LIBRARY AND INFOR
MAHIDOL UNIV
- 5 SEP 1996

MOLECULAR STUDIES OF GENES ENCODING FOR ENZYMES CAPABLE OF HYDROLYZING CEPHALOSPORIN C AND LIPID

BENJAMAS THANOMSUB

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MICROBIOLOGY)

With compliments
of
.....

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

TH
B468m
1996

36131

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาระดับโมเลกุลของยีนที่สร้างเอนไซม์สำหรับย่อยเซฟาโลสปอริน ซี และไขมัน
ผู้วิจัย	เบญจมาส ถนอมทรัพย์
ปริญญา	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D.
	ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D.
	วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด D. Eng.
วันที่สำเร็จการศึกษา	29 เมษายน พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

เซฟาโลสปอริน ซี สามารถจะถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ เอสเทอเรส ได้เป็นดีอะเซทิล เซฟาโลสปอริน ซี ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิตสาร เซฟาโลสปอรินกึ่งสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนแปลงอนุพันธ์ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เชื้อ *Bacillus subtilis* WRRL-B558 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่มีความสามารถนี้ได้สูง (Abbot และ Fukuda, 1975) และได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* WRRL-B558 ได้ถูกโคลน และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1560 เบสของบริเวณ *Hin*dIII และ *Sal*I ซึ่งเป็นบริเวณที่กำหนดการสร้างเอนไซม์นี้ พบว่ามียีน 2 ยีนปรากฏอยู่ติดกันแต่ในทิศทางการแสดงออกของยีนตรงข้ามกันยีนทั้งสองจะมีลักษณะเฉพาะของ conserved sequences ของโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่ง-35 และ -10 และ ribosome binding site รวมทั้ง transcription terminator ซึ่งมีลักษณะเป็น inverted repeats ของนิวคลีโอไทด์อยู่หลังรหัสหยุด TAA ในยีนที่ 1 สามารถกำหนดการสร้างเอนไซม์ที่ประกอบด้วย 120 กรดอะมิโน และมีน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 13,101 ส่วนยีนที่ 2 สามารถกำหนดการสร้างเอนไซม์ที่ประกอบด้วย 212 กรด อะมิโน และมีน้ำหนัก

Copyright by Mahidol University

โมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 22692 จากการศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่สร้างโดยยีนที่ 1 และ 2 โดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามี protein ขนาดเล็กประมาณ 14 kDa

จากการเปรียบเทียบ DNA homology ของยีนที่ศึกษาอยู่กับยีนอื่นที่บรรจุใน GenBank Database พบว่า ยีนที่ 1 มี 95% homology กับบางส่วนของ artificial lipase sequence ของ *Geotrichum candidum* ส่วนยีนที่ 2 แสดง 95% homology กับ *B. subtilis* 168 lipase gene และ 97% homology กับ *G. candidum* artificial lipase gene ยีนทั้งสองนี้ได้ถูก subclone เข้าใน pTTQ18 vector ซึ่งมี strong promotor คือ ptac และพบว่าในยีนที่ 1 สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงขึ้นประมาณ 7.6 เท่า ถ้าไม่มีการใช้ IPTG inducer หรือเพิ่มขึ้น 38 เท่า ถ้าใช้ IPTG inducer ร่วมด้วย จากการวิเคราะห์คุณสมบัติด้านความจำเพาะกับ substrates ต่าง ๆ พบว่ายีนทั้งสองสร้างเอนไซม์เป็นชนิด lipase enzyme ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นเอสเทอเรสได้ด้วย และสามารถย่อยเซฟาโลสปอริน ซี ได้ ดีอะเซทิล เซฟาโลสปอริน ซี ด้วย นอกจากนี้จากการศึกษา inhibitors ที่อาจมีผลต่อการทำงานของ enzyme ทั้งสองพบว่า PMSF ที่เป็น inhibitor ต่อ serine enzyme สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองตัวนี้ได้ แต่ sulfhydryl agents เช่น β-mercaptoethanol ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยการผ่าน Sephadex G-200 column gel filtration พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เพราะได้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียง 2 เท่าใน peak ที่ดีที่สุด (pTL7-peak 3) แต่ได้เกิดความสูญเสียของเอนไซม์ไปสูงด้วย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติ hydrophobicity สูง ไม่เหมาะที่จะใช้ Sephadex G-200 gel filtration ในการแยก

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Molecular Studies of Genes Encoding for Enzymes Capable of Hydrolyzing Cephalosporin C and Lipid. .

Name Benjamas Thanomsub

Degree Doctor of Philosophy (Microbiology)

Thesis Supervisory Committee

Vithaya Meevootisom, Ph.D.

Chuenchit Boonchird, Ph.D.

Watanalai Panbangred, D.Eng.

Date of Graduation 29 April B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

Cephalosporin C can be hydrolyzed by an esterase resulting in formation of deacetylcephalosporin C, a key intermediate, by which substitution at C3' side chain produce potentially useful semisynthetic cephalosporins. *B. subtilis* WRRL-B558 was known to be a high producer of cephalosporin acetylesterase (Abbot and Fukuda, 1975). Genes from *B. subtilis* WRRL-B558 encoding for the enzymes was cloned and sequenced. DNA sequence of 1560bp from *Hin*dIII-*Sal*I region showed 2 ORFs (ORF1 and ORF2) located adjacent to each other in reverse orientation. Their nucleotide sequences were consisted of -35 and -10 promoter conserved sequence; putative ribosome binding site and 11-12 bp inverted repeats, and a Rho independent transcription terminator located, after the TAA stop codon. ORF1 encodes for a deduced protein of 120 amino acids and ORF2 for 212 amino acids with MW of 13, 23 kDa, respectively. This was in agreement with MW of the enzymes determined by SDS-PAGE to be around 14 kDa. DNA homology revealed 95% homology of ORF1 to part of *Geotrichum candidum* artificial lipase

sequence. ORF2 showed 95% with homology that of *B. subtilis* 168 lipase gene and 97% homology with *Geotrichum candidum* artificial lipase gene. The genes from both ORFs were subcloned into pTTQ18 vector which contains the ptac strong promotor. The subclone of ORF1 was found to have higher lipase activity around 7.6 times (uninduced with IPTG) and 38 times (induced with IPTG), than that of the original recombinant clones. Studies on substrate specificity of the two enzymes showed that they were of the lipase type that were able to act as esterase and able to hydrolyse cephalosporin C to form deacetylcephalosporin C. The enzymes were found to be sensitive to PMSF, a serine inhibitor but resistant to β-mercaptoethanol, a sulfhydryl agent. The enzymes produced from subclones were partially purified using Sephadex G-200 gel filtration. The purification process was found to be rather unsuccessful because the best pooled peak (pTL7-peak 3) showed only 2 times increase in purity of the enzyme while low percent recovery was achieved. The failure could be attributed to the strong hydrophobic nature of both enzymes.

Copyright by Mahidol University