การตรวจหาไคทิเนสในพืชปลูกบางชนิด และทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์จากบวบเหลี่ยม *Luffa acutangula* Roxb.

นางสาว อัมพร ฉลวยดำรง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-639-075-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I15052392

SCREENING OF CHITINASES IN SOME CROPS AND PARTIAL PURIFICATION OF THE ENZYME FROM ANGLED LOOFAH *Luffa acutangula* Roxb.

Miss Amporn Chalouydumrong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997

ISBN 974-639-075-9

Thesis Title	Screening of Chitinases in Some Crops and Partial Purification of the Enzyme from Angled Loofah *Luffa acutangula* Roxb.
By	Miss Amporn Chalouydumrong
Program	Biochemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.

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

..... Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Assistant Professor Peerada Mongkolkul, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)

..... Member

(Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

อัมพร ฉลวยดำรง : การตรวจหาไคทิเนสในพืชปลูกบางชนิด และทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์จากบวบเหลี่ยม *Luffa acutangula* Roxb (SCREENING OF CHITINASES IN SOME CROPS AND PARTIAL PURIFICATION OF THE ENZYME FROM ANGLED LOOFAH (*Luffa acutangula* Roxb.), อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์, 98 หน้า. ISBN 974-639-075-9

การตรวจหาไคทิเนสจากพืชปลูกบางชนิดโดยวิธีการเกิดวงใสบนอาหารแข็งที่มีคอลลอยดัลไคทินเป็นสับสเตรต พบว่าส่วนสกัดจากใบพืชในภาวะปกติจำนวน 7 ชนิด (มะยม ตำลึง มะละกอ ขนุน มะขาม ชมพู่ และ มะขามเทศ) จากเมล็ดถั่วเขียวที่เหนี่ยวนำให้ผลิตไคทิเนสโดยการเพาะเมล็ดในภาวะที่มีคอลลอยดัลไคทินความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0 และ 2.0 % และจากเปลือกของบวบเหลี่ยม พบว่าส่วนสกัดของใบมะละกอ ถั่วเขียว และเปลือกบวบเหลี่ยมสามารถทำให้เกิดวงใสบนอาหารแข็งได้ ทำส่วนสกัดจากเปลือกบวบเหลี่ยมให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 30-70 % และ DEAE-cellulose คอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่ามีความบริสุทธิ์ 18.9 เท่า จากการศึกษาสมบัติของไคทิเนสจากเปลือกของบวบเหลี่ยมที่มีความบริสุทธิ์บางส่วน พบว่ามีไคทิเนส 2 ชนิด ชนิดแรกมีน้ำหนักโมเลกุล 54,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 2 ยูนิตย่อย น้ำหนักโมเลกุล 25,000 และ 29,000 ดาลตัน และชนิดที่สองประกอบด้วยยูนิตเดียวมีน้ำหนักโมเลกุล 29,000-30,000 ดาลตัน เอนไซม์ทั้งสองชนิดถูกชะออกจากคอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sephadex G-100 พร้อมกัน เมื่อนำเอนไซม์ทั้งสองชนิดมาแยกด้วยเจลไอโซอิเลคตริคโฟคัสซิง พบว่าไคทิเนสชนิดที่มี 2 ยูนิตย่อยแยกเป็นแถบโปรตีน 2 แถบมีค่า pI 5.4 และ 5.5 สำหรับไคทิเนสชนิดที่มียูนิตเดียวมีโปรตีน 1 แถบ มีค่า pI 5.4 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 3.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความสามารถในการย่อยสลาย purified chitin คอลลอยดัลไคทิน ไกลคอล ไคทิน และ ไกลคอล ไคโทแซน ได้ดีตามลำดับจากมากไปน้อย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C726118 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: CHITINASE / CHITIN / *Luffa acutangula* Roxb.
AMPORN CHALOUYDUMRONG: SCREENING OF CHITINASE IN SOME CROPS AND PARTIAL PURIFICATION OF THE ENZYME FROM ANGLED LOOFAH *Luffa acutangula* Roxb., THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. TIPAPORN LIMPASENI, Ph.D.,
98 pp. ISBN 974-639-075-9

The extracts from leaves of 7 local plants : star gooseberry, ivygourd, papaya, jackfruit, tamarind, roseapple and aztec kuamochill, *Phaseolus mungo Leguminosae* seeds grown in the presence of colloidal chitin and pericarp of angled loofah fruit (*Luffa acutangula* Roxb.) were tested for chitinase activity. Only the extracts from leaves of papaya, seedling of *Phaseolus mungo Leguminosae* and pericarp of angled loofah fruit gave clear zones on colloidal chitin-agar plate which is one of the methods for detecting chitinase. Chitinase from the crude extract from pericarp of angled loofah fruit was partially purified up to 18.9 folds by 30-70 % ammonium sulfate precipitation and DEAE-cellulose column chromatography. The fraction from DEAE-cellulose contained 2 chitinases, one contained 2 subunits with molecular weight of 25,000 and 29,000 while the other contain only one 29,000 subunit. The former chitinase showed 2 proteins bands on isoelectric focusing gel with pI's of 5.4 and 5.5 while the latter showed one band at pI 5.4. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were 3.5 and 37°C, respectively. The substrate specificity of the enzyme was purified chitin, colloidal chitin, glycol chitin and glycol chitosan, respectively.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Tipaporn Limpaseni

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม –

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitute to my advisor, Assistant Professor Tipaporn Limpaseni for her excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without her kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Dr. Peerada Mongkolkul for serving as chairman of the committee. Dr. Pairoh Pinphanichakarn, and Dr. Kanoktip Packdibamrung for serving as committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

This research was supported by the Graduate School, Chulalongkorn University.

Sinncere thanks are also expressed to all staff members and students of the Biochemistry Department for their help in Laboratory and discussion with sincerity and friendships. Special thanks are also extended to Pee Toom, Pee Mong, Pee Nok, Pee Bee, Pee Baew, Pee Ju, Pee Aoy, Deer, Ole, Rung, Na and ood for their kindness, willpower and suggestions.

My appreciation is also to Mr. Jakapat Limsalakpetch for love and care during my study in Chulalongkorn University.

Finally, I wish to express my deepest gratitude to my family, mother, father, my two brother and three sister for their unlimited love understanding and encouragement.

CONTENTS

PAGE

THAI ABSTRACT iv

ENGLISH ABSTRACT v

ACKNOWLEDGEMENT vi

CONTENT vii

LIST OF FIGURES xii

LIST OF TABLES xiv

ABBREVIATION xv

CHAPTER

I INTRODUCTION

1.1 Chitin 1

1.2 Chitinases 4

1.3 Assay methods of chitinases enzyme

1.3.1 Viscosimetric assay for chitinase 7

1.3.2 Tritiated chitin assay for chitinase 8

1.3.3 Colorimetric assay for chitinase 8

1.4 Occurrence of chitinases

1.4.1 Fungal chitinases 10

1.4.2 Bacterial chitinases 11

1.4.3 Insects chitinases 13

1.4.4 Marine invertebrate chitinases 13

1.4.5 Fish chitinase 16

1.4.6 Protozoa chitinases 16

1.4.7 Plant chitinases

PAGE

1.4.7.1 Constitutive plant chitinases.....20
1.4.7.2 Ethylene treatment.....20
1.4.7.3 Viral infection.....20
1.4.7.4 Infection by microorganism, wounding and fungal elicitors.....21
1.4.7.5 Chemical induction.....22
II MATERIALS AND METHODS
2.1 Materials
2.1.1 Equipmemts.....23
2.1.2 Biological materials.....24
2.1.3 Chemicals
2.1.3.1 Chromatographic materials.....24
2.1.3.2 Chemical for electrophoresis and isoelectric focusing.....24
2.1.3.3 Chemical for agar plate assay and colorimetric method for chitinase activity.....25
2.1.3.4 Other chemicals.....25
2.2 Methods
2.2.1 Extraction of chitinase from fruit pericarp.....26
2.2.2 Extraction of chitinase from leaves.....26
2.2.3 Induction and extraction of chitinase from bean seeds.....26
2.2.4 Preparation of colloidal chitin27
2.2.5 Preparation of glycol chitin.....27

PAGE

2.3 Detection and determination of chitinase activity

2.3.1 Detection of chitinase by agar plate 28

2.3.2 Determination of chitinase activity by colorimetric method 29

2.3.3 Detection of chitinase on polyacrylamide gel electrophoresis

2.3.3.1 Native PAGE 31

2.3.3.2 SDS-PAGE 31

2.4 Determination of protein.....32

2.5 Purification of chitinase

2.5.1 Ammonium sulfate precipitation 32

2.5.2 Column chromatography

2.5.2.1 Chromatography on DEAE-cellulose.....33

2.5.2.2 Gel permeation chromatography 33

2.6 Polyacrylamide gel electrophoresis 34

2.7 Determination of molecular weight of chitinase

2.7.1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 34

2.7.2 Gel filtration on Sephadex G-100.....35

2.8 Isoelectric focusing 35

2.9 Optimum pH of chitinase..... 37

2.10 Optimum temperature of chitinase 37

2.11 Substrate specificity of chitinase 37

III RESULT

3.1 Screening of chitinase in some local crops

3.1.1 Chitinase in leaves of some local crops.....39

PAGE

3.1.2 Chitinase in bean seeds 42
3.1.3 Chitinase in angled loofah fruit pericarp 42
3.2 Purification of chitinase from angled loofah pericarp extract
3.2.1 Ammonium sulfate fractionation 46
3.2.2 DEAE-cellulose column chromatography 48
3.3 Molecular weight determination of the chitinase
3.3.1 Molecular weight determination of pericarp chitinase by SDS-PAGE 51
3.3.2 Sephadex G-100 column 56
3.4 Some biochemical properties of the chitinase
3.4.1 Determination of isoelectric point 61
3.4.2 Effect of pH on chitinase activity 64
3.4.3 Effect of temperature on chitinase activity 64
3.4.4 The substrate specificity test 64
IV DISCUSSION
4.1 Screening of chitinase in local crops
4.1.1 Methods of screening
4.1.1.1 Chitn-agar plate assay for chitinase 70
4.1.1.2 Chitinase activity stain on PAGE 70
4.1.1.3 Quantitative colorimetric assay of chitinase 71
4.1.2 Chitinase inleaves of local crops 72
4.1.3 Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in bean seeds 72

PAGE

4.2 Purification of chitinase from fruit pericarp of angled loofah

4.2.1 Ammonium sulfate precipitation 74

4.2.2 DEAE-cellulose column chromatography.....75

4.3 Characterization of the partial-purified chitinase

4.3.1 Molecular weight determination

4.3.1.1 Molecular weight determination on SDS-PAGE 76

4.3.1.2 Molecular weight determination on Sephadex G-100 77

4.3.1.3 Some characteristics of the angled loofah chitinase.....78

VI SUMMARY 80

REFERENCES 81

APPENDIX A 89

APPENDIX B 90

APPENDIX C 95

APPENDIX D 96

APPENDIX E 97

BIBLIOGRAPHY 98

LIST OF FIGURES

FIGURE PAGE

1 Chitin, chitobiose and chitosan structures 2
2 Chitinase and related enzyme activity on chitin chin 5
3 Chitinase screening on agar plate of leave extract from leaves of local crops 40
4 SDS-PAGE (12%) staining for chitinase of leaves extracts of local crops 41
5 Chitinase screening on agar plate of bean seeds extract induced with (a) 1% colloidal chitin 43
(b) 2% colloidal chitin 44
6 ND-PAGE (12%) staining for chitinase of bean seeds extract induced with colloidal chitin 45
7 Chitinase screening on agar plate of pericarp extracts of angled loofah fruit 47
8 SDS-PAGE (12%) staining for chitinase of pericarp extracts of angled loofah fruit 49
9 Chromatographic profile of pericarp chitinase from angled loofah fruit on DEAE-cellulose column 50
10 ND-PAGE (12%) staininag for chitinase of each peak from DEAE-cellulose column 52
11 SDS-PAGE (12%) (a) staining for protein (b) of each peak from DEAE-cellulose column 53

FIGURE PAGE

12 Molecular weight determination of pericarp chitinase and activity staining by SDS-PAGE (12%) 55
13 Molecular weight calibration curve of standard proteins separated on 12% SDS-PAGE 57
14 Elution profile of partial purified pericarp on sephadex G-100 column 58
15 (a) Native-PAGE (12%), (b) SDS-PAGE (12%) staining for chitinase of the eluted fractions from Sephadex G-100 column 59
16 Molecular weight calibration curve for determination of molecular weight by gel filtration in sephadex G-100 60
17 Isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis of partial purified pericarp chitinase 62
18 Calibration curve of standard pI 63
19 Effect of pH on pericarp chitinase activity 65
20 Effect of temperature on pericarp chitinase activity 66
21 Substrate specificity tested 67

LIST OF TABLES

TABLE PAGE

1 Fungal chitinases and some properties 12
2 Bacterial chitinases and some properties 14-15
3 Plant chitinases and some properties 18-19
4 Purification table of pericarp chitinase 54

ABBREVIATION

A	Absorbance
AS 30-70	ammonium sulfate fraction
BSA	Bovine serum albumin
°C	degree celcius
DMAB	ρ-dimethylaminobenzaldehyde
DEAE-	Diethylaminoethyl-
g	gram
IEF	Isoelectric focusing
l	litre
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
μM	micromolar
ND-PAGE	nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis
NAG	*N*-acetylglucosamine
pI	Isoelectric point