

ไคทีเนสจากแบคทีเรียทนร้อน: ลักษณะสมบัติและการโคลนยีน



นายสัญญา กุดัน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0624-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20445982

24 ก.ย. 2546

**CHITINASE FROM THERMOTOLERANT BACTERIA: ENZYME  
CHARACTERIZATION AND GENE CLONING**

**Mr. Sanya Kudan**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Biochemistry**

**Program of Biochemistry**

**Faculty of Science**

**Chulalongkorn University**


**Academic Year 2001**

**ISBN 974-17-0624-3**

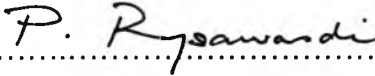
Thesis Title           Chitinase from thermotolerant bacteria: Enzyme  
                                  characterization and gene cloning  
By                         Mr.Sanya Kudan  
Field of study         Biochemistry  
Thesis Advisor        Rath Pichyangkura, Ph.D.


---

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

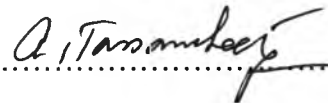
.....Deputy Dean for Administrative Affairs,  
Acting Dean, Faculty of Science  
(Associate Professor Pipat Karntiang, Ph.D.)

#### 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.)

สัญญา กุศลัน: โคทินเนสจากแบคทีเรียทนร้อน: ลักษณะสมบัติและการ โคลนยีน (CHITINASE FROM THERMOTOLERANT BACTERIA: ENZYME CHARACTERIZATION AND GENE CLONING) อ.ที่ปรึกษา: อ.ดร.รัฐ พิษณุวงกูร, 148 หน้า. ISBN 974-17-0624-3.

ได้ทำการแยกแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ SK-1 ที่สามารถผลิตโคทินเนสจากดินในจังหวัดอ่างทอง SK-1 เจริญได้ที่ อุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 60 °C (มีอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 50°C) เจริญได้ในอาหารที่มีค่า pH ตั้งแต่ 3 ถึง 10 (มีค่า pH ที่เหมาะสมเป็น 7.5) และเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0 ถึง 10% (มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็น 1%) เมื่ออาศัย สมบัติบางประการทางกายภาพและทางชีวเคมี เช่น การสร้างเอนโดสปอร์ การมี peritrichous flagella และการเปรียบเทียบลำดับ เบสใน 16S rRNA พบว่าเป็นแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ที่มีชื่อว่า *Bacillus licheniformis* โดยที่แบคทีเรียนี้สามารถผลิต เอนไซม์ได้มากที่สุดในช่วง Log phase ของการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.02% colloidal chitin ภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตเอนไซม์คือ เลี้ยงแบคทีเรียใน 0.08% CCMM, pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 50 °C และผลิตเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 50 °C ในเอนไซม์หยาบประกอบด้วยเอนไซม์สองชนิดคือโคทินเนส และโคโทไบเอส ภาวะของการเร่งปฏิกิริยาที่ เหมาะสมของเอนไซม์หยาบที่ได้จากน้ำเลี้ยงแบคทีเรียมีค่า pH และอุณหภูมิเป็น 6.0 และ 60 °C โดยที่เอนไซม์สามารถ ย่อย regenerated chitin ได้ดีที่สุด การศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย colloidal chitin ด้วยเอนไซม์ โดย HPLC พบว่า เอนไซม์หยาบสามารถย่อย colloidal chitin ได้ N-acetylglucosamine, และ N, N'-diacetyl chitobiose เป็นส่วนใหญ่ หลังจาก วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยทำการข้อมแอคติวิตีของเอนไซม์เปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนที่ได้ พบว่ามีโปรตีนที่มีโค ทินเนสแอคติวิตีอย่างน้อย 8 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 20 ถึง 72 กิโลดาลตัน

เมื่อทำโคทินเนสให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีการดูดซับแบบจำเพาะด้วยคอลลอยดัลโคทินและคอลัมน์ DEAE และนำ ไปศึกษาสมบัติของโคทินเนสที่บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าโคทินเนสที่ได้จาก DEAE peak2 มีค่า pI เท่ากับ 4.62 และสามารถข้อมคิด สีย้อมโคทินเนสใน SDS-PAGE ได้ทั้งหมด 3 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72, 70 และ 58 กิโลดาลตัน pH และอุณหภูมิ ในการเร่งปฏิกิริยาคือ 5 และ 55 °C เอนไซม์เสถียรในช่วง pH 6-8 และที่อุณหภูมิ 40-50 °C เอนไซม์มีค่า  $K_m$  และค่า  $V_{max}$  ของ เอนไซม์ต่อการย่อย colloidal chitin เป็น 0.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 7.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการทำการโคลนแบบ Shotgun ของจีนโครโมโซมมอลดีเอ็นเอของ *B. licheniformis* SK-1 ที่ตัดแบบไม่สมบูรณ์ ด้วย *Pst*I หลังทำการคัดเลือกไปแล้ว 5,000 โคลนีนี ไม่พบโคลนที่ให้ผลบวกบนอาหารแข็งที่มี colloidal chitin จึงได้ทำการ เปลี่ยนวิธีโคลนโดยใช้วิธีเพิ่มจำนวนชิ้นยีนโคทินเนสด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะต่อยีนโคทินเนสของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* คือ BP-F และ BP-R แล้วโคลนเข้าสู่ pGEM-T easy ทำการคัดเลือกบนอาหารแข็งที่มี colloidal chitin พบโคโลนีที่ให้ วงใสบนอาหารแข็งที่มีพลาสติกที่มีชิ้น insert ขนาด 2 กิโลเบส, pSKChi66 พลาสติก pSKChi66 มี 1 ORF ที่มีขนาด 1,797 คู่ เบส ซึ่งแปลเป็นรหัสโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 598 ตัวที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 5.02 ลำดับของกรดอะมิโนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับของกรดอะมิโนของโคทินเนสจาก *B. subtilis* และ *B. licheniformis* 84% เอนไซม์ที่ได้จาก pSKChi66 มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเป็น 5 และ 60 °C โดยที่เอนไซม์สามารถย่อย colloidal chitin ได้ดีที่สุด การศึกษาผลิตภัณฑ์ของการย่อย colloidal chitin ด้วยเอนไซม์ โดย HPLC พบว่าเอนไซม์หยาบ สามารถย่อย colloidal chitin ได้ N, N'-diacetyl chitobiose เป็นส่วนใหญ่ โคทินเนสที่ได้จาก pSKChi66 สามารถข้อมคิดสีย้อม โคทินเนสใน SDS-PAGE ได้ทั้งหมด 3 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70, 65 และ 58 กิโลดาลตัน

หลักสูตร .....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต .....สัญญา กุศลัน.....  
สาขาวิชา .....ชีวเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา.....2544..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# #4272422323: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: CHITINASE / THERMOTOLERANT / CHARACTERIZATION / CLONING

SANYA KUDAN: CHITINASE FROM THERMOTOLERANT BACTERIA: ENZYME

CHARACTERIZATION AND GENE CLONING HESIS ADVISOR: RATH


PICHYANKURA, Ph. D., 148 pp. ISBN 974-17-0624-3.

Thermotolerant bacteria isolate, SK-1, which produced high extracellular chitinase activity, was isolated from soil in Angthong Province, Thailand. Optimum for growth for SK-1 in LB medium was at pH 7.5 and at 50 °C. SK-1 can also grow in medium containing NaCl from 0 to 10% (optimum, 1% NaCl). The properties of the isolate, such as the formation of endospore, having peritrichous flagella, and the partial 16S ribosomal RNA sequence, indicated that it belongs to *Bacillus licheniformis*. The enzyme production from *B. licheniformis* SK-1, in 0.02% colloidal chitin minimum medium, was found during log phase. The optimum for enzyme production from *B. licheniformis* SK-1 was cultured in 0.08%CCMM, pH 7.5 at 50 °C. Crude enzyme contains at least 2 activities, a high activity chitinase, and chitinase. The optimum pH and temperature of crude enzyme was 6.0/60 °C. *B. licheniformis* SK-1 chitinase can hydrolyze regenerated chitin the best followed by, colloidal chitin, powdered chitin, partially N-acetylated chitin, chitosan, and flaked chitin, respectively. Products from this enzyme, analyzed by HPLC, a mixture of N-acetylglucosamine (GlcNAc) and chitobiose (GlcNAc)<sub>2</sub>. SDS-PAGE analysis of crude enzyme from culture medium from *B. licheniformis* SK-1 following by activity staining, using glycol chitin as substrate, eight chitinolytic activity bands were observed with molecular weight ranging from 20 to 72 kDa.

Chitinase was partially purified from the culture medium of *B. licheniformis* SK-1 by colloidal chitin affinity adsorption followed by DEAE-cellulose column chromatography. The partial purified enzyme showed a single protein band on native polyacrylamide gel electrophoresis. The isoelectric point of the major component in the partial purified chitinase was 4.62. The partial purified chitinase showed a major band with MW 72 kDa and 2 minor bands with MW 58, 70 kDa on SDS-PAGE, respectively. The partial purified chitinase revealed two activity optima at pH is 6 and 8 when colloidal chitin was used as substrate and was stable in pH 6-8. The partial purified enzyme exhibited a broad activity temperatures ranging between 40 to 70 °C, with optimum at 55 °C and retained 94%, 83 and 22% activity after heat at 40, 50 and 60 °C for 12 hrs, respectively. The  $K_m$  and  $V_{max}$  of the partial purified chitinase was 0.23 mg colloidal chitin ml<sup>-1</sup> and 7.03 U mg<sup>-1</sup>.

Shotgun cloning of the *Pst*I partially cut genomic DNA of *B. licheniformis* SK-1 was investigated. After screening 5,000 transformants, no positive clones were found. Then the full-length chitinase gene was amplified using primers, specific for *Bacillus* chitinase gene, BP-F and BP-R. The positive clone was screened on CCMM. The positive clone contained a plasmid with 2-kb insert fragment, pSKChi66. The plasmid pSKChi66 had one open reading of 1,797 bp which encoded a polypeptide of 598 amino acid residues, corresponding to a 66 kDa protein with an isoelectric point 5.02. The amino acid comparison indicated Chi66 is 84% similar to chitinase from *B. subtilis* TP-1 and chitinase from *B. licheniformis*. Crude chitinase from pSKChi66 was characterized. The optimum pH and temperature was pH 5.0 and 60 °C. Crude enzyme hydrolyzed colloidal chitin the best followed by powdered chitin, PNAC, flaked chitin, chitosan and regenerated chitin, respectively. Determination of hydrolytic products by HPLC, found a N-N'-diacetylchitobiose from colloidal chitin. SDS-PAGE analysis of chitinolytic enzyme from culture medium from recombinant clone showed three bands of protein with chitinase activity. The molecular weights were approximately 70, 65 and 58 kDa, which is similar with crude and partial purified enzyme from *B. licheniformis* SK-1.

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.Paimsook Pongsawasdi, Associate Professor Dr.Siriporn Sittipraneed and Associate Professor Dr.Anchalee Tassanakajon for serving as the members of my thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

I would like to thank Dr.Thidarat Eksittikul for critical reading of this thesis.

I would to thank Yaiyen's family for helpful and mankind through the years and Tunngam's family for helpful to keep samples.

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 Toom, Pee Oam, Pee Lek, Pee Jang, Ed, Ann, Kung, Nut, Lele, Ohm, Nee, Ai and Num for their kindness, will power and suggestions.

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

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

# CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
Chitin.....	1
Chitinolytic enzyme.....	5
Chitinase assay.....	15
The application of chitinase.....	17
Occurrence of chitinase.....	19
Purification, characterization and molecular cloning of chitinase.....	23
<i>Bacillus licheniformis</i> .....	25
Thermotolerant bacteria.....	29
The aim of this thesis.....	30
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	31
Equipments.....	31
Chemicals.....	31
Enzymes and restriction enzymes.....	33
Bacterial strains.....	34
Host cells.....	34
Vectors.....	34
Media preparation.....	34
Luria-Bertani (LB) medium.....	34
Colloidal chitin minimum medium, CCMM).....	34
Identification of bacterial strain.....	35
Characteristics of <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	35
Morphological characteristics.....	35
Biochemical characteristics.....	35
Physiological characteristics.....	35
Scanning electron microscopy.....	36
16S rRNA gene.....	36
Chitinase assay.....	36
Colloidal chitin agar plate for chitinolytic screening.....	36
Colorimetric method.....	37
Cultivation of bacteria.....	37
Starter innoculum.....	37
Chitinolytic production and growth curve of <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	38
Optimization from enzyme production.....	38
Optimization temperature.....	38
Effect of various potential inducers.....	39
Effect of various concentration of colloidal chitin.....	39
Detection of hydrolytic products produced by chitinolytic enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	39

## CONTENTS (Continued)

	Page
Purification of chitinase.....	39
Enzyme production.....	39
Chitin affinity adsorption.....	40
Column chromatography.....	40
DEAE-cellulose chromatography.....	40
Characterization of chitinase enzyme.....	40
Optimum pH for chitinase activity.....	41
Optimum temperature for chitinase activity.....	41
Enzyme stability.....	41
The chitinase activity on different substrates.....	41
The kinetic of enzyme.....	42
Native isoelectric focusing (IEF) gel electrophoresis.....	42
Glycoprotein staining.....	42
General methods used in cloning and subcloning of chitinase gene.....	43
Extraction of plasmid DNA from <i>E. coli</i> .....	43
Extraction of chromosomal DNA.....	43
Agarose gel electrophoresis.....	44
Restriction enzyme digestion.....	45
Partial digestion of chromosomal DNA.....	45
Recombinant DNA construction.....	45
Competent cells preparation.....	45
Electrotransformation.....	46
Detection of chitinase gene.....	47
PCR Amplification.....	47
Chitinase gene amplification.....	47
Analysis of chitinase gene.....	48
DNA Sequencing.....	48
Analysis of <i>chi66</i> gene.....	48
Homology search of <i>chi65</i> gene using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).....	48
DNA Sequence manipulation.....	51
CHAPTER III RESULTS.....	51
Screening, isolation and identification of a thermotolerant bacterium produce chitinase.....	51
Screening and isolation of a thermostable chitinase producing bacteria.....	51
Identification bacterial strain SK-1.....	57
16S rRNA of SK-1.....	57
Optimization for growth of <i>Bacillus licheniformis</i> SK-1.....	57
Chitinolytic enzyme production and growth curve of <i>Bacillus</i> <i>licheniformis</i> SK-1.....	57
Optimization for chitinase production.....	63
Optimum temperature.....	63
Effect of various source of chitin on chitinase production.....	63
Effect of various concentration of colloidal chitin.....	63



## CONTENTS (Continued)

	Page
Partial characterization of crude chitinolytic enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1 .....	67
Optimum and stability pH for crude chitinolytic enzyme.....	67
Optimum and temperature stability for crude chitinase.....	67
The chitinolytic activity on different substrates.....	72
Products of chitinolytic degradation of colloidal chitin by crude enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1 .....	72
Detection of crude chitinolytic enzyme and determination of its molecular mass using SDS-PAGE in crude enzyme.....	72
Purification of <i>B. licheniformis</i> chitinase.....	76
Characterization of partial purified chitinase enzyme.....	79
Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.....	79
Isoelectric focusing gel electrophoresis.....	79
Glycoprotein staining (PAS staining).....	79
Molecular weight of partial purified chitinase.....	79
Optimum and pH stability of partial purified chitinase activity.....	85
Optimum and temperature stability for partial purified chitinase activity.....	85
The kinetic of enzyme.....	85
Shotgun cloning.....	90
PCR amplification of the whole gene fragment.....	90
T-A cloning and transformation.....	90
Analysis of <i>chi66</i> gene.....	90
Homology of <i>chi66</i> using BLAST program from GenBank.....	90
Manipulation of DNA sequence.....	93
Protein prediction by SWISS-Model Protein Modeling.....	93
Partial characterization of crude chitinase from Chi66.....	93
Optimum pH for crude chitinase activity from Chi66.....	93
Optimum and temperature stability for crude chitinase activity from Chi66.....	93
The crude chitinase activity from Chi66 on different substrates.....	101
Products of chitinolytic degradation of colloidal chitin by crude enzyme from Chi66.....	101
Detection of chitinase and determination of its molecular mass using SDS-PAGE in crude enzyme from Chi66.....	101
CHAPTER IV DISCUSSION.....	110
CHAPTER V CONCLUSION.....	111
REFERENCES.....	112
APPENDICES.....	122
APPENDIX A.....	123
APPENDIX B.....	138
APPENDIX C.....	139
APPENDIX D.....	142
APPENDIX E.....	143
APPENDIX F.....	145

**CONTENTS (Continued)**

	<b>Page</b>
APPENDIX G.....	146
APPENDIX H.....	147
BIOGRAPHY.....	148

## LIST OF TABLES

Table	Page
1. Current practical uses of chitin, chitosan and their derivatives.....	6
2. Comparison of the characteristics of purified chitinase from several microorganisms.....	26
3. Molecular cloning of chitinase genes.....	28
4. Nucleotide sequence and T <sub>m</sub> (°C) of all primers used in chitinase gene amplification.....	49
5. PCR condition in each step.....	50
6. Morphological and biochemical characteristics of <i>Bacillus licheniformis</i> SK-1.....	56
7. Purification of chitinase from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	78
B. Biochemical characteristics of the bacteria strain SK-1.....	138

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Chemical structure of cellulose (a), chitin (b), and chitosan (c).....	2
2. Crystalline structure of chitin.....	3
3. Classification of the bacterial chitinases .....	9
4. Three dimensional structure of family 18 chitinase.....	11
5. Mechanism of glycosyl hydrolysis catalyzed by family 18 chitinase.....	13
6. Structure of a strong inhibitor, allosmidin, for family 18 chitinase.....	14
7. Levels of chitinolytic activity of Isolation bacteria.....	52
8. Colony morphology of bacteria strain SK-1 on 0.02% colloidal chitin minimum medium plate.....	53
9. Cell morphology of the bacteria strain .....	54
10. Scanning electron microscopic (SEM) of <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	55
11. 16S rRNA amplification product from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	58
12. Alignment of 16S ribosomal RNA sequence of <i>Bacillus licheniformis</i> SK-1 (AF411341) with <i>B. licheniformis</i> B (AF276309).....	60
13. Growth of strain SK-1 in various conditions.....	61
14. The relationship between cell number and chitinolytic enzyme production.....	62
15. Effect of temperature on the chitinolytic production by <i>B. licheniformis</i> SK-1..	64
16. Effect of various source of chitin on the chitinolytic production by <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	65
17. Effect of colloidal chitin concentration on the chitinolytic production by <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	66
18. Optimum pH of crude chitinolytic enzyme from <i>Bacillus licheniformis</i> SK-1...	68
19. The pH stability of crude chitinolytic enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	69
20. Optimum temperature of crude chitinolytic enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	70
21. The temperature stability of crude chitinolytic enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	73
22. Crude chitinolytic activity from <i>B. licheniformis</i> SK-1 on different substrates...	74
23. Digestion products of crude chitinolytic enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1...	75
24. Determination of protein with chitinolytic activity of culture medium from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	76
25. Chromatogram of protein from <i>B. licheniformis</i> SK-1 separated by DEAE cellulose column.....	80
26. Native gel of each step purification the partial purified chitinase from <i>B.</i> <i>licheniformis</i> SK-1 .....	81
27. Native IEF pattern of the partial purified chitinase from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	82
28. PAS staining of the partial purified chitinase from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	83
29. SDS-PAGE of crude enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	84
30. Optimum pH of partial purified chitinase enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1..	86
31. The pH stability of partial purified chitinase enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	87
32. Optimum temperature of partial purified chitinolytic enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	88
33. The temperature stability of partial purified chitinolytic enzyme from <i>B. licheniformis</i> SK-1.....	89

## LIST OF FIGURES (Continued)

	Page
34. Dependence of the reaction rate of chitinase on the substrate concentration.....	90
35. Agarose gel electrophoresis determined PCR products from whole chitinase gene amplification.....	91
36. Formation of clear zone in various host strains.....	92
37. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the <i>chi66</i> gene.....	95
38. Amino acids sequences alignment chitinase from <i>chi66</i> gene with other chitinase.....	97
39. Theoretical model of <i>B. licheniformis</i> Chi66.....	98
40. Optimum pH of crude chitinase from Chi66.....	99
41. Optimum temperature of crude chitinolytic enzyme from Chi66.....	100
42. The temperature stability of crude chitinolytic enzyme from Chi66.....	102
43. Crude chitinolytic activity from Chi66 on different substrates.....	103
44. Digestion products of crude chitinolytic enzyme from pSKChi66.....	104
45. SDS-PAGE of crude enzyme from Chi66.....	105
E1. Correlation between final concentration of standard N-acetyl-D-glucosamine and optical density (absorbance) at 420 nm.....	143
E2. Correlation between final concentration of standard p-nitrophenol and optical density (absorbance) at 420 nm.....	144
F. Relationship between standard protein (BSA) concentration and optical density (absorbance) at 595 nm.....	145
G. Calibration curve for standard pI markers.....	146

## 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
CFU	Colony forming unit(s)
DNA	Deoxyribonucleic acid
et al.	Et. Alii (latin), and others
etc.	Et cetera (latin), other things
g	Gram(s)
GlcNAc	N-acetyl-glucosamine
(GlcNAc) <sub>2</sub>	N,N'-diacetyl-chitobiose
FC	Flaked chitin
hr	Hour(s)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.e.	id est (latin), that is
kb	Kilobase(s)
kDa	Kilodalton(s)
kΩ	Kiloohm
kv	Kilovolt
LB	Luria-Bertani medium
l	Litre
M	Molar
mg/ml	Miligram per millilitre
min	Minute(s)
ml	Mililitre
mg	Miligram
mU	Miliunit
MW	Molecular weight
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Ammonium persulfate
ng	Nanogram
µg	Microgram
µl	Microlitre
ORF	Open reading frame
ORI	Origin of replication
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PC	Powdered chitin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PNAC	Partially N-acetylated chitin
RC	Regenerated chitin
RNase	Ribonuclease
rpm	Revolution per minute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
SD	Shine-Dalgarno sequence
SDS	Sodium dodecyl sulfate

## LIST OF ABBREVIATIONS (Continued)

sec	Second
sp.	Specie
spp.	Species
TEMED	N,N',N'',N'''-Tetramethylenediamine
UV	Ultraviolet
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside