Thesis Title	Cloning and Heterologous Expression of Chitinase Gene from An Endophytic Actinomycete for Antifungal Activity Improvement	
Author	Mr.Thongchai Taechowisan	
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)	
Thesis Advisory Committee	Assoc.Prof.Dr.Saisamorn Lumyong	Chairperson
	Dr.Uraporn Sardsud	Member
	Dr.Chartchai Kanongnuch	Member
	Prof.Dr.John F Peberdy	Member

ABSTRACT

The isolation of endophytic actinomycetes from surface sterilised tissues of 36 plant species was carried out using Humic acid – Vitamin (HV) agar as a selection medium. Of the 330 isolates recovered, 212 were from roots, 97 from leaves and 21 isolates from stems with a revelance of 3.93%, 1.79% and 0.39% respectively. Identification of the isolates was based on their morphology and the amino acid composition of the whole-cell extract. Most were classified as *Streptomyces* sp. (n=277), with the remainder belonging to *Microbispora* sp. (n=14), *Nocardia* sp. (n=8) and *Micromonospora* sp. (n=4). Four isolates were unclassified. *Zingiber officinale* was the most significant host for the *Streptomyces* sp. isolates with 6.44% of the tissue samples giving rise to cultures. Scanning electron microscopic investigations of this plant revealed that 7.5% of the root and 5% of the leaf samples contained endophytes. Three of the *Streptomyces* sp. isolates strongly inhibited

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Colletotrichum musae, five were very active against *Fusarium oxysporum* and two strongly inhibited growth of both test fungi.

More than 300 isolates were screened for their potential for chitinase production. The strain identified as *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 was the most effective amongst those investigated. Production of the chitinase from *S. aureofaciens* CMUAc130 was optimal with 1% colloidal chitin, at 30-40°C, pH 6.5-7.0 and 100-150 rev min^{-1} shaking. *N*-acetylglucosamine was a good inducer and the enzyme complex was repressed by several mono- and disaccharides including lactose, mannose, glucose, cellobiose, arabinose, raffinose, sucrose, xylose and fructose. Addition of pectin, starch or carboxymethyl cellulose to the colloidal chitin-containing medium, increased chitinase production. The enzyme tolerated a wide range of temperature (30-50°C) and pH (5.5-8). Among various divalent cations Hg^{2+} Cd^{2+} and Ni^{2+} completely inhibited the purified enzyme while Mg^{2+} stimulated its activity. Crude and purified enzyme had potential for cell wall lysis of many phytopathogenic fungi tested.

The gene *chi40*, which codes for chitinase, was cloned from the endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130. Its complete sequence was determined, and the deduced amino acid sequence of the enzyme designated Chi40_Sau yielded an open reading frame coding for 413 amino acids of a 40-KDa precursor protein with a putative leader peptide at its N-terminus. The nucleotide and polypeptide sequences of Chi40_Sau showed 95 and 87% identity with the corresponding gene and enzyme, Chia of *Streptomyces thermoviolaceus*, respectively. *Escherichia coli* JM109 carrying the *S. aureofaciens* CMUAc130 *chi40* gene produced a secreted Chi40_Sau. The

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

antifungal activity of the chitinase was demonstrated *in vitro* by inhibition of hyphal extension and spore germination in *Fusarium oxysporum*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การโคลนและการแสดงออกแบบเฮเทอโรโลกัสของยีนไคติเนสจากแอคติโนมัยซีสในพืชเพื่อเพิ่มฤทธิ์ต้านเชื้อรา
ผู้เขียน	นายธงชัย เตโชวิศาล
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.สายสมร ลำยอง	ประธานกรรมการ
อ.ดร.อุราภรณ์ สอาดสุด	กรรมการ
อ.ดร.ชาติชาย โขนงนุช	กรรมการ
Prof.Dr.John F Peberdy	กรรมการ

บทคัดย่อ

แยกเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืชจากส่วนต่างๆ ของพืช 36 ชนิด ด้วยวิธีฆ่าเชื้อที่ผิวตัวอย่างและเลี้ยงบนอาหาร Humic acid – Vitamine agar ได้เชื้อแอคติโนมัยซีสในพืช 330 สายพันธุ์ (จากใบ 97 สายพันธุ์ จากลำต้น 21 สายพันธุ์ และจากราก 212 สายพันธุ์) โดยความชุกในการแยกเชื้อจากใบ 1.79% จากลำต้น 0.39% และจากราก 3.93% จำแนกเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืชที่แยกได้ด้วยลักษณะสัณฐานและองค์ประกอบของกรดอะมิโนของสารสกัดจากเซลล์ พบว่าเป็น *Streptomyces* sp. 277 สายพันธุ์ *Microbispora* sp. 14 สายพันธุ์ *Nocardia* sp. 8 สายพันธุ์ *Micromonospora* sp. 4 สายพันธุ์ และไม่สามารถจำแนกได้ 4 สายพันธุ์ ความชุกในการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืชสูงที่สุด คือ 6.44% จากขิง (*Zingiber officinale*) จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเส้นใยเชื้อแอคติโนมัยซีสในพืชเทรกตัวอยู่ภายในเนื้อเยื่อของพืช ตรวจพบได้ 5.0% ของตัวอย่างใบ และ 7.5% ของตัวอย่างรากของขิง แต่ไม่พบในตัวอย่างลำต้น เชื้อแอคติโน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มัยซีสในพืชที่แยกได้ 3 สายพันธุ์ให้ผลยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Colletotrichum musae* ได้มากกว่า 2 เซนติเมตร 5 สายพันธุ์ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้มากกว่า 2 เซนติเมตร และ 2 สายพันธุ์ที่ให้ผลยับยั้งการเจริญเชื้อรา *C. musae* และ *F. oxysporum* ได้มากกว่า 2 เซนติเมตร ในอาหารแข็ง

เชื้อแอคติโนมัยซีสในพืชที่แยกได้ทั้งหมดเมื่อนำมาตรวจกรองความสามารถในการสร้างเอ็นไซม์ไคติเนส พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีส CMUAc130 ที่ศึกษาเทียบเคียงโดยอาศัยสัณฐานวิทยาองค์ประกอบของผนังเซลล์ และลำดับกรดนิวคลีอิกของยีน 16SrRNA ว่าเป็น *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 สามารถสร้างเอ็นไซม์ไคติเนสสูงสุด จึงนำ *S. aureofaciens* CMUAc130 มาศึกษาการสร้างเอ็นไซม์ไคติเนสในสภาวะต่างๆ และการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราบางชนิด *S. aureofaciens* CMUAc130 สามารถสร้างเอ็นไซม์ไคติเนสได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ โดยมีคอลลอยคอลไคติน 1% pH ระหว่าง 6.5-7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30-40°C เขย่าด้วยความเร็ว 100-150 รอบต่อนาที สร้างเอ็นไซม์ไคติเนสได้มากที่สุดในช่วง วันที่ 7-10 ของการบ่มเลี้ยงเชื้อ การเติม *N*-acetylglucosamine 0.5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคอลลอยคอลไคติน 1% เร่งการสร้างเอ็นไซม์ไคติเนส ขณะที่การเติมน้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น lactose, mannose, glucose, cellobiose, arabinose, raffinose, sucrose, xylose และ fructose ในความเข้มข้น 0.5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลยับยั้งการสร้างเอ็นไซม์ไคติเนส การเติม pectin, starch และ carboxymethyl cellulose 0.3% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคอลลอยคอลไคติน 1% ทำให้การสร้างเอ็นไซม์ไคติเนสมากขึ้น เอ็นไซม์ไคติเนสมีความทนทานในการย่อยสลายคอลลอยคอลไคติน ในช่วงอุณหภูมิ 30-50°C และ pH 5.5-8 Hg^{2+}, Cd^{2+} และ Ni^{2+} ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ไคติเนส ขณะที่ Mg^{2+} และ β-mercaptoethanol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่งเสริมการทำงานของเอ็นไซม์ไคติเนสให้ดีขึ้น เอ็นไซม์ไคติเนสทั้งหยาบและบริสุทธิ์มีความคุณสมบัติย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิด

ยีนควบคุมการสร้างเอ็นไซม์ไคติเนสชนิด *Chi40* ถูกโคลนจาก *S. aureofaciens* CMUAc130 โดยวิธี PCR cloning และทำการวิเคราะห์ยีนที่โคลนได้โดยแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโน แล้วให้ชื่อว่า Chi40_Sau ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 413 หน่วย น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40-KDa จากการวิเคราะห์ลำดับกรดนิวคลีอิก และลำดับกรดอะมิโนของยีนนี้ พบว่ามีความคล้ายกับยีน *ChiA* จาก *Streptomyces thermoviolaceus* ถึง 95% และ 87% ตามลำดับ ยีนที่โคลนได้นี้ถูกชักนำให้แสดงออกใน *E. coli* JM109 และสามารถตรวจสอบการแสดงออกโดยวิธี Western Blot เอ็นไซม์ไคติเนสที่สร้างจาก *E. coli* JM109/pChi40_Sau มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยยับยั้งการเจริญของเส้นใย ยับยั้งการงอกของสปอร์ และย่อยสลายผนังเซลล์ของ *F. oxysporum*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved