ลักษณะสมบัติของไคทิเนสและการโคลนบางส่วนของยีนจาก *Microbacterium* sp. TU05

นางสาว จันทร์จรัส เสริมสาธนสวัสดิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISBN 974-17-0726-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATON OF CHITINASE AND PARTIAL GENE CLONING FROM

Microbacterium sp. TU05

Miss Janjaras Sermsatanaswadi

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-17-0726-6

Thesis Title	Characterization of chitinase and partial gene cloning from *Microbacterium* sp. TU05
By	Miss Janjaras Sermsatanaswadi
Field of study	Biochemistry
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.)

THESIS COMMITTEE

....Chairman
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

....Thesis Advisor
(Rath Pichyangkura, Ph.D.)

....Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

....Member
(Associate Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)

....Member
(Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จันทร์จรัส เสริมสาธนสวัสดิ์: ลักษณะสมบัติของไคทิเนสและการโคลนบางส่วนของยีนจาก *Microbacterium* sp. TU05 (CHARACTERIZATION OF CHITINASE AND PARTIAL GENE CLONING FROM *Microbacterium* sp. TU05) อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร.รัฐ พิชญางกูร, 98 หน้า. ISBN 974-17-0726-6.

แบคทีเรียสายพันธุ์ TU05 แยกได้จากดินในเขตปทุมวัน, กรุงเทพ, ประเทศไทย สามารถผลิตเอนไซม์ไคทิเนส (EC. 3.2.1.14) ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคทินได้ เมื่อทดสอบสมบัติการติดสี, สมบัติบางประการทางชีวเคมี และ ลำดับเบสของ 16S rRNA ยีน สามารถจัดแบคทีเรียนี้อยู่ในสายพันธุ์ *Microbacterium* sp. เมื่อนำ *Microbacterium* sp.TU05 มาเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งของไคทินต่างกันคือคอลลอยดัลไคทินและไคทินเกล็ด พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคอลลอยดัลไคทินพบแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดในวันที่สองและในไคทินเกล็ดพบแอคติวิตีสูงสุดในวันที่สิบ จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยคอลลอยดัลไคทินโดยวิธี HPLC พบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสองชนิด ได้แก่ *N*-acetylglucosamine และ *N,N'*-diacetylglucosamine คาดว่าในเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์สองชนิดคือไคทิเนสและไคโทไบเอส สภาวะความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หยาบเป็น 5.0, 7.0 และ 40°C ตามลำดับ เอนไซม์หยาบพบแอคติวิตีของเอกโซไคทิเนสเนื่องจากเอนไซม์หยาบสามารถย่อยคอลลอยดัลไคทินได้ดีที่สุด เมื่อนำเอนไซม์หยาบมาวิเคราะห์แยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และย้อมแอคติวิตีพบแถบโปรตีนที่มีแอคติวิตีอย่างน้อยสองแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 65 และ 30 กิโลดาลตัน

เมื่อนำเอนไซม์หยาบไปทำให้บริสุทธ์บางส่วนด้วยวิธี DEAE-cellulose column chromatography พบไคทิเนสแอคติวิตีสองพีค เมื่อนำมาวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าไคทิเนสพีคที่หนึ่งปรากฏแถบโปรตีนที่มีไคทิเนสแอคติวีตี 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุล 65 กิโลดาลตัน และในไคทิเนสพีคที่สองพบแถบโปรตีนที่มีไคทิเนสแอคติวิตี 2 แถบมีน้ำหนักโมเลกุล 55 และ 30 กิโลดาลตัน เมื่อนำไคทิเนสพีคที่หนึ่งมาทำการศึกษาสมบัติบางประการของไคทิเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าภาวะของการเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสมของไคทิเนสที่บริสุทธิ์บางส่วนเป็น 5.0 และ 40 °C เหมือนในเอนไซม์หยาบ แต่มีช่วงการทำงานที่แคบกว่า

จากการทำโคลนแบบ shotgun ของชิ้นโครโมโซมมอลดีเอ็นเอของ *Microbacterium sp.*TU05 ที่ตัดแบบไม่สมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I หลังจากทำการคัดเลือกโคโลนี 30,000 โคโลนี ไม่พบโคลนที่ให้วงใสบนอาหารแข็งที่มีคอลลอยดัลไคทิน จึงทำการวิเคราะห์ไคทิเนสยีนบางส่วนโดยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์สังเคราะห์จากลำดับเบสอนุรักษ์ของเอนไซม์ไคทิเนสกลุ่มที่ 18 ของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* พบผลิตภัณฑ์ขนาด 636 bp ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับไคทิเนสจาก *Arthrobacter* sp. 71%.

ภาควิชา.....................ชีวเคมี............	ลายมือชื่อนิสิต...........จันทร์จรัส...........................
สาขาวิชา....................ชีวเคมี............	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..............................
ปีการศึกษา.................2544.............	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.........-................

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4172245523: MAJOR BIOCHEM
KEY WORD: CHITINASE/BACTERIA/CHARACTERIZATION

JANJARAS SERMSATANASWADI: CHARACTERIZATION OF CHITINASE AND PARTIAL GENE CLONING FROM *Microbacterium* sp. TU05 THESIS ADVISOR: RATH PICHYANGKURA, Ph.D. 98 pp. ISBN 974-17-0726-6.

A bacterium TU05 was isolated from soil in Bangkok, Thailand. It can produce chitinase (EC. 3.2.1.14) that catalyzes the degradation of chitin. Gram-stain, biochemical characteristics, and sequence of 16S rRNA gene, identified this bacterium as *Microbacterium* sp.. *Microbacterium* sp. TU05 produced highest chitinase activity on the second day in CCMM and the tenth day in FCMM. Hydrolysis products analyzed by HPLC, crude enzyme showed two enzymatic activity, chitinase and chitobiase. The optimum pH and temperature were pH 5.0 and pH 7.0 and 40 °C, respectively. Substrate specificity of crude enzyme illustrated it was exochitinase, because it had the highest hydrolytic activity on colloidal chitin. After SDS-PAGE and activity staining, at least two bands of chitinase activity were found with molecular weight 65 and 30 kDa.

When partially purified by DEAE-cellulose column chromatography, two peaks of chitinase activity were found. After SDS-PAGE and activity staining of the partially purified chitinase peak1, one band has chitinase activity with molecular weight of 65 kDa. Partially purified chitinase peak2 has 2 bands of chitinase activity at 55 and 30 kDa. Partially purified chitinase peak1 was selected for characterization. The optimum pH and optimum temperature of partially purified chitinase peak1 were 5.0 and 40 °C.

Shotgun cloning technique was employed for chitinase gene cloning. After screening 30,000 transformants, no positive clones were found. Partial chitinase gene amplification of *Microbacterium* sp.TU05 by PCR amplification using primers designed from conserved amino acid sequence of *Bacillus* sp. family 18 chitinase gene was performed. The PCR products was 636 bp with 71% similarity to chitinase from *Arthrobacter* sp.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department..... Biochemistry	Student's signature..............................
Field of study...Biochemistry	Advisor's signature..............................
Academic year.......2001........	Co-advisor's signature........................

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to thank Dr. Rath Pichyangkura for being an excellent graduate advisor and mentor. I also thank him for his patience, understanding and encouragement through the years. Without his kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Associate Professor Dr. Piamsook Pongsawasdi, Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed, Associate Professor Dr. Anchalee Tassanakajon, and Assistant Professor Dr. Kanoktip Packdibamrung for serving as the members of my thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

I also wish to thank expressed to all staff members and students of the Biochemistry Department for their help in laboratory and discussion. I also thank them for their sincerity and friendships. Special thanks are also extended to Pee Nick, Pee Tum, Pee Oam, Pee Nu, Pee Lek, Pee Jang, Pee Su, Pee Cell, Ed, Ann, Kung, Lele, Ohm, Nee, Oui, Som, A, X, C, Ai, and Num for their kindness, will power and suggestions.

This work was partially supported by research grant from the Graduate school, Chulalongkorn University.

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGMENT	vi
CONTENT	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
ABBREVIATIONS	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
Chitin	1
Chitnase	9
Mechanism of chitinases	14
Chitinase assay	19
Viscosimetric assay of chitinase	19
Turbidimetric (nephelometric) method	20
Colorimetric method	20
Detection of chitinolytic activity in polyacrylamine gel electrophoresis (PAGE)	21
Application of chitinase	22
Chitinases in biocontrol of plant pathogenic fungi and insects.	22
Mosquito control	23
Chitinase as a target for biopesticides	23
Production of chitooligosaccharides	25
Plant chitinase	25
Bacterial chitinase	26
Microbacterium sp.	27
II MATERIALS AND METHOD	
2.1 Equipments	29
2.2 Chemicals	30
2.3 Enzymes and Restriction enzymes	31
2.4 Bacterial strain	32
2.4.1 Chitinase producing bacteria	32

2.4.2 Host cells 32

2.5 Identification of selected strain 33

2.5.1 Gram-stain and colonial morphology 33

2.5.2 Biochemical characterization 33

2.5.3 Identification by 16sRNA gene 33

2.6 Media preparation 34

2.6.1 Luria-Bertani (LB) medium 34

2.6.2 Colloidal chitin minimum medium (CCMM) and Flake chitin minimum medium (FCMM) 34

2.7 Cultivation of *Microbacterium* sp. TU05 and enzyme production 37

2.7.1 Starter inoculum 37

2.7.2 Enzyme production 37

2.8 Assay of chitinase activity 37

2.9 Protein Determination 38

2.10 Chitinase production of *Microbacterium* sp. TU05 38

2.11 Characterization of crude chitinase 39

2.11.1 Optimum pH 39

2.11.2 Optimum temperature 39

2.11.3 Substrate specificity 39

2.11.4 Estimation of chitinase molecular weight 39

2.11.5 Hydrolysis products of colloidal chitin 40

2.12 Partial purification by DEAE-column 41

2.12.1 Activate DEAE-cellulose 41

2.12.2 DEAE-cellulose chromatography 41

2.13 Characterization of partial purified chitinase 41

2.13.1 Optimum pH 41

2.13.2 Optimum temperature 42

2.13.3 Substrate specificity 42

2.14 Extraction of chromosomal DNA from *Microbacterium* sp. TU05 42

2.15 Preparation of plasmid DNA by rapid alkaline extraction 43

2.16 Agarose gel electrophoresis 44

2.17 DNA cloning 44

2.17.1 Partial digestion of chromosomal DNA 44

2.17.2 Plasmid preparation and dephosphorylated by CIAP 44

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.17.3 Ligation 45
2.17.4 Preparation of competent cells 45
2.17.5 Transformation 46
2.17.6 Detection of chitinase gene 46
2.17.7 Partial sequence of chitinase gene by PCR 47
III RESULTS
1. Screening and isolation of bacteria producing chitinase 50
2. Identification of selected strain 50
2.1 Gram-stain, colonial morphology, and biochemical tests 50
2.2 Identification by 16S rRNA gene 51
3. Chitinase production of *Microbacterium* sp. TU05 51
4. Characterization of crude chitinase 51
4.1 Effects of pH and temperature on the activity 51
4.2 Substrate specificity 60
4.3 Estimation molecular weight of chitinase 60
4.4 Hydrolysis products of colloidal chitin 60
5. Partial purification by DEAE-column 64
6. Characterization of partially purified chitinase 64
6.1 Estimation of molecular weight of partially purified chitinase 64
6.2 Optimum pH of partially purified chitinase 64
6.3 Optimum temperature of partially purified chitinase 68
6.4 Substrate specificity of partially purified chitinase 68
7. DNA Cloning 68
7.1 Shot gun cloning 68
7.2 Partial sequence of chitinase gene by PCR 72
IV DISCUSSION 78
Screening and isolation of bacteria producing chitinase 78
Identification of TU005 78
Chitinase production of *Microbacterium* sp. TU05 78
Characterization of crude enzyme from *Microbacterium* sp. TU05 79
Effect of pH on chitinase activity 79
Effect of temperature on chitinase activity 79
Substrate specificity 80
Estimation of chitinase molecular weight 80

Hydrolysis products of crude enzyme 81
Partial purification of crude enzyme 81
Characterization of partially purified chitinase peak1 82
DNA Cloning 82
V CONCLUSION 84
REFERENCES 86
APPENDICES 92
BIOGRAPHY 98

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. Application of chitin and its derivatives....7
2. Percentage of chitin in different sources....12
3. Biochemical characteristic of selected strain....54
4. Partial purification of chitinase from *Microbacterium* sp. TU05....66

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURE

Figure **Page**

1. Polymer of (A) cellulose, (B) chitin, and (C) chitosan....2
2. monomer of (A) cellulose, (B) chitin, and (C) chitosan....3
3. Chitin synthesis....4
4. Diagrammatic illustration of three types of chitin with arrangements as (A) α-chitin, (B) β-chitin and (C) γ-chitin....6
5. Simplified flowchart for preparation of chitin, chitosan, their oligomers and monomers from shellfish waste....10
6. Hydrolysis of chitin....11
7. Three dimensional structure of family 18 chitinase and family 19 chitinase....16
8. Classification of bacterial chitinases based on the homology of amino acid sequence of individual catalytic domains....17
9. Mechanism of glycosyl hydrolysis catalyzed by family 18 chitinase following substrate-assisted catalysis.... 18
10. Structure of strong inhibitor for family 18 chitinase, allosamidin....24
11. RapID CB Plus panels for identification irregular, gram positive, and non-spore forming bacteria....35
12. Diagram for 16S rRNA PCR amplification....36
13. Diagram for partial chitinase gene PCR amplification....49
14. Colonial morphology of *Microbacterium* sp. TU05 on 0.02% CCMM agar plate....52
15. Gram-stain of selected bacteria at different cultivation time and medium....53
16. The ligated 16S rRNA gene analyzed by 1.5% agarose gel electrophoresis....55
17. The 16S rRNA gene sequence of TU05....56
18. Production of chitinase from *Microbacterium* sp. TU05....57
19. Effect of pH on crude chitinase activity....58
20. Effect of temperature on crude chitinase activity....59
21. Substrate specificity of crude chitinase of *Microbacterium* sp. TU05....61
22. Detection of chitinase activity from crude enzyme of *Microbacterium* sp. TU05 by SDS-PAGE....62
23. Hydrolysis products of crude chitinase from *Microbacterium* sp. TU05....63

24. Chromatographic pattern of protein and chitinase activity by DEAE-cellulose column..65
25. SDS-PAGE of fraction containing maximum chitinase activity....................67
26. Effect of pH on partially purified chitinase peak1 activity.................... 69
27. Effect of temperature on partially purified chitinase peak1 activity...............62
28. Substrate specificity of partially purified chitinase peak1 of *Microbacterium* sp. TU05...71
29. Agarose gel electrophoresis determined PCR products from primers BP-I, BP-II, BP-V, and BP- VI...73
30. Agarose gel electrophoresis illustrated ligated PCR products from several transformants...74
31. Agarose gel electrophoresis determined partial chitinase gene from PCR amplification..75
32. Nucleotide sequences of partially chitinase gene.................................76
33. Nucleotide translated to protein alignment of *Microbacterium* sp. TU05 with *Arthrobacter* sp...77
A1 The 16S rRNA sequence of *Microbacterium* sp. TU05 compared with *Microbacterium keratanolyticum* 93
D1 Correlation between final concentration of standard N-acetyl-D-glucosamine and absorbance at 420 nm...97

LIST OF ABBREVIATIONS

A	Absorbance
bp	Base pair(s)
BSA	Bovine serum albumin
°C	Degree of celcius
CC	Colloidal chitin
CCMM	Colloidal chitin minimum medium
CS	Chitosan
DD	Deacetylated
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxynucleotide triphosphate
et al.	Et. Alii (latin), and others
etc.	Et cerata (latin), other things
g	Gram(s)
GlcN	Glucosamine
GlcNAc	*N*-acetyl-glucosamine
$(GlcNAc)_2$	*N,N'*-diacetyl-chitobiose
FC	Flake chitin
FCMM	Flake chitin minimum medium
HPLC	High performance liquid Chromatography
kb	Kiobase(s)
kDa	Kilodalton(s)
kΩ	Kioohm
kV	Kilovolt
LB	Luria-Bertani medium
l	Litre
M	Molar
mg/ml	Milligram per milliliter
ng	nanogram
PCR	Polymerase chain reaction
pmol	Picomol
RC	Regenerated chitin
rpm	Revolution per minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย