

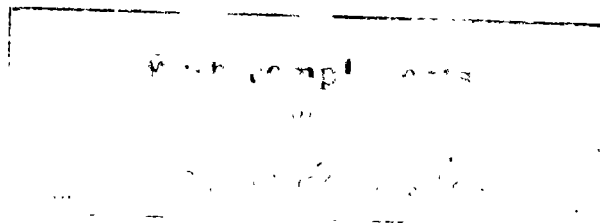
- 5 SEP 1996

**CONDITIONS FOR HIGH PRODUCTION OF PENICILLIN ACYLASE
AND THEIR EFFECTS ON VIABILITY OF ITS PRODUCER,
*ESCHERICHIA COLI***

NONGLUKSNA SRIUBOLMAS

๙

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



Copyright © Mahidol University
FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1996

TH
N812 c
1996

36083

เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที และเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง พบว่า specific activity (หน่วย/มิลลิกรัมของโปรตีน) ของเอนไซม์ที่สร้างโดยเชื้อที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะนี้มีค่าสูงกว่า specific activity ของเอนไซม์ที่สร้างโดยเชื้อที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกันแต่ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำถึง 44 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างเอนไซม์ปริมาณสูงมีผลเพิ่มสภาพให้ซึมได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ คือ เพิ่มความไวของเชื้อต่อ SDS และ เป็นผลให้มีเอนไซม์ออกมาสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ จากการวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดของเซลล์โดย SDS-PAGE และ immunoblotting พบว่าการตัดพอลิเปปไทด์ต้นแบบเพื่อสร้างเป็นเอนไซม์เพนนิซิลลินจีเอซีเลส เป็นขั้นตอนที่สำคัญ และมีผลทำให้ปริมาณของเอนไซม์ที่สร้างลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูง ใช้ความเร็วรอบในการเขย่าสูง และ/หรือ เหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสูง นอกจากนี้จะมีการสร้างเอนไซม์ในปริมาณต่ำแล้ว ยังพบว่ามีพอลิเปปไทด์ต้นแบบของเพนนิซิลลินจีเอซีเลสสะสมในปริมาณสูง ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเซลล์ที่เจริญภายใต้สภาวะเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 20 และ 25 °ซ หรือของเซลล์ที่เจริญภายใต้สภาวะเหนี่ยวนำด้วย IPTG ความเข้มข้นสูง ที่ อุณหภูมิ 25 °ซ แสดงให้เห็นว่ามี inclusion bodies อยู่ภายในเพริพลาซึมและ/หรือในไซโทพลาซึม จากการศึกษา inclusion bodies เหล่านี้ด้วยวิธี immunoblotting พบว่า inclusion bodies ที่อยู่ภายในเพริพลาซึม และที่อยู่ภายในไซโทพลาซึมเป็น โพรเอนไซม์ (พอลิเปปไทด์ต้นแบบที่ไม่มีซิกแนลเพปไทด์) และพรีโพรเอนไซม์ (พอลิเปปไทด์ต้นแบบที่มีซิกแนลเพปไทด์) ตามลำดับ ผลของการศึกษานี้บ่งชี้ว่าเมื่อมีการเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ในปริมาณสูงจะมีการสะสมพอลิเปปไทด์ต้นแบบในปริมาณสูงด้วย และนำไปสู่การสร้าง inclusion bodies ทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญลดลงหรือตาย โดยพบลักษณะของเซลล์ที่ตายหรือเปลี่ยนไปเมื่อทำการข้อมสีเซลล์ด้วยวิธีแกรม นอกจากนี้ยังพบด้วยว่ามีการ

กลายพันธุ์ของเชื้อ ทำให้ไม่สร้างเอนไซม์เพนนิซิลินจีเอสเลส การพบ inclusion bodies ภายในไซโทพลาซึมและพบว่าเป็นพรีโพรเอนไซม์ของเพนนิซิลินจีเอสเลส แสดงว่า translocation ของเพนนิซิลินจีเอสเลสผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เป็นกระบวนการ post-translational

การศึกษาพลาสมิด pDEA11 ซึ่งถูกสร้างจากพลาสมิด pQEA11 โดยที่บางส่วนของ β -subunit gene ถูกตัดออกไป พบว่าเชื้อที่มีพลาสมิดนี้สร้างพอลิเพปไทด์ต้นแบบที่ไม่สมบูรณ์และไม่มีการตัดของสายพอลิเพปไทด์ต้นแบบเพื่อสร้างเอนไซม์เพนนิซิลินจีเอสเลส การสะสมของพอลิเพปไทด์ต้นแบบที่ไม่สมบูรณ์นี้ก็ก่อให้เกิดการสร้าง inclusion bodies ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ภายในไซโทพลาซึม การค้นพบนี้แสดงว่า β -subunit ที่สมบูรณ์เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการตัดของสายพอลิเพปไทด์ต้นแบบเพื่อสร้างเอนไซม์เพนนิซิลินจีเอสเลส และจำเป็นสำหรับ translocation ของพอลิเพปไทด์ต้นแบบไปยังเพริพลาซึม นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Escherichia coli* DH5 α pDEA11 ที่เจริญภายใต้สภาวะเหนี่ยวนำและที่อุณหภูมิ 20-37 °C นั้น ส่วนมากจะตายโดย growth curves จะมี lag periods ที่นานมากเมื่อเปรียบเทียบกับ growth curves ของเชื้อที่เจริญภายใต้สภาวะที่ไม่ได้เหนี่ยวนำ ลักษณะเช่นนี้เหมือนกับการเจริญของ *Escherichia coli* DH5 α pQEA11 ที่เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเหนี่ยวนำที่อุณหภูมิ 37 °C ผลจากการศึกษานี้แสดงว่าการสร้างพอลิเพปไทด์ต้นแบบที่ไม่สมบูรณ์ในปริมาณมากก่อให้เกิด inclusion bodies และเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตาย ซึ่งเกิดขึ้นในลักษณะเดียวกันกับการสร้างเพนนิซิลินจีเอสเลสในปริมาณที่มากเกินไป ทำให้เป็นอันตรายต่อเชื้อโดยทำให้เชื้อเจริญช้าและตาย ดังสมมุติฐานข้างต้น

Thesis Title	Conditions for High Production of Penicillin Acylase and Their Effects on Viability of Its Producer, <i>Escherichia coli</i>
Name	Nongluksna Sriubolmas
Degree	Doctor of Philosophy (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee	Vithaya Meevootisom, Ph.D. Amaret Bhumiratana, Ph.D. Watanalai Panbangred, D.Eng. Bhinyo Panijpan, Ph.D.
Date of Graduation	10 May B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

Penicillin G acylase (PGA) from *Escherichia coli* is commonly used to catalyze hydrolysis of the amide bond in a penicillin molecule producing 6-aminopenicillanic acid, the key intermediate for synthesis of semisynthetic penicillins, and a corresponding side chain acid. Because of the high industrial value of PGA, plasmid pQEA11, a high copy number plasmid containing *pga* gene under the control of *tac* promoter and *lacI^q* previously constructed was used in this study. Studies on growth conditions for obtaining the maximum level of enzyme production have not been done. Moreover, it was found that the recombinant *E. coli* cells grew poorly under the IPTG induced condition. By varying growth temperatures, aeration (shaking velocities) and concentrations of IPTG, it was found that the optimum growth condition

for *E. coli* DH5 α pQEA11 to produce maximum level of PGA was to grow the organism in L broth containing chloramphenicol (15 $\mu\text{g/ml}$) at 20 $^{\circ}\text{C}$, 120 rpm and with 0.1 mM IPTG induction for 72 h. The specific activity (U/mg of protein) of PGA produced under this condition was about 44 times higher than that produced under the uninduced condition. It was found that high production of PGA increased permeability of the outer membrane of cells as detected by increase in sensitivity to SDS and this resulted in leakage of the enzyme into the surrounding medium. SDS-PAGE and immunoblotting analyses of whole proteins of cells grown under various conditions indicated that post-translational processing was a common limiting step of the PGA synthesis under high temperature, high aeration and/or high IPTG concentration. Cells grown at these conditions produced low amount of PGA but accumulated high amount of the PGA precursor polypeptide. Transmission electron micrographs (TEM) of cells grown under 0.1 mM IPTG induction at temperatures of 20 and 25 $^{\circ}\text{C}$ or grown under high IPTG concentrations at 25 $^{\circ}\text{C}$ showed the presence of periplasmic inclusion bodies (IB) and/or cytoplasmic IB. Characterization of these isolated IB by immunoblotting analysis indicated that the periplasmic IB and the cytoplasmic IB were the PGA proenzyme (the precursor polypeptide lacking the signal peptide) and preproenzyme (the precursor polypeptide containing the signal peptide), respectively. Results of this study suggested that accumulation of high amount of the precursor polypeptides led to IB formation which seem to be a possible cause of the deleterious effect of PGA overproduction. It also led to cell death as shown by Gram staining and also led to selection of mutants which are Pga $^{-}$ phenotype. The observation of cytoplasmic IB of

the PGA preproenzyme suggested that translocation of PGA through cell membrane was a post-translational process.

From the study with plasmid pDEA11, a deleted pQEA11 plasmid which lacked some nucleotide sequences of the β -subunit region on the *pga* gene, showed that the deleted precursor polypeptide was produced but not processed. Accumulation of the deleted precursor protein to form IB, mainly of the cytoplasmic type, was seen. These indicated that the intact β -subunit was not only necessary for enzyme processing but also for translocation of the precursor polypeptide into the periplasm. Growth of *E. coli* DH5 α pDEA11 cells under induced condition at temperatures of 20-37 °C caused a large numbers of cell death resulting in observation of the growth curves with very long lag periods compared to that of the uninduced cells. This was similar to that with *E. coli* DH5 α pQEA11 grown under induced condition at 37 °C. This suggested that overproduction of the deleted precursor protein and subsequently formation of IB led to cell death. This supported that aggregation of the precursor polypeptide was a possible cause of the detrimental effect of PGA overproduction leading to growth retardation and cell death as earlier proposed.