LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

25 JAN 1994

CHEMICAL MODIFICATION ON *BACILLUS* PENICILLIN ACYLASE

PARICHART SITHISARN

อภินันทนาการ
จาก
"สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย"

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1993

Copyright by Mahidol University

25117

ชื่อวิทยานิพนธ์ การใช้ขบวนการทางเคมีเพื่อปรับปรุงเอน-ไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส

ผู้วิจัย บาริชาติ สิทธิสาร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

วิทยา มีวุฒิสม Ph.D.
ไสยวิชญ์ วรวินิต Ph.D.
อรรถวุฒิ อิ่มพูลทรัพย์ Ph.D.

วันสำเร็จการศึกษา 18 ตุลาคม พ.ศ. 2536

บทคัดย่อ

เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จาก *Bacillus subtilis* pBA 401 ถูกเลือกมาใช้ทำการศึกษาโดยการใช้ขบวนการทางเคมี สารเคมีหลายชนิดถูกเลือกมาใช้ โดยคำนึงถึงการทำปฏิกริยาเฉพาะกับกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เช่น ไลซีน ฮิสติดีน เมทไทโอนีน กลุ่มคาร์บอกซี่ของกรดอะมิโน ผลการทดลองแสดงว่าเฉพาะการใช้เมทธิลอะเซติมิเดต และ โอเมทธิลไอโซยูเรีย ซึ่งมีผลต่อแอบซีลอนอะมิโน ของ กรดอะมิโนไลซีน เท่านั้น ที่ยังคงความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรต จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์หลังทำปฏิกริยากับเมทธิลอะเซติมิเดต มีค่า Km เท่ากับเอนไซม์ก่อนทำปฏิกริยา ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์หลังทำปฏิกิริยากับโอเมทธิลไอโซยูเรีย มีค่า Km สูงกว่าเอนไซม์ก่อนทำปฏิกริยา 2 เท่า จึงเป็นไปได้ว่าโอเมทธิลไอโซยูเรียทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณที่จับกับสับสเตรต เอนไซม์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งสองมีค่า Vmax ที่เท่ากัน แต่น้อยกว่าเอนไซม์ก่อนการทำปฏิกริยา 2 เท่า จึงเป็นไปได้ที่การเปลี่ยนแปลงบริเวณคะตะไลติกของเอนไซม์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งสองเป็นอย่างเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า 6 APA แสดงความเป็นคอมเพททิทิฟ แทนที่จะเป็นนอนคอมเพททิทิฟเช่นในเอนไซม์ก่อนทำปฏิกริยา การทนต่อความร้อนที่ดีขึ้นของเอนไซม์ หลังการทำปฏิกริยากับเมทธิลอะเซติมิเดต อาจจะเป็นประโยชน์ต่อวงการอุตสาหกรรม อย่างไรก็ดีการศึกษาเพิ่มเติมก็เป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อความเข้าใจในความเกี่ยวเนื่องระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์และการทนต่อความร้อนของเอนไซม์

Copyright by Chulalongkorn University

Thesis Title: Chemical Modification of *Bacillus* Penicillin Acylase

Name: Parichart Sithisarn

Degree: Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Vithaya Meevootisom, Ph.D.
Saiyavit Varavinit, Ph.D.
Attawut Impoolsup, Ph.D.

Date of Graduation: 18 October B.E. 2536 (1993)

ABSTRACT

Extracellular penicillin acylase from *Bacillus subtilis* pBA 401 was studied using chemical modification to modify the enzyme molecules. Many reagents were chosen based on their specific reaction on certain amino acids such as lysine, histidine, methionine and those with carboxyl groups. The results showed that only methylacetimidate and o-methylisourea which reacted with ϵ-amino group of lysine modified the enzymes still retained their enzymatic activity. Results with kinetic studies showed that methylacetimidate modified enzyme had the Km similar to that of the native one. O-methylisourea on the other hand, had 2 times

Copyright by Mahidol University

higher value of Km than that of the native penicillin acylase. The result implied that only o-methylisourea modified the enzyme molecule in such a way that there were some changes of the substrate binding site. Vmax of both modified enzymes were similar and about 2 times less than that of the native one.

It was possible that any changes occured for both modified enzymes regarding their catalytic sites were the same. The kinetic data of both modified enzymes with 6-APA showed that the substance acted as a competitive inhibitor instead of a non-competitive inhibitor as done with the native penicillin acylase. Higher thermostability seen with the methylacetimidate modified enzyme might be useful for industrial uses. Further studies need to be continued in order to understand the relationship between components of the enzyme molecule and the increase in enzyme stability.

Copyright by Mahidol University