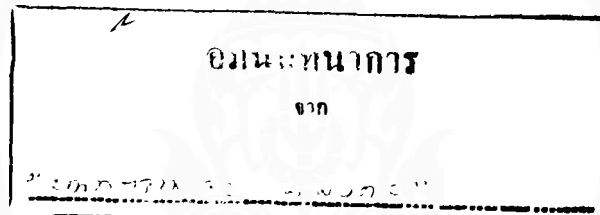




23 AUG 1994

CHARACTERIZATION OF PENICILLIN G ACYLASE FROM
BACILLUS SUBTILIS (pBA 401)

ARUNSRI SRITANAITIPOL



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

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
OF
MAHIDOL UNIVERSITY
1994

Copyright by Mahidol University

27356

อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามทั้ง PAI และ PAII จะสูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วหลังจาก incubate เอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีก่อนการวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา จากการหาค่าคงที่ของมิเคลิส (K_m) พบว่าเมื่อใช้เพนนิซิลลิน จี เป็นสับสเตรท ค่า K_m ของ PAI และ PAII จะมีค่าต่างกันอย่างชัดเจนคือมีค่าเป็น 7.232 และ 0.69 mM ตามลำดับแต่เมื่อใช้ 6-nitro-3-phenylacetamido benzoic acid (NIPAB) เป็นสับสเตรทค่า K_m ของ PAI และ PAII จะมีค่าเท่ากับ 0.298 และ 0.308 mM ตามลำดับ จากการศึกษาผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของ PAI และ PAII พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (0.2-5 mM) แอมโมเนียมซัลเฟตไม่มีผลต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไม่ว่าจะ incubate เอนไซม์กับแอมโมเนียมซัลเฟตก่อนการวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาหรือไม่ก็ตามในขณะที่ที่ความเข้มข้นสูง (30-320 mM) แอมโมเนียมซัลเฟตสามารถเพิ่มความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของ PAI และ PAII คือเพิ่มประมาณ 1.6 เท่า เมื่อเอนไซม์ถูก incubate กับแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 260mM ก่อนการวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาแต่ในกรณีที่ไม่มีการ incubate เอนไซม์กับแอมโมเนียมซัลเฟต (260 mM) ก่อนการวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นได้เพียงเล็กน้อยประมาณ 1.2 เท่า นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของโปแคสเซียมโบรไมด์ต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา ผลปรากฏว่าโปแคสเซียมโบรไมด์ไม่มีผลต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไม่ว่าในกรณีใดก็ตาม

เมื่อได้ทดลองเลี้ยงเชื้อในเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 24 ชั่วโมงถึง 72 ชั่วโมง และนำเอนไซม์ที่สกัดจาก medium ที่เลี้ยงเชื้อในเวลาต่างๆมาวิเคราะห์โดย FPLC โดยใช้คอลัมน์ Mono Q พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *B.subtilis* (pBA401) เป็นเวลา 24 และ 36 ชั่วโมง จะมีเพียง 1 peak เท่านั้น แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าจะมีเอนไซม์ 2 peak ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ Mono Q ถ้าเลี้ยงเชื่อนานถึง 72 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์จะเหลือเพียง 1 peak ซึ่งตรงกับเอนไซม์ peak แรก

range of 7-9. PAI was stable at pH range from 6.5-11.5 whereas PAII was stable at pH range from 6.5-10. In studying heat stability, PAI and PAII were stable upto 45 °C, both peaks rapidly lost activities at temperature above 55 °C. The Michaelis-Menten constant (K_m) of PAI and PAII for penicillin G were found to be 7.232 and 0.69 mM, respectively. The K_m value for 6-nitro-3-phenylacetamido benzoic acid (NIPAB) of PAI and PAII were 0.268 and 0.308 mM, respectively. When the effect of ammonium sulfate on enzyme activity was studied, it was found that 0.2-5 mM ammonium sulfate had no significant effect on activities of PAI and PAII, both with and without preincubation of the enzyme with ammonium sulfate prior to the assay. However, activities of PAI and PAII increased about 1.6 time when They were preincubated with 260 mM ammonium sulfate prior to the assay. About 1.2 fold increase in activities of PAI and PAII were observed when 260 mM ammonium sulfate were added to the assay mixture without preincubation. It was found that 0.2-5 mM potassium bromide had no significant effect on enzyme activity, both with and without preincubation of potassium bromide with the enzyme prior to the assay.

The results from time course study showed that only one peak of penicillin G acylase was obtained when *B.subtilis* was cultured for 24 h and 36 h while two peaks of enzyme were obtained from 48 h culture. However, enzyme at 72 h-culture showed only peak corresponded to PAI.