LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

28 MAR 1990

Genetic manipulation of penicillin acylase in *Bacillus* sp.

BY

SUANG UDOMVARAPHUNT

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

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN THE
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
OF
MAHIDOL UNIVERSITY
1989

Copyright by Mahidol University

13900

ชื่อวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลลินเอซิเลส ในจุลินทรีย์ Bacillus sp. โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรม
ผู้วิจัย สรวง อุดมวรภัณฑ์
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์
วิทยา มีวุฒิสม Ph.D.
ทิมโมที เฟลเกล Ph.D.
อมเรศ ภูมิรัตน Ph.D.
สกล พันธุ์ยิ้ม Ph.D.
วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา 9 ธันวาคม พ.ศ. 2531 (ค.ศ. 1988)

บทคัดย่อ

จากการศึกษาโดยเทคนิค transposition inactivation พบว่า ยีนส์ที่สร้างเอนไซม์เพนนิซิลลินเอซิเลส ซึ่งแยกได้จากจากจุลินทรีย์ Bacillus megaterium และได้ถูกโคลนอยู่บน plasmid pMLV101 มีขนาด ประมาณ 2.7 - 3.1 Kb เมื่อทำการตัด plasmid pMLV101 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด HpaII แบบไม่สมบูรณ์ จะได้ชิ้นส่วน DNA ขนาดประมาณ 2.8 Kb ซึ่งให้ชื่อว่า F1 พบว่า F1 นี้มี PAC gene อยู่ครบ เมื่อทำการ subclone ชิ้นส่วน F1 นี้กับ plasmid พาหะ pACYC184 จะได้ plasmid ลูกผสม pBA2, pBA3, pBA4

Copyright by Mahidol University

และ pBA32. เมื่อนำ plasmid ลูกผสมนี้เข้าสู่จุลินทรีย์ Escherichia coli พบว่า E. coli ที่ได้รับ plasmid ลูกผสมเหล่านี้ สามารถสร้างเอนไซม์เพนนิ-ซิลลินเอซิเลส ในการศึกษา ได้สร้าง Plasmid pHBA33 ซึ่งเกิดจากการเชื่อมต่อชิ้นส่วน DNA F1 เข้ากับ shuttle vector pHV33-2 ที่สามารถเพิ่มจำนวนในจุลินทรีย์ E. coli และ B. subtilis ได้. พบว่าทั้งจุลินทรีย์ E. coli และ B. subtilis ที่ได้รับ plasmid pHBA33 จะสร้างเอนไซม์เพนนิซิลลินเอซิเลสได้. โดยที่ E. coli จะสร้างเอนไซม์แบบ intracellular แต่ B. subtilis จะสร้างเอนไซม์แบบ extracellular เช่นเดียวกับ B. megaterium. Subclone E. coli ทั้งหมด (pBA2, pBA3, pBA4, pBA32 และ pHBA33) ให้ปริมาณเอนไซม์ activity ใกล้เคียงกับ activity ของ E. coli ที่รับ plasmid pMLV101 แต่ B. subtilis ที่รับ plasmid pHBA33 จะให้เพนนิซิลลินเอซิเลส activity ต่ำกว่า activity ของเชื้อ B. megaterium UN-1 เล็กน้อย.

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Genetic Manipulation of Penicillin Acylase in *Bacillus sp.*

Name Suang Udomvaraphunt

Degree Master of Science (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Vithaya Meevootisom, Ph.D.

Timothy William Flegel, Ph.D.

Amaret Bhumiratana, Ph.D.

Sakol Panyim, Ph.D.

Watanalai Panbangred, Ph.D.

Date of Graduation December 9, 1988

ABSTRACT

Localization of the *Bacillus megaterium* penicillin acylase (PAC) gene on plasmid pMLV101 was done by using the transposition inactivation technique. The PAC gene was found to be about 2.8 - 3.1 Kb in length. Partial digestion of pMLV101 with restriction enzyme HpaII produce a DNA fragment (F1) of about 2.8 Kb in size. The F1 DNA was found to contain the PAC gene. Ligation product of F1 and the plasmid vector pACYC184 (pBA2, pBA3, pBA4 and pBA32) made the *Escherichia coli (E. coli)* transformants produced PAC enzyme. The recombinant plasmid of F1 and the shuttle vector pHV33-2, pHBA33, also conferred both *E. coli*

Copyright by Mahidol University

and *B. subtilis* host cells to produce PAC. All *E. coli* subclones (pBA2, pBA3, pBA4, pBA32 and pHBA33) produced PAC at about the same level of enzyme activity as *E. coli* which carried the plasmid pMLV101. The recombinant *B. subtilis* which carried plasmid pHBA33 produced PAC extracellularly, but, its activity was slightly lower than that of *B. megaterium* UN-1.

Copyright by Mahidol University