. Effect of temperature on chitinase production **58**

8. Effect of temperature on semi-purified chitinase activity **59**

9. Protein determination **59**

10. Chitinase separation and purification **60**
b. Microbiological methods **62**
1. Clear zone test for Isolation of chitinolytic microorganism **62**
2. Preparation of the starter **62**
3. Submerged culture in classical shaker flasks **63**
4. Submerged culture in Fermentor **63**
5. The nitrogen source and concentration in production media **64**
6. Morphological characteristics for classification **64**
7. Physiological characteristics **66**
c. Statistical analysis **67**
RESULTS AND DISCUSSION **68**
1. Isolation of chitinolytic rhizobacteria **68**
2. Secondary screening for chitinolytic activity **71**
3. Identification of isolates.. **75**
4. Effect of nutritional requirements and environmental conditions on chitinolytic activity **82**
a. Effect of different nitrogen sources **82**
b. Effect of initial pH value on chitinase production **89**
c. Effect of incubation temperature **96**
d. Effect of nitrogen source concentration **101**
e. Effect of chitin waste source **106**
f. Effect of agitation speed on chitinase activity **111**
5. Chitinase production using mixture of chitin wastes and its partial purification with ammonium sulphate **116**
6. Gel electrophoresis **122**
7. Effect of assay conditions on chitinolytic specific activity of the partially purified fractions **125**
a. Effect of incubation temperature **125**
b. Effect of pH **130**

8. Gel purification column chromatography using sephadex G100 for the CD85% fraction ………………………..………… **134**

SUMMARY ………………………………………………………….….. **137**

REFERENCES ……….……………..……………………….…………… **146**

ARABIC SUMMARY