

## Pengenalpastian dan Pencirian Gen *Trichoderma virens* UKM1 Mengekod Enzim Terlibat dalam Pencuraian Kitin Krustasea

(Identification and Characterisation of *Trichoderma virens* UKM1 Genes Encoding for Enzymes Involved in the Degradation of Crustacean Chitin)

ABDUL MUNIR ABDUL MURAD\*, RAFIDAH BADRUN, SAKINA SHAHABUDIN, SHAZILAH KAMARUDDIN, MADIHAH AHMAD ZAIRUN, FARAHAYU KHAIRUDDIN, NOR MUHAMMAD MAHADI, ROSLI MD. ILLIAS, ZAMRI ZAINAL & FARAH DIBA ABU BAKAR

### ABSTRAK

Kitin merupakan polisakarida struktur yang dapat dicurai oleh enzim kitinolitik kepada pelbagai terbitan yang boleh digunakan dalam bidang perubatan, pertanian dan rawatan air. Pengenalpastian dan pencirian gen-gen *Trichoderma virens* UKM1 mengkod enzim terlibat dalam pencuraian kitin krustasea telah dilakukan melalui penjanaan penanda jujukan terekspres (ESTs) dan analisis pengekspresan gen menggunakan mikroatur DNA. Sebanyak tiga perpustakaan cDNA *T. virens* UKM1 yang masing-masing diaruh oleh kitin, glukosamina dan kitosan telah dibina. Sejumlah 1536 klon cDNA telah dijujukan dan sebanyak 1033 ESTs berkualiti telah dijana. Seterusnya, perbezaan pengekspresan gen apabila pertumbuhan kulat diaruh dengan kehadiran kitin krustasea dan tanpa kitin pada hari ketiga dan kelima telah ditentukan. Sebanyak 1824 klon cDNA telah dititik ke atas slaid kaca dan dihibrid bersama dengan cDNA terlabel Cy3 atau Cy5 yang disintesis daripada mRNA yang dipencil daripada kulat yang ditumbuhkan dalam medium mengandungi kitin krustasea atau glukosa (kawalan). Sebanyak 91 dan 61 gen, masing-masing bagi hari ketiga dan kelima didapati terekspres melebihi dua ganda apabila kulat menggunakan kitin krustasea sebagai sumber karbon. Beberapa gen mengkod kitinase seperti *ech1* dan *cht3* (endokitinase), *nag1* (eksokitinase) dan *nagB* (glukosamina 6-P-deaminase) didapati terekspres dengan tinggi pada kedua-dua hari. Selain daripada itu, gen mengkod protein hidrofobin, protease serina dan beberapa protein hipotetik juga terekspres dengan tinggi dengan kehadiran kitin krustasea. Protein-protein ini dijangka memainkan peranan penting dalam membantu pencuraian kitin krustasea.

**Kata kunci:** Kitin; kitinase; mikroatur DNA; penanda jujukan terekspres; *Trichoderma virens*

### ABSTRACT

Chitin is a structural polysaccharide which can be degraded by chitinolytic enzymes to various derivatives that can be utilised in medicine, agriculture and water treatment. The identification and characterisation of *Trichoderma virens* UKM1 genes encoding for enzymes involved in crustacean chitin degradation were carried out by generating expressed sequence tags (ESTs) and analysing gene expression via DNA microarray. Three cDNA libraries of *T. virens* UKM1 induced with chitin, glucosamine and chitosan, respectively, were constructed. A total of 1536 cDNA clones were sequenced and 1033 of high-quality ESTs were generated. Subsequently, differences in gene expression between cells grown in the presence and absence of crustacean chitin on the third and fifth days were determined. A total of 1824 cDNA clones were spotted on glass slides and co-hybridised with Cy3- or Cy5-labeled cDNA, synthesised from mRNA isolated from cells grown in medium containing crustacean chitin or glucose (control). A total of 91 and 61 genes were expressed by more than two-fold on the third and fifth day, respectively, when the fungus used crustacean chitin as the carbon source. Several genes encoding for chitinase such as *ech1* and *cht3* (endochitinases), *nag1* (exochitinase) and *nagB* (glucosamine 6-P-deaminase) were found highly expressed on both days. In addition, genes encoding for hydrophobin, serine protease and several hypothetical proteins were also expressed at high levels when cells were exposed to crustacean chitin. These proteins may play significant role in the degradation of crustacean chitin.

**Keywords:** Chitin; chitinase; DNA microarray; expressed sequence tag; *Trichoderma virens*

### PENGENALAN

Kitin merupakan polisakarida yang terbina daripada rantaian N-asetilglukosamina (GlcNAc) dan merupakan komponen perlindungan bagi krustasea bercangkerang dan dinding sel kulat (Kurita 2006). Setiap tahun, industri makanan laut dunia menghasilkan sisa pepejal berkitin yang mencecah

hingga 100 bilion tan metrik (Rattanakit et al. 2002). Pelbagai usaha dijalankan untuk memastikan sisa kitin tersebut dapat dimanfaatkan sepenuhnya memandangkan kitin dan terbitannya seperti kitosan, GlcNAc dan glukosamina mempunyai potensi untuk digunakan dalam pelbagai bidang (Kumar 2000; Kurita 2006).

Pada masa ini, bahan terbitan kitin seperti GlcNAc dihasilkan dengan kaedah hidrolisis kitin krustasea menggunakan asid hidroklorik (Kumar 2000). Namun demikian, kaedah ini menimbulkan beberapa masalah seperti penghasilan produk spesifik yang rendah serta penghasilan sisa berasid. Hidrolisis menggunakan enzim dilihat lebih sesuai memandangkan proses pencuraianya lebih terkawal, penghasilan produk spesifik yang lebih tinggi dan penggunaannya lebih selamat dan mesra alam (Tharanathan & Kittur 2003). Oleh itu, kajian terhadap enzim pencurai kitin yang dihasilkan oleh pelbagai mikroorganisma yang dapat mengitar semula sisa kitin dalam persekitaran seperti bakteria (Uria et al. 2005), yis (Ramli et al. 2011) dan kulat berfilamen (Rattanakit et al. 2002) giat dijalankan.

Enzim yang berperanan dalam pencuraian kitin iaitu kitinase (EC 3.2.1.14) terbahagi kepada dua kumpulan utama iaitu endokitinase dan eksokitinase (Li 2006). Endokitinase memotong kitin secara rawak pada bahagian tengah rantaian dan menghasilkan rantaian GlcNAc yang mempunyai berat molekul rendah seperti kitotetraose, kitotriose dan diasetilkitobiose. Eksokitinase pula terbahagi kepada dua subkategori iaitu kitobiosidase dan  $\beta$ -(1,4)-N-asetil-glukosaminidase. Kitobiosidase memangkin pembebasan diasetilkitobiose bermula pada hujung tidak terturun molekul kitin manakala  $\beta$ -(1,4)-N-asetil-glukosaminidase memotong secara ekso ke atas diasetilkitobiose atau polimer kitin seperti kitotriose dan kitotetraose kepada monomer, GlcNAc (Li 2006).

*Trichoderma virens* merupakan kulat mikoparasit yang hadir di dalam tanah dan berupaya untuk merencat pertumbuhan kulat lain dengan merembes kitinase yang mampu mencurahi dinding sel kulat sasaran (Harman et al. 2004). Selain daripada itu, kulat ini juga didapati berupaya mencurahi kitin daripada cengkerang krustasea untuk menghasilkan oligokitin dan GlcNAc (Suraini et al. 2008). Kajian oleh Kim et al. (2002) telah mengenal pasti sekurang-kurangnya lapan gen mengekod kitinase yang hadir di dalam genom *T. virens* strain 29-8, termasuklah endokitinase kelas III (*cht1* dan *cht2*), endokitinase kelas V (*ech1*, *ech2*, *ech3* dan *ech3b*) dan eksokitinase (*nag1* dan *nag2*). Namun begitu, gen-gen tersebut menunjukkan corak pengekspresan yang berbeza dengan kehadiran kitin daripada sumber yang berbeza. Gen *ech1*, *nag1* dan *nag2* didapati terekspres dengan kehadiran kitin daripada dinding sel kulat, *nag1* dan *ech1* terekspres dengan kehadiran kitin krustasea, manakala *ech2* terekspres dengan tinggi dalam medium mengandungi glukosa tetapi tidak terekspres dalam medium yang mengandungi kitin (Kim et al. 2002). Kajian oleh Al-Rashed et al. (2010) pula menunjukkan pengekspresan *cht2* teraruh dengan kehadiran kitin krustasea di dalam medium pertumbuhan. Pemerhatian ini mencadangkan kitinase yang hadir di dalam *T. virens* mempunyai peranan tersendiri dalam memastikan kemandirian kulat ini dalam persekitaran.

Oleh itu, objektif kajian ini ialah untuk mengenal pasti gen *T. virens* yang mengekod kitinase serta protein-protein lain yang diperlukan dalam pencuraian kitin krustasea. Maklumat yang diperolehi di harap dapat digunakan dalam

pembangunan enzim *T. virens* bagi mencurahi sisa kitin krustasea yang dihasilkan oleh industri makanan laut kepada produk yang mempunyai nilai tambah.

## BAHAN DAN KAEDAH

### PENGEKSTRAKAN RNA *T. virens* UKM1

Kulat *T. virens* UKM1 diperolehi daripada kultur stok kulat Makmal Mikologi Molekul, Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia. Untuk pembinaan perpustakaan cDNA teraruh, kulat dikulturkan dalam medium terhad nitrogen (Kendrick & Ratledge 1992) yang mengandungi bahan aruhan kitin koloid (3%) yang dihasilkan daripada cengkerang krustasea (Sigma, USA), glukosamina (1%) (Sigma, USA) atau kitosan (1%) (Sigma, USA) sebagai sumber karbon tunggal. Inokulasi kulat dilakukan dengan menggunakan larutan spora daripada kultur kulat yang telah dikultur di atas piring agar kentang dekstroza (PDA, Difco, USA) selama tujuh hari. Kepekatan konidium yang digunakan adalah  $1 \times 10^6$  konidium/mL. Untuk pembinaan perpustakaan cDNA, miselium dituai pada hari kedua hingga hari ketujuh dan terus disejuk beku dalam cecair nitrogen dan disimpan pada suhu  $-80^\circ\text{C}$ . Pengekstrakan RNA jumlah dilakukan daripada 3 g miselium kulat *T. virens* UKM1 mengikut kaedah seperti yang diterangkan oleh Oh et al. (2009).

### PEMBINAAN PERPUSTAKAAN cDNA DAN PENJANAAN EST

Pemencilan mRNA daripada 1 mg RNA dilakukan dengan menggunakan kit mRNA purification (Promega, USA) manakala pembinaan perpustakaan cDNA dilakukan dengan menggunakan kit ZAP-cDNA<sup>®</sup> Synthesis (Stratagene, USA) mengikut kaedah yang dicadangkan oleh pengeluar. Seterusnya, fajmid yang membawa DNA rekombinan telah diekstrak daripada *Escherichia coli* menggunakan kaedah yang dicadangkan oleh pengeluar kit (Stratagene, USA) dan cDNA dijujukan menggunakan mesin penjujukan berautomasi ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 genetic analyzer (Applied Biosystem, USA). Pencetus yang digunakan ialah SK-F (5'-TCG AGG TCG ACG GTA TC-3') atau SK-R (5'-TCT AGA ACT AGT GGA TCC-3'). Penyuntingan jujukan DNA dilakukan dengan menggunakan program Phred (Ewing et al. 1998) manakala jujukan ESTs dikelompok menggunakan program stackPACK<sup>™</sup> v2.2 (George 2001). Seterusnya, jujukan konsensus dan EST tunggal yang terhasil dibandingkan dengan jujukan lain di dalam pangkalan data nukleotida dan protein di National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA menggunakan program BLASTX (Altschul et al. 1997).

### PEMBINAAN SLAID MIKROATUR DNA

Selitan klon cDNA diamplifikasi dengan menggunakan kaedah tindak balas berantai polimerase (PCR) yang dilakukan di dalam piring PCR 96-telaga dengan menggunakan pencetus universal M13-F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3') dan M13-R (5'-GGAAAC AGC

TAT GAC CAT-3'). Tindak balas melibatkan penyahasian awal pada 95°C selama 2 min, diikuti dengan penyahasian pada 95°C selama 30 s, penyepuhan pada 52°C selama 30 s dan pemanjangan pada 72°C selama 2 min untuk 30 kitaran. Jumlah produk PCR yang dihasilkan ialah 1824 ampikon yang mewakili transkrip unik dan klon cDNA yang belum dijujok. Secara keseluruhannya taburan klon yang dipilih adalah seperti berikut: 1056 klon cDNA daripada perpustakaan aruhan kitin krustasea, 480 klon cDNA daripada perpustakaan aruhan glukosamina dan 288 klon cDNA daripada perpustakaan aruhan kitosan. Selain itu, gen mengekod kitinase *T. virens* yang telah dikenal pasti daripada kajian terdahulu iaitu *cht1*, *cht2*, *ech1*, *ech2*, *ech3*, *ech3b*, *nag1* dan *nag2* (Kim et al. 2002), kawalan positif (cDNA terkumpul dan DNA genom *T. virens*) dan kawalan negatif (gen-gen daripada *Saccharomyces cerevisiae* dan *E. coli*) (Khoo et al. 2009) juga telah dipilih dalam senarai mikroatur. Kesemua produk PCR serta kawalan positif dan negatif dipindahkan ke piring mikrotiter 384-telaga dan ditambah dengan 50% DMSO dan seterusnya dititikkan ke atas slaid kaca bersalut aminosilana (Corning®, USA). Sebanyak 1920 prob termasuk klon cDNA serta prob kawalan positif dan negatif dipegun secara duplikat di atas slaid tersebut. Slaid yang telah dititik, dihidrat seketika di atas wap air, dipanaskan pada plat pemanas bersuhu 80°C selama 2 s dan dipegunkan dengan sinaran UV dengan kekuatan 3000 mJ (Khoo et al. 2009).

#### PENGHASILAN PROB MIKROATUR DNA

Dua populasi RNA diekstrak daripada kulat yang dituai pada hari ketiga dan kelima pertumbuhan di dalam medium terhad nitrogen menggunakan kaedah seperti yang diterangkan oleh Oh et al. (2009). RNA kulat yang hidup dalam medium pertumbuhan yang mempunyai kitin krustasea sebagai sumber karbon tunggal adalah sampel aruhan manakala RNA kulat yang hidup dalam medium pertumbuhan yang mengandungi glukosa adalah mewakili kawalan. RNA jumlah digunakan untuk sintesis cDNA bebenang pertama dengan menggunakan kit cDNA synthesis and labelling cyscribe™ (Amersham Bioscience, USA). cDNA yang mewakili sampel aruhan telah dilabel dengan pewarna karbosianin Cy3 (hijau) manakala cDNA daripada kulat kawalan pula dilabel dengan Cy5 (merah). Eksperimen penukaran pewarna (*dyeswap*) juga dilakukan dengan melabelkan cDNA kawalan dengan Cy3 dan cDNA aruhan kitin dengan Cy5 bagi tujuan pernormalan data dan meningkatkan jumlah replikasi data.

#### HIBRIDISASI DAN ANALISIS DATA MIKROATUR DNA

Proses pra-hibridisasi, hibridisasi dan pembersihan slaid mikroatur DNA dijalankan dengan menggunakan kaedah seperti yang diterangkan oleh Khoo et al. (2009). Slaid yang telah dihibridisasi diimbis dengan mesin pengimbas GenePix Personal 4100A (Axon, USA) menggunakan modul Cy3 dan Cy5 berdasarkan jarak gelombang masing-masing pada 550 nm dan 650 nm. Imej yang diperoleh

diproses menggunakan perisian GenePix™ Pro 6.0 sebelum keamatan isyarat prob dianalisis. Data yang diperoleh seterusnya dianalisis menggunakan perisian GeneSpring GX 7.3.1 (Agilent Technologies, USA). Data dinormalkan menggunakan Lowess dengan nilai pengehad sebanyak 10.0 (Berger et al. 2004). Seterusnya gen yang menunjukkan kadar pengekspresan  $\geq 2$ -gandaan di dalam sampel aruhan dikenal pasti. Analisis *t-test* telah dijalankan bagi mengenal pasti gen yang menunjukkan perbezaan pengekspresan yang signifikan dengan nilai  $p \leq 0.05$ . Kesemua program yang digunakan untuk analisis data mikroatur DNA dibekalkan oleh perisian GeneSpring GX 7.3.1.

#### PEMENCILAN DAN PENCIRIAN *cht3*

Jujukan penuh *cht3* diampifikasi daripada DNA genom *T. virens* yang dipencil menggunakan kaedah seperti yang diterangkan oleh Oh et al. (2009). Pasangan pencetus yang digunakan untuk PCR ialah ORF-*cht3F* (5'-TCA ATA CTG TCA AAA TGG TTC GGT C-3') dan ORF-*cht3R* (5'-CTT TGG CGT TAC TTT CGG CAT TAC-3'). Produk PCR diklon ke dalam vektor pengklonan dan dijujok. Jujukan peptida isyarat diramal dengan program SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) manakala analisis domain dilakukan dengan menggunakan perisian InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>) dan PROSITE (<http://www.expasy.org/cgi-bin/prosite>).

#### HASIL DAN PERBINCANGAN

##### PEMBINAAN PERPUSTAKAAN DAN ANALISIS JUJUKAN CDNA *T. virens* UKMI

Sebanyak tiga perpustakaan cDNA daripada mRNA yang diperoleh daripada kulat yang dikulturkan dalam tiga sumber karbon yang berbeza iaitu kitin, glukosamina dan kitosan telah dibina. Pengiraan titer perpustakaan cDNA dilakukan bagi menentukan kualiti perpustakaan yang dijana. Hasil analisis menunjukkan jumlah setiap perpustakaan primer cDNA bagi aruhan kitin, glukosamina dan kitosan masing-masing mempunyai bilangan plak sebanyak  $2.6 \times 10^4$ ,  $6.9 \times 10^4$  dan  $4.7 \times 10^4$  pfu.

Analisis jujukan cDNA *T. virens* UKM1 yang dilakukan melibatkan penyaringan kualiti jujukan ESTs dan pepadanan fungsi dengan jujukan dalam pangkalan data BLASTX. Analisis ini mendapati daripada 1536 klon cDNA yang dijujok, sebanyak 1033 ESTs berkualiti telah diperoleh untuk ketiga-tiga perpustakaan cDNA iaitu 559, 195 dan 279 ESTs masing-masing daripada perpustakaan cDNA teraruh kitin, glukosamina dan kitosan. Analisis keberulangan jujukan ESTs menunjukkan sebanyak 406 jujukan ESTs daripada perpustakaan teraruh kitin mewakili jujukan tunggal manakala 153 adalah jujukan konsensus (beberapa jujukan ESTs yang mewakili gen yang sama dikategori sebagai satu konsensus). Bagi perpustakaan teraruh glukosamina, sebanyak 144 jujukan ESTs adalah jujukan tunggal dan 51 merupakan jujukan konsensus manakala untuk perpustakaan

teraruh kitosan, sebanyak 22 jujukan tunggal dan 257 jujukan konsensus telah dikenal pasti. Jujukan unik EST daripada ketiga-tiga perpustakaan cDNA telah didaftarkan di dalam pangkalan data GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Turutan nombor akses yang terlibat bagi jujukan daripada perpustakaan cDNA aruhan kitin adalah bermula daripada EE296460 hingga EE296833. Manakala nombor akses perpustakaan cDNA aruhan kitosan adalah daripada EE572265 hingga EE572293 dan nombor akses perpustakaan cDNA aruhan glukosamina pula daripada EE594944 hingga EE595119.

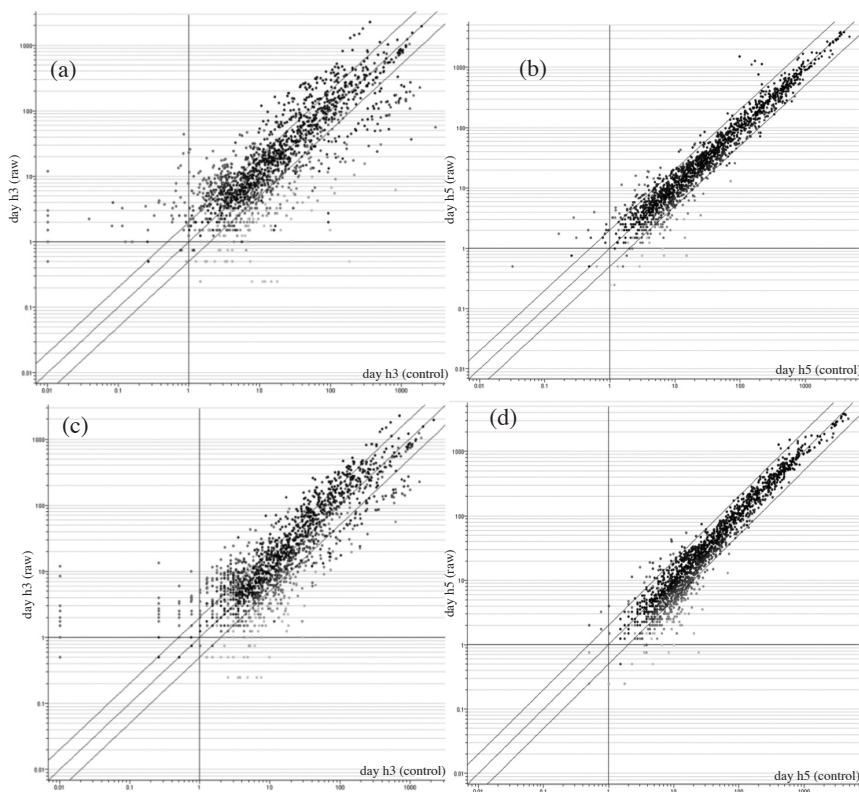
Melalui hasil analisis perbandingan dengan jujukan dalam pangkalan data NCBI menggunakan BLASTX, beberapa klon yang mengekod enzim kitinolitik *T. virens* UKM1 yang terlibat dalam tapak jalan pencuraian kitin telah dikenal pasti. Perpustakaan cDNA teraruh kitin memberikan tiga klon yang membawa gen terlibat dalam pencuraian kitin iaitu *ech1* (identiti klon: TvC202A06; nombor akses EE296723), *nag1* (identiti klon: TvC201D08; nombor akses EE674223) dan *gls3* (identiti klon: TvC103A02; nombor akses EE296579) masing-masing daripada kumpulan endokitinase, eksokitinase dan kitosanase. Perpustakaan aruhan glukosamina memberikan dua klon iaitu *nag1* (identiti klon: TvGM01D04; nombor akses EE674251) yang mengekod eksokitinase dan *nagB* (identiti klon: TvGM01F11; nombor akses EE594986) yang mengekod glukosamina 6-fosfat deaminase. Tiada klon mengekod kitinase diperoleh daripada perpustakaan aruhan kitosan.

#### ANALISIS PENGEKSPRESAN DAN PENCIRIAN GEN *T. virens* UKM1 YANG DIARUH OLEH KITIN KRUSTASEA

Data mikroatur DNA yang terhasil diproses menggunakan perisian GeneSpring GX 7.3.1. Pernormalan data menggunakan Lowess telah berjaya memperbetulkan taburan nilai pengekspresan gen-gen yang terlibat (Rajah 1). Seterusnya, gen-gen yang memberikan nilai pengekspresan melebihi dua gandaan yang signifikan apabila kulat ditumbuhkan di dalam medium berkitin berbanding medium kawalan (glukosa) dikenal pasti.

Analisis terhadap data pengekspresan yang diperoleh pada hari ketiga menunjukkan sebanyak 91 gen telah terekspres melebihi dua gandaan dalam medium berkitin berbanding kawalan. Sebanyak 52 cDNA tersebut berasal daripada klon-klon yang belum diujuk, manakala 39 cDNA adalah daripada klon yang telah pun diujuk dan diketahui fungsi putatif. Analisis data bagi hari kelima pula menunjukkan sebanyak 61 gen terekspres melebihi dua gandaan dalam medium berkitin. Sebanyak 39 jujukan merupakan selitan bagi klon yang belum diujuk sementara 22 jujukan telah diujuk dan diketahui fungsi putatifnya. Gen-gen yang belum diujuk seterusnya diujuk bagi mengenal pasti fungsi protein yang dikodkan oleh gen-gen tersebut.

Berdasarkan data ESTs, gen *T. virens* UKM1 yang mengekod enzim kitinolitik dan terlibat dalam pencuraian kitin, *nag1*, *ech1* dan *nagB*, telah dikenal pasti. Kajian mikroatur DNA mendapati kesemua gen tersebut



RAJAH 1. (a) dan (b) Plot taburan yang mewakili corak pengekspresan gen hari ketiga, (a): sebelum normalisasi dan (b) selepas normalisasi. (c) dan (d) Plot taburan yang mewakili corak pengekspresan gen hari kelima, (c): sebelum normalisasi (d): selepas normalisasi. Paksi-x: nilai isyarat sampel kawalan dan paksi-y: nilai isyarat sampel eksperimen (sampel teraruh)

memberikan isyarat pengekspresan melebihi dua gandaan pada hari ketiga dan kelima eksperimen (Jadual 1 dan 2). Ini menunjukkan bahawa enzim yang dikod oleh gen-gen tersebut terlibat dalam aktiviti pencuraian kitin krustasea. Gen *ech1* mengekod endokitinase dan memangkin pemotongan molekul kitin secara rawak pada bahagian tengah rantaian bagi menghasilkan multimer GlcNAc.

Gen *nag1* mengekod enzim kitobiase dan memangkin pemotongan secara ekso ke atas diasetilkitobiose atau oligokitin kepada monomer, GlcNAc. Gen *nagB* pula mengekod glukosamina-6-P deaminase dan berperanan dalam tindak balas penukaran glukosamina 6-fosfat kepada fruktosa 6-fosfat yang akan memasuki tapak jalan glikolisis (Tanaka et al. 2005).

JADUAL 1. Gen-gen *T. virens* UKM1 yang terekspres melebihi dua gandaan di dalam medium aruhan kitin pada hari ketiga pertumbuhan

Identiti klon cDNA	Fungsi putatif	Gandaan pengekspresan*	Nombor aksesori EST GenBank
TvC2Ex1A08	Protein hipotetik	48.54	EE674279
TvC2Ex1G04	Protein hipotetik	35.69	EE674290
TvC202F02	Protein hipotetik	32.25	EE674301
TvGM01C06	Protein hipotetik	26.33	EE674232
TvC2Ex2H05	Protein hipotetik	26.21	EE674312
TvC1Ex1B07	Hidrofobin I	19.23	EE674323
TvC1Ex2H07	Protein hipotetik	17.75	EE674334
TvC2Ex3C01	Protein hipotetik	15.95	EE674356
TvC203B10	Protein hipotetik	15.06	EE674345
TvC1Ex3H04	Protein hipotetik	14.71	EE674378
TvC201F11	Protein membran	10.98	EE674389
TvC2Ex1F05	Protein hipotetik	9.99	EE674400
TvC203B11	Glutaminase GtaA	8.05	EE674411
TvGM03B01	Protein hipotetik	5.91	EE674233
TvC1Ex2C04	Piruvat dehidrogenase	5.90	EE674422
TvC202F10	Pengangkut glukosa	5.78	EE296762
TvC2Ex2G03	Protein tidak diketahui fungsi	5.60	EE674433
TvC1Ex1A07	Protein tidak diketahui fungsi	5.40	EE674444
TvC203B04	Protein hipotetik	4.84	EE674455
TvGM01F11	Glukosamina-6-fosfat deaminase (NagB)	4.76	EE594986
TvK02D10	Protein Qid74	4.67	EE674541
TvC2Ex1F02	Protein hipotetik	4.60	EE674466
TvC101A05	Protein hipotetik	4.50	EE296464
TvK01F05	Tiada padanan	4.35	EE674552
TvC201H02	Protein lisis sel	4.21	EE674488
TvC201G07	ATPase pengangkut kation	4.02	EE674499
TvC1Ex2G12	Protein jangkaan	3.95	EE674510
TvC2Ex1F10	Protein hipotetik	3.91	EE674521
TvC1Ex1E07	Spermidine sintase	3.90	EE674532
TvGMEx2D10	Siklin	3.85	EE674234
TvGM01B10	Protein hipotetik	3.65	EE674236
TvGM01D06	Protein hipotetik	3.51	EE674237
TvC2Ex2D01	Tirosinase 2	3.36	EE674540
TvC2Ex2E03	Protein hipotetik	3.35	EE674542
TvK02C03	Pengangkut ABC	3.25	EE674563
TvC2Ex1B02	Kitinase kelas III	3.25	EE674543
TvC1Ex1G10	Mannose fosfo-dolikel sintase	3.25	EE674544
TvC1Ex2G02	Protein hipotetik	3.22	EE674545
TvC1Ex1D03	Protein hipotetik	3.15	EE674546
TvC201G05	Kitobiase (Nag1)	3.15	EE296715
TvGMEx2D05	Protein hipotetik	3.12	EE674238
TvC101H10	Protein hipotetik	3.10	EE674547
TvK02B04	Protein jangkaan	3.10	EE674574
TvGM02F07	Subunit ATPase vakular	3.05	EE674239
TvC1Ex1A04	Protein hipotetik	3.04	EE674548
TvGM02A05	Tirosinase 2	3.01	EE674240

(bersambung)

Sambungan JADUAL 1

Identiti klon cDNA	Fungsi putatif	Gandaan pengekspresan*	Nombor aksesori EST GenBank
TvC103D07	RNA helicase bergantung ATP	2.90	EE674549
TvGMEx2E01	Protein hipotetik	2.89	EE674241
TvC202C03	Protein hipotetik	2.80	EE674550
TvC203G10	Protein hipotetik	2.77	EE674551
TvKEx1E07	Tiada padanan	2.73	EE674585
TvGMEx1G10	Kitinase (Ech1)	2.70	EE674242
TvC2Ex2C04	Glukosa dehidrogenase	2.70	EE674553
TvC203G07	Protein 40s ribosomal	2.69	EE296801
TvGM03C01	Protein hipotetik	2.69	EE674243
TvGMEx2E12	GTPase	2.60	EE674244
TvC2Ex3G10	Protein jangkaan	2.55	EE674554
TvGM01H06	Protease serina	2.53	EE674245
TvC101A10	Protein hipotetik	2.49	EE296466
TvC1Ex3A04	Protein ribosom mitokondria subunit S28	2.46	EE674555
TvC103H06	Protein hipotetik	2.46	EE296630
TvC101A03	Poliketid sintase	2.45	EE674556
TvGMEx2C08	Protein membran peroksisomal (Pex13)	2.44	EE674247
TvC203E03	Tiada padanan	2.42	EE674557
TvC101F03	Protein hipotetik	2.40	EE674558
TvC2Ex3B12	Protein jangkaan	2.40	EE674559
TvC1Ex3E11	Protein sitokrom P450 monoooksigenase	2.36	EE674560
TvC101B06	Protein jangkaan	2.35	EE674561
TvK01G08	Protein <i>zinc finger</i>	2.30	EE674596
TvC2Ex2F06	Protein hipotetik	2.30	EE674562
TvGM02E05	<i>Translationally Controlled Tumor-Associated Protein</i>	2.26	EE674248
TvC202C11	Lisofosfolipase	2.25	EE296743
TvC101B01	Protein pengikat cullin	2.25	EE674564
TvGM02C11	Protein hipotetik	2.22	EE674249
TvC201F09	Protein kaya lisina	2.21	EE674565
TvC2Ex1G10	Protein jangkaan	2.20	EE674566
TvGM03G09	Ubiquitin ligase	2.20	EE674250
TvC203H06	Enzim konjugat ubiquitin	2.17	EE674567
TvC2Ex1F03	Asid Protease B	2.17	EE674568
TvC101E11	Protein hipotetik	2.16	EE674569
TvC101C03	Protein hipotetik	2.15	EE674570
TvC2Ex1C11	Protein hipotetik	2.15	EE674571
TvC103A10	Protein hipotetik	2.15	EE674572
TvC101D03	Protein hipotetik	2.10	EE674573
TvGM01D10	Protein tidak diketahui fungsi	2.10	EE594969
TvC101A08	Protein hipotetik	2.08	EE674575
TvK01G07	Protein hipotetik	2.06	EE674224
TvC1Ex3E01	Protein hipotetik	2.05	EE674576
TvC202H03	Poliketid sintase	2.00	EE674577
TvC1Ex3F04	Protein hipotetik	2.00	EE674578
TvC101D02	Ankrin	2.00	EE674579

\*Perbezaan pengekspresan adalah signifikan dengan nilai  $p \leq 0.05$  yang ditentukan melalui analisis *t-test*

Analisis data mikroatur DNA juga menunjukkan sebahagian gen kitinase yang digunakan sebagai kawalan positif tidak terekspres dengan tinggi semasa sel dikultur dalam medium mengandungi kitin krustasea. Ini termasuklah gen *ech2*, *cht1* dan *cht2* yang mengekod endokitinase dan *nag2* yang mengekod eksokitinase. Pemerhatian ini berpadanan dengan analisis pembloatan Northern yang dilakukan oleh Kim et al. (2002) yang mendapati *ech2* dan *nag2* tidak menunjukkan sebarang

pengekspresan di dalam medium berkitin, manakala *nag1* dan *ech1* didapati terekspres dengan tinggi dalam medium yang mengandungi kitin krustasea atau kitin dinding sel kulat. Ini mencadangkan bahawa kesemua kitinase yang hadir di dalam *T. virens* mempunyai peranan yang berbeza dan menjadikan kitin daripada sumber berbeza sebagai sasaran. Hasil kajian ini juga mencadangkan Ech1 dan Nag1 merupakan dua enzim penting yang diperlukan untuk mencurai kitin daripada krustasea.

JADUAL 2. Gen-gen *T. virens* UKM1 yang terekspres melebihi dua gandaan di dalam medium aruhan kitin pada hari kelima pertumbuhan

Identiti klon cDNA	Fungsi putatif	Gandaan pengekspresan*	Nombor akses EST GenBank
TvC201F11	Protein membran	19.60	EE674389
TvC203B04	Protein hipotetik	15.73	EE674455
TvC202A06	Kitinase (Ech1)	9.68	EE296723
TvGM01F11	Glukosamina-6-fosfat deaminase (NagB)	6.58	EE594986
TvC2Ex1B02	Kitinase kelas III	6.27	EE674543
TvK02G10	Protein Qid74	6.04	EE674235
TvC1Ex1C03	Protein hipotetik	5.89	EE674580
TvGM01D04	Kitobiase (Nag1)	5.00	EE674251
TvK01E08	Tioredoxin I	4.86	EE572270
TvC1Ex1C11	Glutaminase (GtaA)	4.83	EE674581
TvC2Ex1A05	Tiada padanan	4.62	EE674582
TvC1Ex2B04	Protein hipotetik	4.60	EE674583
TvC1Ex3E05	Subunit kompleks pengaruh anafasa	4.55	EE674584
TvC103A09	Protein hipotetik	4.40	EE674586
TvC1Ex1F06	Protein hipotetik	4.20	EE674587
TvC1Ex2H06	Protease serina	4.19	EE674588
TvC203C04	Hidrofobin I	4.13	EE674589
TvC203B01	Protein tidak diketahui fungsi	3.87	EE674590
TvGM02E05	Protein <i>Translationally Controlled Tumor-Associated</i>	3.86	EE674248
TvC1Ex1A04	Protein hipotetik	3.86	EE674548
TvC103A01	Protein pencurai ubiquitin	3.50	EE674591
TvC2Ex1E08	Tiada padanan	3.47	EE674592
TvC2Ex3G10	Protein jangkaan	3.26	EE674554
TvC1Ex3A05	Protein kepatogenan	3.15	EE674593
TvC103D10	Protein hipotetik	3.10	EE674594
TvC103E01	Protein hipotetik	3.10	EE674595
TvGMEx1C08	Protein hipotetik	3.07	EE674252
TvGMEx1B09	Protein hipotetik	3.04	EE674253
TvC203E03	Tiada padanan	3.03	EE674557
TvC101G11	Oksidoreduktase	3.00	EE674597
TvC2Ex3E12	Protein hipotetik	2.90	EE674598
TvC2Ex1B03	Protein hipotetik	2.83	EE674599
TvGM03A04	Subunit kompleks snare	2.72	EE674254
TvGMEx2B09	Protein hipotetik	2.71	EE674255
TvC1Ex3D05	Protein hipotetik	2.70	EE674600
TvGMEx2A05	D-arabinitol dehidrogenase	2.60	EE674256
TvC202F10	Pengangkut glukosa	2.47	EE296762
TvC1Ex2H05	Tiada padanan	2.42	EE674601
TvC2Ex3B12	Protein jangkaan	2.42	EE674559
TvGMEx2H05	Protein hipotetik	2.37	EE674258
TvC101F05	Protein hipotetik	2.35	EE674602
TvC2Ex1H10	Protein hipotetik	2.34	EE674603
TvC1Ex3H04	Protein hipotetik	2.28	EE674378
TvC103C01	Peptida menyerupai Pol	2.25	EE674604
TvC1Ex2D05	Protein hipotetik	2.24	EE674605
TvC1Ex3E11	P450 monooksigenase	2.22	EE674560
TvGM02B12	Protein hipotetik	2.15	EE595019
TvGM02G01	Protein hipotetik	2.15	EE595059
TvC1Ex2D08	Protein hipotetik	2.14	EE674606
TvC202H04	Protein biosintesis pigmen konidia	2.14	EE674225
TvC101G06	Alfa-aminoadipate reduktase	2.11	EE674226
TvC2Ex3C01	Protein hipotetik	2.10	EE674356
TvKEx1H02	Faktor permulaan translasi eukariot	2.10	EE674246
TvC202H02	Protein hipotetik	2.10	EE674228
TvC1Ex2F10	Protein jangkaan	2.09	EE674229
TvK01C06	Tiada padanan	2.06	EE674257
TvC201E03	Protein jangkaan	2.06	EE674230
TvC1Ex3F04	Protein hipotetik	2.05	EE674578
TvKEx1F08	Protein hipotetik	2.04	EE674268
TvC2Ex1G03	Protein penindas glukosa	2.04	EE674231
TvC1Ex1D03	Protein hipotetik	2.00	EE674546

\*Perbezaan pengekspresan adalah signifikan dengan nilai  $p \leq 0.05$  yang ditentukan melalui analisis *t-test*

Selain itu, penjujukan yang dilakukan terhadap klon yang belum dijujuk telah mengenal pasti satu klon mengekod kitinase daripada kelas III yang belum dicirikan sebelum ini (nombor klon: TvC2Ex1B02). Gen ini didapati mengekod kitinase *T. virens* yang belum dicirikan dan berdasarkan data pengekspresannya (terekspres 3.25 dan 6.27 kali ganda masing-masing bagi hari ketiga dan kelima) (Jadual 1 dan 2), produk gen ini dijangka memainkan peranan yang penting dalam membantu proses pencuraian kitin krustasea. Jujukan lengkap cDNA mengekod protein ini berjaya diperolehi melalui penjujukan klon cDNA TvC2Ex1B02 manakala jujukan lengkap gen telah diperolehi dengan melakukan PCR menggunakan DNA genom *T. virens* UKM1 sebagai templat. Melalui hasil pepadanan BLASTX, jujukan asid amino protein ini menunjukkan identiti sebanyak 60.7% dan 64.9% masing-masing dengan endokitinase Cht1 dan Cht2 daripada *T. virens* (Rajah 2). Oleh kerana ia menunjukkan padanan yang tinggi dengan Cht1 dan Cht2, maka protein ini dinamakan sebagai Cht3 *T. virens*. Jujukan nukleotida dan protein bagi gen *cht3* telah didaftarkan di pangkalan data GenBank, NCBI masing-masing dengan nombor aksesinya FJ237528 dan ACI96032.1. Analisis domain menunjukkan kehadiran tiga domain utama pada protein Cht3 ini: domain katalisis kitinase, domain glikosil hidrolase keluarga 18 (GH 18) dan domain pengikat kitin (Rajah 3). Domain katalisis kitinase dan domain GH 18 merupakan domain yang sama dan kedua-dua domain ini berkongsi tapak pengenalan dan

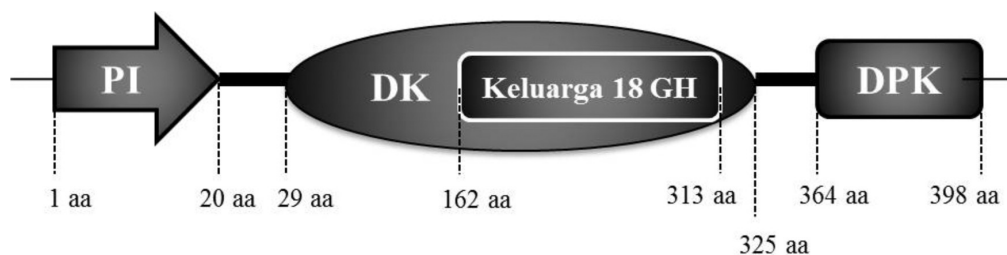
tapak aktif yang sama. Tapak aktif ini penting bagi aktiviti katalisis kitinase daripada kumpulan GH 18 (Karlsson & Stenlid 2008). Sementara itu, domain pengikat kitin merupakan domain yang membantu pengikatan kitinase kepada molekul kitin (Li 2006). Kehadiran domain ini pada Cht3 mencadangkan enzim ini dapat mengikat kitin semasa proses pencuraian dan pengikatan tersebut dijangka membantu meningkatkan kadar hidrolisis molekul kitin. Selain daripada itu, jujukan peptida isyarat bersaiz 20 asid amino juga telah dikenal pasti hadir pada Cht3. Ini mencadangkan protein ini merupakan protein rembesan dan pemerhatian ini berpadanan dengan fungsi enzim yang terlibat dalam pencuraian kitin yang hadir dalam persekitaran.

Selain daripada gen kitinolitik, terdapat juga gen mengekod protein bukan kitinase yang turut terekspres dengan tinggi pada kedua-dua hari pertumbuhan dan berkemungkinan terlibat secara langsung dalam proses pencuraian kitin krustasea. Gen mengekod hidrofobin kelas I (identiti klon: TvC1Ex1B07; nombor aksesinya EE674323) merupakan antara gen yang terekspres dengan tinggi pada hari ketiga (gandaan pengekspresan: 19.23) dan hari kelima (gandaan pengekspresan: 4.13). Hidrofobin merupakan sejenis protein kecil yang bersaiz 100 asid amino dan dicirikan oleh lapan residu sistina dan mempunyai bahagian hidrofilik dan hidrofobik yang terpulihara. Ia merupakan protein yang aktif pada bahagian permukaan dan berkebolehan untuk bergumpal sesama sendiri pada

T_virens_cht3	1	MVRSLAYVGA--LLAALPSARAGFNASSSTONIAVYWGQNSANQANSQORLSSTYCANADI
Tv-cht2	1	M-PSLTALAS--LLALVPSALAGWNANSKONIAVYWGQNSANSQSTQORLSFYCNDA-NI
Tv-cht1	1	M-PSLSFTAAALGLLSLLPAAQAGWNQNSNNNIIVYWGQNSGSV--GQNRLSYYCQNAIDV
T_virens_cht3	58	DIIPITGFMNGISPVITNFANAGNCTAFPDNANALDCPOIEEDIITCORTYGKTIILSLG
Tv-cht2	57	NVIDIAFLNGITFPMTNFANAGDRCTPESDNPWLLSCPEIEADIKTCQAN-GKTIILSLG
Tv-cht1	58	DVINISFMVGITNINLNLANVGNCTSFPOAPNLLNCPOVAADIVECOQTYGKTIIMSLF
T_virens_cht3	118	GGYSQGGFSSASAATSAAQTVMNMFQVNPNSTVDRPFGSAVVDGVDGDFESGV--NNLA
Tv-cht2	116	GDSYIQGGWSSASAAQSAANQVWAMFGPVQSGSTVHRPFGSAVVDGDFDFEATT--NNLA
Tv-cht1	118	GSTYSESQGFSSSAAVSAAQETWAMVGPVQSGNSTERPFGNAVVDGDFDPTEDPTENNME
T_virens_cht3	177	TFATELRSLMDASASSANRKFYLSAAPQCVYPDYADNPALNGVVSDFDITIQYNNNGCGV
Tv-cht2	175	AFGTQLKSRTNAACG---KKYFSAAPQCFPPDAAVGALIN-AVPMDWIQIQFYNNPCGV
Tv-cht1	178	PFAAELKTLMNANTS---KKFYLSAAPQCPYPDVSQSFNLGQVAFDWNVQFYNNNGCGV
T_virens_cht3	237	SSYVPGATTQWNYNFDVDWNWAHTVSKNPVVKILLGIAANTGAAS--GYVSGTQLSAVIS
Tv-cht2	231	SGFTPGTSTQNNYNYQTWENWAKT-SNPNVKLLVGIAPGPTAGR--GYVSGSQTLSVFC
Tv-cht1	235	SHY-----PTDENWATWDNWAHTVSAKNKAKVLLGT PANVGGANAGSEPTDSQLSGLIN
T_virens_cht3	295	FTKQYSSFAGIMMWDMSQLYENSGFLDQVVSDLAAPGSSPP-----ATTSTGGSKPTST
Tv-cht2	288	YSKQFSTFAGAMMWDMSQLFQNTGFEAQVNNAL-----
Tv-cht1	289	LAKGSSSFQGVMLWDMAQLFENSTGYLAKTVADLGGSSPPPPPPSTTLAIVTRTSTAST
T_virens_cht3	349	SGGSIGPTGGGGGIVPQWGQCGGEGYTGPTQCCSPYKCVVSSTWWASCO
Tv-cht2	321	-----K
Tv-cht1	349	GPTSSEFSGGNGGSVPQWGQCGGNGYTGPTQCCAPFKCVVESSEWWSSCO

RAJAH 2. Analisis penjajaran asid amino antara tiga endokitinase *T. virens* iaitu *Cht1* (Tv-Cht1), *Cht2* (Tv-Cht2) dan *Cht3* (*T. virens* Cht3). Kotak hitam menggambarkan asid amino yang sama identiti, kotak kelabu menunjukkan asid amino berbeza dalam kumpulan yang sama dan kotak putih menunjukkan asid amino berbeza daripada kumpulan yang berlainan. Tanda (-) menunjukkan jurang di dalam penjajaran disebabkan perbandingan jumlah asid amino yang tidak setara





RAJAH 3. Kedudukan domain dan peptida isyarat yang hadir pada *Cht3*. Singkatan yang digunakan: aa (asid amino), PI (peptida isyarat), DK (domain kitinase), GH (domain glikosil hidrolase), DPK (domain pengikat kitin)

permukaan hidrofilik-hidrofobik. Dalam kulat *Trichoderma harzianum*, gen mengekod hidrofobin didapati terekspres dengan tinggi di dalam medium yang mengandungi kitin (Lora et al. 1995). Berdasarkan pemerhatian, protein ini mungkin penting bagi membantu enzim kulat mengikat kitin yang bersifat hidrofobik dan memudahkan pencuraian kitin oleh enzim yang dirembes oleh *T. virens*.

Selain itu, gen mengekod protease serina (identiti klon: TvC1Ex2H06; nombor akses: EE674588) merupakan satu lagi protein yang terekspres dengan tinggi pada hari ketiga (gandaan pengekpresan: 2.53) dan kelima (gandaan pengekpresan: 4.13). Protease serina merupakan enzim pencurai protein dan kajian oleh Wang et al. (2005) ke atas *Aspergillus fumigatus* mendapati kulat tersebut merembes protease serina bersama dengan kitinase apabila kulat ditumbuhkan di dalam medium yang mengandungi serbuk cengkerang krustasea. Dalam kajian tersebut, hanya aktiviti protease dan kitinase dikesan di dalam supernatan kultur *A. fumigatus* manakala aktiviti enzim hidrolase lain seperti selulase, xilanase dan lipase tidak dikesan. Aras pengekspresan yang tinggi bagi gen mengekod protease tersebut dalam *T. virens* semasa pencuraian kitin krustasea mencadangkan bahawa enzim tersebut diperlukan bagi membantu kitinase mencurai kitin krustasea. Berkemungkinan enzim tersebut dihasilkan bagi membantu pencuraian protein yang masih hadir pada cengkerang krustasea yang digunakan.

Selain daripada protein yang diketahui fungsi, terdapat beberapa protein hipotetik yang terekspres dengan tinggi pada kedua-dua hari ketiga dan kelima apabila pertumbuhan *T. virens* UKM1 diaruh oleh kitin krustasea. Ini termasuklah klon TvC203B04 (nombor akses: EE674455), TvC1Ex3H04 (nombor akses: EE674378), TvC2Ex3C01 (nombor akses: EE674356), TvC1Ex1D03 (nombor akses: EE674546), TvC1Ex1A04 (nombor akses: EE674548) dan TvC1Ex3F04 (nombor akses: EE674578). Analisis jangkakan domain dilakukan terhadap kesemua protein hipotetik tersebut namun kesemuanya didapati tidak mempunyai padanan yang signifikan dengan domain yang telah didaftarkan di dalam pangkalan data. Ini mungkin disebabkan jujukan ESTs yang terlibat merupakan jujukan pendek dan bukan jujukan penuh. Oleh itu, untuk mendapatkan jujukan yang berpadanan dengan domain tertentu yang telah dicirikan adalah amat sukar.

## KESIMPULAN

Melalui kaedah ESTs dan mikroatur DNA, beberapa gen kitinase *T. virens* UKM1 yang terekspres dengan tinggi dengan kehadiran kitin krustasea dalam medium pertumbuhan telah berjaya dikenal pasti. Gen-gen tersebut termasuklah *ech1* dan *cht3* (endokitinase), *nag1* (eksokitinase) dan *nagB* (glukosamin 6-fosfat deaminase). Selain daripada itu, gen-gen lain yang turut terekspres dengan tinggi termasuklah protein hidrofobin, protease dan beberapa protein hipotetik yang dipercayai terlibat secara langsung atau tidak langsung dalam pencuraian kitin krustasea oleh *T. virens*.

## PENGHARGAAN

Penyelidikan ini telah dibiayai oleh geran IRPA 09-02-02-006-BTK/ER/31 daripada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi, Malaysia dan geran OUP-2012-163 daripada Universiti Kebangsaan Malaysia. Terima kasih diucapkan kepada Puan Irni Suhayu Sapian (Malaysia Genome Institute) untuk bantuan penitikan slaid mikroatur DNA.

## RUJUKAN

- Al-Rashed, S.A.A., Bakar, F.D.A., Said, M., Hassan, O., Rabu, A., Illias, R.M. & Murad, A.M.A. 2010. Expression and characterization of the recombinant *Trichoderma virens* endochitinase Cht2. *African Journal of Microbiology Research* 4: 1758-1767.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Berger, J., Hautaniemi, S., Jarvinen, A., Edgren, H., Mitra, S. & Astola, J. 2004. Optimized LOWESS normalization parameter selection for DNA microarray data. *BMC Bioinformatics* 5: 194.
- George, R.A. 2001. StackPACK clustering system. *Briefings in Bioinformatics* 2: 394-397.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56.
- Karlsson, M. & Stenlid, J. 2008. Comparative evolutionary histories of the fungal chitinase gene family reveal non-random size expansions and contractions due to adaptive natural selection. *Evolution Bioinformatics* 4: 47-60.

- Kendrick, A. & Ratledge, C. 1992. Desaturation of polyunsaturated fatty acids in *Mucor circinelloides* and the involvement of a novel membrane-bound malic enzyme. *European Journal of Biochemistry* 209: 667-673.
- Khoo, C.K., Mohd-Adnan, A., Kua, B.C. & Murad, A.M.A. 2009. Fabrikasi slaid mikroatur cDNA *Lates calcarifer*. *Sains Malaysiana* 38: 609-617.
- Kim, D.J., Baek, J.M., Marcel, D., Uribe, P., Kenerley, C. & Cook, D. 2002. Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. *Current Genetics* 40: 374-384.
- Kumar, M.N.V.R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* 46: 1-27.
- Kurita, K. 2006. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology* 8: 203-226.
- Li, D.C. 2006. Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345-360.
- Lora, J.M., Pintor-Toro, J.A., Benítez, T. & Romero, L.C. 1995. Qid3 protein links plant bimodular proteins with fungal hydrophobins. *Molecular Microbiology* 18: 380-382.
- Oh, S.S.L., Bakar, F.D.A., Adnan, A.M., Mahadi, N.M., Hassan, O. & Murad, A.M.A. 2009. Isolation and characterization of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene of *Trichoderma virens* UKM1. *Biotechnology* 8: 194-203.
- Ramli, A.N.M., Mahadi, N.M., Rabu, A., Murad, A.M.A., Bakar, F.D.A. & Illias, R.M. 2011. Molecular cloning, expression and biochemical characterisation of a cold-adapted novel recombinant chitinase from *Glaciozyma antarctica* PI12. *Microbial Cell Factories* 10: 94.
- Rattanakit, N., Plikomol, A., Yano, S., Wakayama, M. & Tachiki, T. 2002. Utilization of shrimp shellfish waste as a substrate for solid-state cultivation of *Aspergillus* sp. S1-13: Evaluation of a culture based on chitinase formation which is necessary for chitin-assimilation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 93: 550-556.
- Suraini, A.Z., Teoh, L.S., Noorjahan, A., Neelam, S. & Kamarulzaman, K. 2008. Microbial degradation of chitin materials by *Trichoderma virens* UKM1. *Journal of Biological Science* 8: 52-59.
- Tanaka, T., Takahashi, F., Fukui, T., Fujiwara, S., Atomi, H. & Imanaka, T. 2005. Characterization of a novel glucosamine-6-phosphate deaminase from a hyperthermophilic archaeon. *Journal of Bacteriology* 187: 7038-7044.
- Tharanathan, R.N. & Kittur, F.S. 2003. Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43: 61-87.
- Uria, A.R., Chasanah, E. & Fawzya, Y.N. 2005. Optimization of *Bacillus* sp. k29-14 chitinase production using marine crustacean waste. *Journal of Coastal Development* 8: 123-130.
- Wang, S.L., Chen, Y.H., Wang, C.L., Yen, Y.H. & Chern, M.K. 2005. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 660-665.
- Abdul Munir Abdul Murad\*, Rafidah Badrun, Sakina Shahabudin, Shazilah Kamaruddin, Madihah Ahmad Zairun, Farahayu Khairuddin, Zamri Zainal & Farah Diba Abu Bakar  
Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi  
Fakulti Sains dan Teknologi  
Universiti Kebangsaan Malaysia  
43600 Bangi, Selangor D.E.  
Malaysia
- Nor Muhammad Mahadi  
Malaysia Genome Institute  
Jalan Bangi Lama  
43000 Kajang, Selangor  
Malaysia
- Rosli Md. Illias  
Jabatan Kejuruteraan Bioproses  
Fakulti Kejuruteraan Kimia dan Kejuruteraan Sumber Asli,  
Universiti Teknologi Malaysia  
81310 Skudai, Johor  
Malaysia

\*Pengarang untuk surat-menyurat; e-mail: munir@ukm.my

Diserahkan: 14 Mei 2012

Diterima: 13 September 2012