

สรุปคดี เนาสรวาญวงศ์: การโคลนและศึกษาลักษณะสมบัติของไคตินเนสจาก *Bacillus licheniformis* RN01 และการศึกษาเปรียบเทียบกับไคตินเนสชนิดอื่น (CLONING AND CHARACTERIZATION OF CHITINASE FROM *Bacillus licheniformis* RN01 AND COMPARATIVE STUDY WITH OTHER CHITINASES) อ.ที่ปรึกษา : อ.ดร. รัฐ พิษณุางกูร

110 หน้า, ISBN 974-53-1074-4

ไคตินเนส (EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคติน *Bacillus licheniformis* RN01 ที่แยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อน จังหวัดระนอง ผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้สูงสุดในวันที่ 2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ colloidal chitin minimum medium เอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ตั้งแต่ pH 6 - 10 และเอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 - 60 °C สับสเตรตที่เอนไซม์ย่อยได้ดีที่สุดคือ PNAC (partial-N-acetylated chitin) รองลงมาคือ คอลลอยด์คัลไคติน, β -ไคติน และ powder chitin ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยคอลลอยด์คัลไคตินได้ chitobiose เป็นผลิตภัณฑ์หลัก เมื่อทำการแยกโปรตีนโดย SDS-PAGE และย้อมแอสติวิตี พบโปรตีนที่มี ไคตินเนสแอสติวิตี 3 แถบที่มีขนาดต่าง ๆ คือ 70, 65 และ 58 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อนำ genomic DNA ของ *Bacillus licheniformis* RN01 มาโคลนยีนไคตินเนสโดยวิธี PCR cloning พบว่า DNA ที่โคลนได้มีนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 1,964 นิวคลีโอไทด์ สามารถ translate ออกมาเป็นกรดอะมิโนได้ 598 กรดอะมิโน ซึ่งมีขนาดประมาณ 66,134 ดาลตัน (Da) มี isoelectric point เท่ากับ 5.17 เอนไซม์ไคตินเนสที่โคลนได้ให้ชื่อว่า ChiRN1 พบว่าเอนไซม์ที่โคลนได้ประกอบด้วยโดเมน 3 โดเมน ได้แก่ catalytic domain (CatD), fibronectin type III-like domain (FnIII D) และ chitin binding domain (ChBD) เมื่อทำการศึกษสมบัติบางประการของเอนไซม์ ChiRN1 พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ตั้งแต่ pH 6 - 10 อุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีอยู่ที่ 60 - 70 °C สับสเตรตที่เอนไซม์ย่อยได้ดีที่สุดคือ PNAC รองลงมาคือ คอลลอยด์คัลไคติน และ β -ไคติน ผลจาก SDS-PAGE และย้อมสีแอสติวิตีพบแถบโปรตีนที่มีไคตินเนสแอสติวิตี 3 แถบ มีขนาด 70, 65 และ 58 kDa เหมือนกับ *B. licheniformis* RN01 และพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคอลลอยด์คัลไคตินได้ chitobiose เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และเมื่อทำไคตินเนสลูกผสมโดยนำเอาส่วน FnIII D และ ChBD ของ ChiRN1 ไปต่อข้างหลังเอนไซม์ Chi60 ที่มี 2 โดเมน ได้แก่ N-terminal domain และ catalytic domain พบว่าเอนไซม์ลูกผสมมีกรดอะมิโนจำนวน 708 กรดอะมิโน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายคอลลอยด์คัลไคตินด้วยเอนไซม์ลูกผสมเป็น chitobiose เพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับเอนไซม์ Chi60 สรุปได้ว่า FnIII d และ ChBD ที่ต่อเพิ่มไปบนเอนไซม์ Chi60 ไม่เปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่าง monomer และ dimer ของผลิตภัณฑ์

ภาควิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต..... *สุภาวดี เกษราพิบูลย์*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *รัฐ พิษณุางกูร*

4572553123: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD : CHITINASE / *Bacillus licheniformis* RN01 / CLONING / CHARACTERIZATION /
COMPARATIVE STUDYSURAGATE NOWSRANWONGSE : CLONING AND CHARACTERIZATION OF CHITINASE
FROM *Bacillus licheniformis* RN01 AND COMPARATIVE STUDY WITH OTHER
CHITINASES. THESIS ADVISOR : RATH PICHYANGKURA, Ph. D., 110pp.
ISBN 974-53-1074-4.

Chitinases (EC 3.2.1.14), a group of glycosyl hydrolase enzymes, hydrolyze the $\beta 1 \rightarrow 4$ linkages of N-acetyl-D-glucosamine polymers of chitin. *Bacillus licheniformis* RN01, isolated from hot spring in Ranong province, produced the highest activity of chitinase on the second-day of incubation in colloidal chitin minimum medium. The enzyme can function well in pH 6 - 10, at temperature 50 - 60 °C. Substrate specificity of the enzyme varied from high to low was on PNAC (partial-N-acetylated chitin), colloidal chitin, β -chitin and powder chitin, respectively. *Bacillus licheniformis* RN01 chitinases hydrolyzed colloidal chitin and chitobiose was produced as a major product. Protein from the culture medium of *Bacillus licheniformis* RN01 was analyzed by SDS-PAGE. Chitinase activity was identified using activity staining method. Three bands of protein which possessed chitinase activity were found with molecular weight of 70, 66 and 58 kDa. PCR cloning of chitinase gene from genomic DNA of *Bacillus licheniformis* RN01 yielded an open reading frame comprising 1946 nucleotides, encoding for 598 amino acids. The predicted molecular weight was 66,134 Da and pI was 5.17. The cloned chitinase, ChiRN1, contained 3 domains, Catalytic domain (CatD), fibronectin type III-like domain (FnIIID) and chitin binding domain (ChBD). ChiRN1 had the high activity in pH 6 - 10, at temperature 60 - 70°C, and had high substrate specificity on PNAC, colloidal chitin and β -chitin. Like that of *Bacillus licheniformis* RN01, the cloned enzyme where activities lane showed three bands of chitinase activity of 70, 66 and 58 kDa. Colloidal chitin digested by ChiRN1 also produced chitobiose as a major product. Chimeric chitinase was constructed by inserting FnIIID and ChBD from ChiRN1 into Chi60. This chimeric enzyme contained 708 amino acids. Both chimeric chitinase and Chi60 hydrolyzed colloidal chitin into chitobiose as the only product. This result indicated that the FnIIID and ChBD domain may not be involved in the regulation of hydrolytic products of the enzyme.

Field of study Biochemistry

Academic year 2004

Student's signature..... Suragate Nowsranwongse
Advisor's signature..... 