

การตรวจหาไคทีเนสในพืชปลูกบางชนิด และทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของ
เอนไซม์จากบวบเหลี่ยม *Luffa acutangula* Roxb.

นางสาว อัมพร ฉลวยดำรง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-639-075-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**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

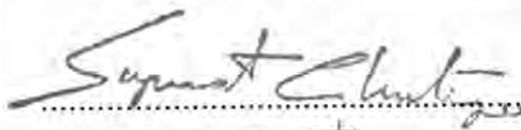
Chulalongkorn University

Academic Year 1997


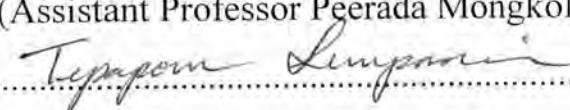
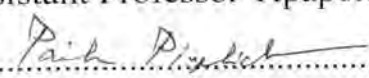
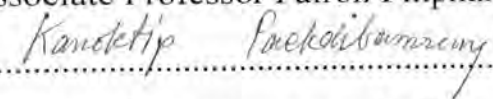
ISBN 974-639-075-9

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 จุลยดำรง : การตรวจหาไคตินเนสในพืชปลูกบางชนิด และทำให้บริสุทธิ์
บางส่วนของเอนไซม์จากบวบเหลี่ยม *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 ลิ้มปเสนีย์, 98 หน้า. ISBN 974-639-075-9

การตรวจหาไคตินเนสจากพืชปลูกบางชนิดโดยวิธีการเกิดวงใสบนอาหารแข็งที่มี
คอลลอยด์ไคตินเป็นสับสเตรต พบว่าส่วนสกัดจากใบพืชในภาวะปกติจำนวน 7 ชนิด (มะยม
ตำลึง มะละกอ ขนุน มะขาม ชมพู และ มะขามเทศ) จากเมล็ดถั่วเขียวที่เหนียวนำไปผลิต
ไคตินเนสโดยการเพาะเมล็ดในภาวะที่มีคอลลอยด์ไคตินความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0 และ 2.0 %
และจากเปลือกของบวบเหลี่ยม พบว่าส่วนสกัดของใบมะละกอ ถั่วเขียว และเปลือกบวบเหลี่ยม
สามารถทำให้เกิดวงใสบนอาหารแข็งได้ ทำส่วนสกัดจากเปลือกบวบเหลี่ยมให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยการ
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 30-70 % และ DEAE-cellulose
คอลัมน์โครมาโตกราฟี พบว่ามีความบริสุทธิ์ 18.9 เท่า จากการศึกษาสมบัติของไคตินเนสจาก
เปลือกของบวบเหลี่ยมที่มีความบริสุทธิ์บางส่วน พบว่ามีไคตินเนส 2 ชนิด ชนิดแรกมีน้ำหนัก
โมเลกุล 54,000 คาลตัน ประกอบด้วย 2 ยูนิต์ย่อย น้ำหนักโมเลกุล 25,000 และ 29,000 คาลตัน
และชนิดที่สองประกอบด้วยยูนิต์เดียวมีน้ำหนักโมเลกุล 29,000-30,000 คาลตัน เอนไซม์ทั้งสอง
ชนิดถูกหุ้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sephadex G-100 พร้อมกัน เมื่อนำเอนไซม์
ทั้งสองชนิดมาแยกด้วยเจลไอโซอิเล็กตริกโฟกัสซิง พบว่าไคตินเนสชนิดที่มี 2 ยูนิต์ย่อยแยกเป็น
แถบโปรตีน 2 แถบมีค่า pI 5.4 และ 5.5 สำหรับไคตินเนสชนิดที่มียูนิต์เดียวมีโปรตีน 1 แถบ
มีค่า pI 5.4 pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 3.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา
คือ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความสามารถในการย่อยสลาย purified chitin คอลลอยด์ไค-
ทิน ไกลคอล ไคติน และ ไกลคอล ไคโทแซน ได้ดีตามลำดับจากมากไปน้อย

ภาควิชาชีวเคมี.....
สาขาวิชาชีวเคมี.....
ปีการศึกษา2540.....

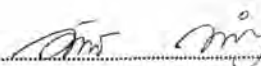
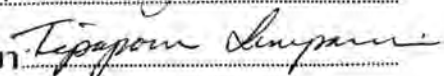
ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

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, ivy gourd, 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.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....
ปีการศึกษา.....2540.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... -

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude 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.

Sincere 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 Equipments.....	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 chitin	27
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 plate28
2.3.2	Determination of chitinase activity by colorimetric method29
2.3.3	Detection of chitinase on polyacrylamide gel electrophoresis
2.3.3.1	Native PAGE31
2.3.3.2	SDS-PAGE31
2.4	Determination of protein.....32
2.5	Purification of chitinase
2.5.1	Ammonium sulfate precipitation32
2.5.2	Column chromatography
2.5.2.1	Chromatography on DEAE-cellulose.....33
2.5.2.2	Gel permeation chromatography33
2.6	Polyacrylamide gel electrophoresis34
2.7	Determination of molecular weight of chitinase
2.7.1	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis34
2.7.2	Gel filtration on Sephadex G-100.....35
2.8	Isoelectric focusing35
2.9	Optimum pH of chitinase.....37
2.10	Optimum temperature of chitinase37
2.11	Substrate specificity of chitinase37
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 Chitin-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
μ M	micromolar
ND-PAGE	nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis
NAG	<i>N</i> -acetylglucosamine
pI	Isoelectric point