

การคัดเลือกและโคลนยีนโคติเนสที่สามารถย่อยโคตินที่มีความเป็นระเบียบ



นางสาวสุภิดา ทับทิมเทพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-170-591-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20281018

SCREENING AND CLONING OF CRYSTALLINE CHITIN
DEGRADING CHITINASE GENE

Miss. Supida Tubtimthep

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program in Biotechnology

Faculty of Science

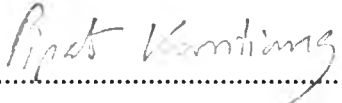
Chulalongkorn University

Academic Year 2001

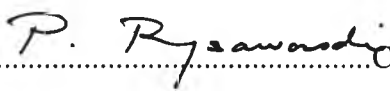
ISBN 974-170-591-3

Thesis Title Screening and Cloning of Crystalline Chitin Degrading Chitinase Gene
By Miss Supida Tubtimthep
Field of Study Biotechnology
Thesis Advisor Rath Pichyangkura, Ph.D.


Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree


..... Deputy Dean for Administrative Affairs
Acting Dean, Faculty of Science

(Associate Professor Pipat Karntiang, Ph.D.)


..... Chairman

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)


..... Thesis Advisor

(Rath Pichyangkura, Ph.D.)


..... Member

(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)


..... Member

(Assitant Professor Chanpen Chanjao, Ph.D.)

สุภิดา ทับทิมเทพย์: การคัดเลือกและโคลนยีนไคติเนสที่สามารถย่อยไคติตินที่มีความเป็นระเบียบ

(SCREENING AND CLONING OF CRYSTALLINE CHITIN DEGRADING CHITINASE GENE)

อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. รัฐ พิชญางกูร, 83 หน้า, ISBN 974-170-591-3

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสคัดเลือกมาจากตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทยคือ อำเภอมหาชัย จังหวัดสมุทรสาคร อำเภอพญา จังหวัดชลบุรี เกาะพีพี จังหวัดกระบี่ และ อำเภอจุกกะเเมอ จังหวัดฉะเชิงเทรา นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้นี้มาเลี้ยงและผลิตไคติเนสโดยวัดการทำงานของไคติเนสกับสับสเตรตไคติติน 2 ชนิด คือ powdered chitin และ colloidal chitin โดยวิธี colorimetric method แล้วคำนวณค่าการทำงานของไคติเนสเป็นเปอร์เซ็นต์สัดส่วนแอกติวิตี้ต่อ powdered chitin กับ แอกติวิตี้ต่อ colloidal chitin ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ แบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อย powdered chitin ได้ กลุ่มที่ 2 ถึง กลุ่มที่ 5 คือแบคทีเรียที่มีสัดส่วนของแอกติวิตี้ต่อ powdered chitin กับ colloidal chitin ตั้งแต่ 10% จนถึงมากกว่า 40% ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ *Bacillus circulans* PP8 ซึ่งเป็นสมาชิกของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 5 ซึ่งมีค่าสัดส่วนแอกติวิตี้มากกว่า 40% *B. circulans* PP8 ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไคติตินที่มีระเบียบ โดยสามารถย่อยได้ทั้ง powdered chitin, colloidal chitin, และ chitosan (100% deacetylated) เมื่อเลี้ยงในอาหาร colloidal chitin minimum medium พบไคติเนสแอกติวิตี้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 (ChiA) เมื่อใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรต และชั่วโมงที่ 24 (ChiB) เมื่อใช้ powdered chitin เป็นสับสเตรต จากนั้นแอกติวิตี้ของไคติเนสจะค่อยๆ ลดลงและหายไปหลังจากชั่วโมงที่ 48 พบโคโคซานเนสแอกติวิตี้หลังจากชั่วโมงที่ 60 และแอกติวิตี้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 84 สภาวะความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ChiA, ChiB และ โคโคซานเนส คือ 7.0/50°C, 6.0/30°C และ 7.0/60°C ตามลำดับ โครโมโซมอลติเอ็นเอของ *B. circulans* PP8 ซึ่งตัดด้วย *Pst*I ขนาด 2-9 กิโลเบส ถูกโคลนเข้าสู่ *E. coli* สายพันธ์ DH5 α ด้วยวิธี Shot gun โดยมี pBluescript SK⁺ เป็นดีเอ็นเอพาหะ หลังจากคัดเลือก transformants เป็นจำนวน 1,800 โคลนนี้ พบ 2 โคลนที่สามารถสร้างวงโคโลนีเมื่อเลี้ยงในอาหาร colloidal chitin

หลักสูตร.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....

ปีการศึกษา.....2544.....

ลายมือชื่อนิสิต..... สุภิดา ทับทิมเทพย์.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4272493923: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: CHITINASE/CHITIN/*Bacillus circulans* /CLONING

SUPIDA TUBTIMTHERP: SCREENING AND CLONING OF
CRYSTALLINE CHITIN DEGRADING CHITINASE GENE. THESIS

ADVISOR: RATH PICHYANGKURA, Ph D., 83 pp. ISBN 974-170-591-3

Soil samples from Chachengsao, Mahachai, Pattaya, and PP Islands of Thailand were selected for chitinase producing bacteria. Chitinase activities were assayed by using colorimetric method with two substrates, powdered chitin (PC) and colloidal chitin (CC). After calculating the percentage ratio of PC/CC, where PC is chitinase activity when used powdered chitin as substrate and CC is chitinase activity when used colloidal chitin as substrate, chitinase-producing bacteria can be divided into five groups. Group 1 is bacterium, which cannot degrade powdered chitin. Group 2 to group 5 have percentage ratio of PC/CC from less than 10% to over 40%. *Bacillus circulans* PP8, one of member in group 5, which has percentage ratio of PC/CC over 40% was selected for study. *Bacillus circulans* PP8 was isolated from PP Islands and produced crystalline chitin degrading enzymes that can digest powdered chitin, colloidal chitin and chitosan (100% deacetylation). During growth in colloidal chitin minimum medium, the highest activity, ChiA, was detected at 12 hours when colloidal chitin was used as substrate and 24 hours, ChiB, when powdered chitin was used as substrate. Chitinase activity slowly dropped and vanished after 48 hours. Chitosanase activity was then detected at 60 hours, peaking at 84 hours. The optimum pH and temperature of ChiA, ChiB, and chitosanase are 7/50°C, 6/30°C, and 7/60°C, respectively. Shot gun cloning experiment was performed by partially digesting genomic DNA of *B. circulans* PP8 with PstI. Fragments of 2-9 kb in size were ligated to pBluescript/SK⁻ and then transformed to *E.coli* DH5 α cells. After screening 1,800 transformants, 2 positive clones with chitinase activity on colloidal chitin agar plate were found, Clone 847 and 1691.

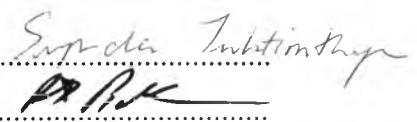
Program....Biotechnology.....

Field of study..Biotechnology.....

Academic Year.....2001.....

Student's signature.....

Advisor's signature.....



ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisors, Dr. Rath Pichyangkura, for his valuable advise, excellent instruction, guidance encouragement and support throughout this thesis. My gratitude is also extended to Dr. Piamsook Pngsawasdi, Dr. Siriporn Sittipraneed, and Dr. Chanpen Chanchao for serving as thesis committee. I wish to thank Dr. Sei-ichi-Aiba for powdered chitin used in this work. I would like to special thanks to Ms. Kuakarun Krusong and Ms. Natwadee Poomipak for their best friendship and sincere thanks to Mr. Surose Oumyam, Ms. Sunadda Yomyat, Ms. Wathanyuta Phuyothin, Ms. Nopparat Vanishsooksombat, and Mr. Kitipong Pavarangura for thier help and kindness.

Sincere thanks are extended to all staff members and friends of the Biochemistry Department, Microbiology Department and Biotechnology Program for their assistance and friendship.

Finally, the greatest indebtedness is expressed to my parents for their unlimited love , understanding, and encouragement.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF TABLES.....	xii
ABBREVIATION.....	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
Chitin.....	1
Chitosan.....	6
Chitin and chitosan application.....	7
Chitinase.....	9
Bacterial chitinase.....	15
Crystalline chitin degrading chitinase....	18
Chitinase mechanism.....	19
Chitosanase.....	21
Chitosanase mechanism.....	26
Chitin deacetylase.....	27
Mode of action of chitin deacetylase.....	28
Chitin hydrolysis.....	29
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	32

Equipments.....	32
Chemicals.....	32
Enzymes and Restriction enzymes	34
Media and media preparation.....	34
Bacterial strains.....	35
Bacterial cultivation.....	36
Screening of crystalline chitin degrading bacteria	36
Enzyme assay.....	37
Enzymes production of <i>Bacillus circulans</i> PP8	38
Characterization of crude enzyme.....	38
Estimating of molecular weight of chitinase	39
<i>B. circulans</i> PP8 chromosomal extraction	39
DNA digestion by restriction enzymes.....	39
Preparation of plasmid by rapid alkaline extraction	40
Competent cells preparation.....	40
DNA cloning.....	40
Transformation.....	40
Screening of transformant cells.....	41
Determination of recombinant clones.....	41
Detection of chitinase activity of recombinant clones	
by SDS-PAGE.....	41
Detection of chitinase activity of recombinant clones	
by colorimetric method	42
CHAPTER III RESULTS.....	43
Screening of crystalline chitin drgrading bacteria	43

Characterization of crystalline chitin degrading enzyme of <i>Bacillus circulans</i> PP8.....	46
Cloning.....	53
Determination of recombinant plasmid.....	53
Detection of chitinase gene by SDS-PAGE....	53
Detection chitinase activity by colorimetric method	53
CHAPTER IV DISCUSSION.....	60
Screening of crystalline chitin degrading bacteria	60
Enzyme production of <i>B. circulans</i> PP8.....	61
Characterization of crude enzyme.....	62
Detection of transformants containg chitinase gene	66
Estimate molecular weight of chitinase from recombinant clones.....	66
Detection of chitinase activity from recombinant clones by colorimetric method.....	67
CHAPTER V CONCLUSION.....	68
REFERENCES.....	71
APPENDICES.....	76
APPENDIX A.....	77
APPENDIX B.....	79
APPENDIX C.....	82
APPENDIX D.....	83

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Chitin is a β -(1→4)-linked homopolymer of N-acetyl-D-glucosamine.....	2
2	Chitin synthesis pathway from unicellular organisms.....	4
3	Crystal structure of α -chitin and β -chitin.....	5
4	simple flow chat of kpreparation of chitin, chitosan and their oligomers.....	7
5	Chitosan structure.....	8
6	Conserve amino acid of family 18 chitinase.....	12
7	Crystal structure of chitinase from hevamine.....	13
8	Crystal structure of chitinase from <i>Serratia marcescens</i>	14
9	Conserve aminoacid of family 19 chitinase.....	16
10	Inversion mechanism of family 19 chitinase.....	20
11	Hypothetical binding of chitin polymer to barley chitinase.....	22
12	Retaining mechanism of chitinase family 18.....	23
13	Crystal structure of chitosanase from <i>Streptomyces</i> sp. N174 and <i>Bacillus circulans</i> MH-K1	25
14	Enzyme for hydrolyse of chitina and chitosan.....	31
15	%PC/CC of chitinase producing bacteria from group 2 to group 5	44
16	Average %PC/CC of members in group 5.....	45
17	<i>Bacillus circulans</i> PP8 on colloidal chitin minimum medium plates.....	47

18	Profile of enzyme production from <i>B. circulans</i> PP8 in colloidal chitin minimum medium.....	48
19	Profile of enzyme production from <i>B. circulans</i> PP8 in powdered chitin minimum medium.....	49
20	Effect of pH on enzyme production.....	51
21	Effect of temperature on enzyme production.....	52
22	SDS-PAGE of chitinase activity from <i>B. circulans</i> PP8.....	54
23	Clone 847 on colloidal chitin medium.....	55
24	Determination of insert fragments.....	56
25	SDS-PAGE of chitinase activity from clone 847.....	57

LIST OF TABLES

Tables		Page
1	Chitin content in difference organism.....	2
2	Current practical uses of chitin, chitosan and their derivatives	8
3	Molecular cloning of chitinase gene.....	17
4	Chitinase activities with colloidal chitin and powdered chitin Of recombinant clones.....	59
5	Comparison of the characteristics of chitinase from several microorganisms.....	64
6	Comparison of the characteristics of chitosanase from several microorganisms.....	65
7	Preparation of McIlvain buffer	82

ABBREVIATIONS

A	Absorbance
°C	Degree Celcius
CC	Colloidal chitin
DNA	Deoxyribonucleic acid
GlcNAc	N-acetylglucosamine
GlcN	Glucosamine
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	litre
M	Molar
µg	Microgram
µl	Microlitre
mg	Miligram
ng	Nanogram
PC	Powdered chitin
rpm	Revolution per minute
%T	% Transmittance