การคัดเลือกและโคลนยีนไคติเนสที่สามารถย่อยไคตินที่มีความเป็นระเบียบ

นางสาวสุภิดา ทับทิมเทพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-170-591-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20781018

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: การคัดเลือกและโคลนยีนไคติเนสที่สามารถย่อยไคตินที่มีความเป็นระเบียบ
(SCREENING AND CLONING OF CRYSTALLINE CHITIN DEGRADING CHITINASE GENE)
อาจารย์ที่ปรึกษา: ดร. รัฐ พิชญางกูร, 83 หน้า, ISBN 974-170-591-3

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสคัดเลือกมาจากตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทยคือ อำเภอมหาชัย จังหวัดสมุทรสาคร อำเภอพัทยา จังหวัดชลบุรี เกาะพีพี จังหวัดกระบี่ และ อำเภอจุกกะเฌอ จังหวัดฉะเชิงเทรา นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้นี้มาเลี้ยงและผลิตไคติเนสโดยวัดการทำงานของไคติเนสกับสับสเตรตไคติน 2 ชนิด คือ powdered chitin และ colloidal chitin โดยวิธี colorimetric method แล้วคำนวณค่าการทำงานของไคติเนสเป็นเปอร์เซนต์สัดส่วนแอคติวิตี้ต่อ powdered chitin กับ แอคติวิตี้ต่อ colloidal chitin ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 คือ แบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อย powdered chitin ได้ กลุ่มที่ 2 ถึง กลุ่มที่ 5 คือแบคทีเรียที่มีสัดส่วนของแอคติวิตี้ต่อ powdered chitin กับ colloidal chitin ตั้งแต่ 10% จนถึงมากกว่า 40% ในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ *Bacillus circulans* PP8 ซึ่งเป็นสมาชิกของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 5 ซึ่งมีค่าสัดส่วนแอคติวิตี้มากกว่า 40 % *B. circulans* PP8 ผลิตเอนไซม์ที่ย่อยไคทินที่มีระเบียบ โดยสามารถย่อยได้ทั้ง powdered chitin, colloidal chitin, และ chitosan (100 % deacetylated) เมื่อเลี้ยงในอาหาร colloidal chitin minimum medium พบไคทิเนสแอคติวิตี้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 (ChiA) เมื่อใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรต และชั่วโมงที่ 24 (ChiB) เมื่อใช้ powdered chitin เป็นสับสเตรต จากนั้นแอคติวิตี้ของไคติเนสจะค่อยๆ ลดลงและหายไปหลังจากชั่วโมงที่ 48 พบไคโตซานเนสแอคติวิตี้หลังจากชั่วโมงที่ 60 และแอคติวิตี้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 84 สภาวะความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ChiA, ChiB และ ไคโตซานเนส คือ 7.0/50°C, 6.0/30°C และ 7.0/60°C ตามลำดับ โครโมโซมอลดีเอ็นเอของ *B. circulans* PP8 ซึ่งตัดด้วย *PstI* ขนาด 2-9 กิโลเบส ถูกโคลนเข้าสู่ *E.coli* สายพันธ์ DH5α ด้วยวิธี Shot gun โดยมี pBluescript SK⁻ เป็นดีเอ็นเอพาหะ หลังจากคัดเลือก transformants เป็นจำนวน 1,800 โคโลนี พบ 2 โคโลนีที่สามารถสร้างวงใสรอบโคโลนีเมื่อเลี้ยงในอาหาร colloidal chitin

หลักสูตร.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....
ปีการศึกษา.....2544.....

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

4272493923: MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CHITINASE/CHITIN/*Bacillus circulans* /CLONING

SUPIDA TUBTIMTHEP: 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* DH5α 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 encoragement and support throughout this thesis. My gratitute is also extended to Dr. Piamsook Pngsawasdi, Dr. Siriporn Sittipraneed, and Dr. Chanpen Chanchao for serving as thesis commitee. 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 Departmant 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 *Bacillus circulans* PP8 38

Characterization of crude enzyme..... 38

Estimating of molecular weight of chitinase 39

B. circulans 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 *Bacillus circulans* 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 *B. circulans* 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 synthesi 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 *Serratia marcescens*	14
9	Conserve aminoacid of family 19 chitinase	16
10	Inversion mechanism of family 19 chitinase	20
11	Hypothentical binding of chitin polymer to barley chitinase	22
12	Retaining mechanism of chitinase family 18	23
13	Crystal structure of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 and *Bacillus circulans* 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	*Bacillus circulans* PP8 on colloidal chitin minimum medium plates	47

18 Profile of enzyme production from *B. circulans* PP8 in colloidal chitin minimum medium..... 48

19 Profile of enzyme production from *B. circulans* 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 *B. circulans* 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