

Project Code: PDF23/2541

Project Title: Cloning and sequencing of chitin deacetylase

Investigators: Dr. Srisurang Tantimavanich, Faculty of Medical Technology, Mahidol University
Dr. Watanalai Panbangred, Faculty of Science, Mahidol University

Email Address: mtstm@mahidol.ac.th

Project Period: 1 July 1999-24 December 2001

Objectives: 1. To search for chitin deacetylase producers
2. To clone and sequence chitin deacetylase gene
3. To characterize the cloned chitin deacetylase gene

Abstract

Rhizopus oryzae F11 was relatively most active in deacetylation of chitin when compared to other 11 fungal and 1 bacterial chitin deacetylase (CDA) producing strains. The CDA from F11 was designed as CDA-TP11. The optimum pH was 6-8 and optimum temperature was 55°C. The chitin deacetylase gene (*cda-TP11*) from the strain F11 was cloned by RT-PCR using 2 pairs of degenerated primers. Based on partial cDNA sequence, gene specific primers (GSPs) and antisense GSPs were synthesized and used as primers to amplify 5' and 3' ends of cDNA using RACE method. The *cda-TP11* from *R. oryzae* F11 has an open reading frame (ORF) of 1,341 bp and showed high homology to that of *M. rouxii*. The ORF of *cda-TP11* encoded for a polypeptide of 446 amino acid residues with calculated molecular mass of 49.1 kDa. The deduced molecular mass was different from that of two CDA activity bands estimated by SDS-PAGE which were 68 and 25 kDa. The difference in molecular mass might be due to post translational glycosylation or proteolytic processing to obtain larger (68 kDa) and smaller (25 kDa) activity bands, respectively.

บทคัดย่อ

Rhizopus oryzae F11 เป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์เพื่อ deacetylate chitin ได้ดี เมื่อเทียบกับเชื้อรา 11 สายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ chitin deacetylase (CDA) ในที่นี้ให้ชื่อเอนไซม์ CDA จากสายพันธุ์ F11 ว่า CDA-TP11 เอนไซม์ CDA-TP11 มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานที่ pH 6-8 และ 50° ซ ได้ทำการโคลนยีน *cda-TP11* ด้วยวิธี RT-PCR และใช้ degenerated primers 2 คู่ นำ RT-PCR products ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และใช้ลำดับนิวคลีโอ