

CHITINOLYTIC ENZYMES OF *Bacillus licheniformis* ;
PARTIAL PURIFICATION , CHARACTERIZATION
AND MOSQUITO LARVICIDAL PROPERTY

NIRAT PHOLPHANA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright by Mahidol University

TH
N719 C
1996

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยกและศึกษาเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโคคิน จาก <i>Bacillus licheniformis</i> และความสามารถในการ ฆ่าลูกน้ำยุงของเอนไซม์
ผู้วิจัย	นิรติ ผลพนา
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา, Ph.D. อมเรศ ภูมิรัตน์, Ph.D. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr. Eng.
วันสำเร็จการศึกษา	26 มกราคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการสามารถผลิตเอนไซม์โคคินเนสได้เป็นจำนวนมากเมื่อแบคทีเรียชนิดนี้ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคคิน เป็นส่วนผสมเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วง stationary phase โดยที่เอนไซม์โคคินเนสที่ผลิตได้มีอยู่อย่างน้อย 5 ชนิดและมีขนาด 70.8, 68.1, 63.7, 53.0 และ 49.5 kDa เอนไซม์ขนาด 70.8 kDa ถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี fractionation ของส่วนน้ำเพาะเชื้อของแบคทีเรียชนิดนี้ด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต ช่วง 35-65 เปอร์เซ็นต์ และ column chromatography ด้วย CM- และ DEAE-sephadex matrix ตามลำดับ จากนั้นจึงมีการศึกษาคุณสมบัติ physicochemical ในด้านต่างๆ พบว่า เอนไซม์มี optimal temperature ที่ 60°C และ activity ก่อนข้างกทน เมื่อเก็บที่ 40-50°C และพบว่า activity ของเอนไซม์จะลดลงอย่างมากเมื่อเอนไซม์อยู่ในสารละลายที่มีภาวะเป็นกรด, ค่าง หรือ อุณหภูมิสูง ($\geq 70^\circ\text{C}$), activity จะคงทนมากเมื่อเอนไซม์ถูกเก็บอยู่ในน้ำกลั่น จากการศึกษา enzyme kinetics ได้ค่า Michaelis's constant และ maximum velocity (V_m) ของเอนไซม์ชนิดนี้มีค่า

3.33 เปอร์เซ็นต์ และ 781.90 mU/ml/mg ตามลำดับ จากการทดสอบความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุง *Aedes aegypti* ของ crude fraction ของเอนไซม์โคตินเนสซึ่งเตรียมโดยวิธี fractionation ด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต ช่วง 35-65 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์โคตินเนส ขนาด 70.8 kDa ที่บริสุทธิ์ ได้ค่า LC_{50} ของ crude fraction มีค่าเท่ากับ 60.67 mU/ml และพบการเสริมประสิทธิภาพในการฆ่าลูกน้ำยุง *Aedes aegypti* เมื่อมีการทดสอบ crude fraction นี้ร่วมกับ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* สายพันธุ์ 4Q2-72 และ crude fraction จะสูญเสียคุณสมบัติในการฆ่าลูกน้ำยุงถ้าถูกต้มที่ $100^{\circ}C$ เป็นเวลา 10 นาที และจากการศึกษาผลของเอนไซม์โคตินเนสขนาด 70.8 kDa ที่บริสุทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง *Aedes aegypti* พบว่า ค่า LC_{50} ของเอนไซม์ชนิดนี้มีค่าเท่ากับ 66.67 mU/ml

Thesis Title Chitinolytic Enzymes of *Bacillus licheniformis* ;
Partial Purification, Characterization and Mosquito
Larvicidal Property

Name Nirat Pholphana

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Somsak Pantuwatana, Ph.D.
Amaret Bhumiratana, Ph.D.
Watanalai Panbangred, Dr. Eng.

Date of Graduation 26 January B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

The *Bacillus licheniformis*, isolated by our laboratory, produced chitinolytic enzymes when cells grown in medium supplemented with crude chitin entered the stationary phase. This *Bacillus licheniformis* strain produced at least 5 types of chitinolytic enzymes and their molecular weights were 70.8, 68.1, 63.7, 53.0, and 49.5 kDa. The chitinolytic enzyme from culture supernatant of cells grown in medium supplemented with chitin was purified by fractionation with ammonium sulfate ranges from 35-65 percent and passed through column chromatography with CM- and 2 columns of DEAE-sephadex matrix respectively. The pure fraction of chitinase with molecular weight of 70.8 kDa was obtained. Results of physicochemical properties of purified enzyme showed optimal temperature of 60°C, relatively stable when kept at 40 and 50°C with

optimal pH of 5.0. Its activity was rapidly lost when kept in strong acid, strong alkali or high temperature ($\geq 70^{\circ}\text{C}$), but very stable in deionized distilled water. Enzyme kinetics study showed that Michaelis's constant (K_m) and maximum velocity (V_m) value were 3.33 % (w/v) and 781.90 mU/ml/mg of enzyme, respectively. Crude fraction and purified 70.8 kDa chitinolytic enzyme were assayed for toxicity against mosquito larvae. The LC_{50} of crude chitinolytic enzymes against 2nd instar of *Aedes aegypti* larvae was 60.67 mU/ml. These enzymes enhanced toxicity effect when assayed against mosquito larvae in combination with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strain 4Q2-72. The crude enzyme fraction alone was completely lost its larvicidal property upon heating at 100°C for 10 min. The LC_{50} of purified 70.8 kDa chitinolytic enzyme against 2nd instar of *Aedes aegypti* larvae was equal to 66.67 mU/ml.