LIBRARY AND INFO
MAHIDOL UNIV

STUDIES ON THE PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PENICILLIN G ACYLASE FROM *BACILLUS MEGATERIUM* pBA 402/5

AMPA SRIINKAEW

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

With compliments
of
.....

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright© by Mahidol University

TH
A5862
1996

36570

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์เพนนิซิลลิน จี เอซิเลส จากเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus megaterium* pBA 402/5
ผู้วิจัย	อำภา ศรีอิ่นแก้ว
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	
	กวี รัตนบรรณางกูร, Ph.D.
	วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D.
วันที่สำเร็จการศึกษา	30 เมษายน พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

เอนไซม์เพนนิซิลลิน จี เอซิเลส เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิต 6-aminopenicillanic acid ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่นำมาใช้ในขบวนการผลิตเพนนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ ได้ทำการศึกษาขบวนการทำเอนไซม์เพนนิซิลลิน จี เอซิเลส จากเชื้อ *Bacillius megaterium* pBA 402/5 ให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีหลายวิธี เช่น anion exchange โครมาโตกราฟฟีโดยใช้ DEAE-Sephadex-A-50,gel filtration โครมาโตกราฟฟี โดยใช้ Sephadex-G-200 และ hydrophobic interaction โครมาโตกราฟฟี โดยใช้phenyl Sepharose CL-4B. พบว่าสามารถทำเอนไซม์เพนนิซิลลิน จี เอซิเลสให้บริสุทธิ์โดยผ่าน column phenyl Sepharose CL-4B เพียงขั้นตอนเดียว จะทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูงเมื่อเทียบกับก่อนการทำให้บริสุทธิ์ถึง 2.6 เท่าและได้ปริมาณเอนไซม์กลับคืนถึง 76% จากการศึกษาหาค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกริยาพบว่ามีค่า pH 8.6 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ และเมื่อทำการอบเอนไซม์ที่อุณหภูมินี้เป็นเวลา 90 นาที หรืออบเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่ำกว่า 4 หรือสูงกว่า 11 เป็นเวลา 15 ชั่วโมงจะทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถใน

การเร่งปฏิกริยาอย่างสิ้นเชิง เมื่อใช้เพนนิซิลลิน จี เป็นสับสเตรท สามารถคำนวณหาค่า Km ได้เท่ากับ 12.5 mM และค่า Vmax เท่ากับ 16.7 unit/ml ตามลำดับ แต่เมื่อใช้ 6-nitro-3-phenylacetamidobenzoic acid (NIPAB) เป็นสับสเตรทค่า Km มีค่าเท่ากับ 0.53 mM และค่า Vmax มีค่าเท่ากับ 8.20 unit/ml จากการศึกษานี้พบว่า Phenylacetic acid มีคุณสมบัติเป็น competitive inhibitor ส่วน 6-aminopenicillanic acid มีคุณสมบัติเป็น noncompetitive inhibitor และสามารถคำนวณหาค่าพลังงานสำหรับเร่งการเกิดปฏิกิริยา (activation energy) มีค่าเท่ากับ 7.29 Kcal. $K.^{-1}.mol^{-1}$ ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35°C และที่อุณหภูมิมากกว่า 35°C มีค่าเท่ากับ 1.95 Kcal. $K.^{-1}.mol^{-1}$.

การศึกษานี้พบว่ามี heterodimer ที่เชื่อม α และ β subunits ของเอนไซม์ด้วยพันธะ covalent และเรียกว่า "α-β covalent heterodimer" ไม่พบว่าสารนี้มี activity ของเอนไซม์ และจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามการเพิ่มเวลา fermentation.

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Studies on the Purification and Characterization of Penicillin G Acylase from *Bacillus megaterium* pBA 402/5.
Name	Ampa Sriinkaew
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Supervisory Committee	Kavi Ratanabanangkoon, Ph.D. Vithaya Meevootisom, Ph.D.
Date of Graduation	30 April B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

Penicillin G acylase is an enzyme which hydrolyzes benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid, a key intermediate in the manufacturing of semisynthetic penicillins. Purification methods of extracellular penicillin G acylase from *B. megaterium* pBA 402/5 was studied. Various chromatographic method were used including anion exchange chromatography (DEAE-Sephadex A-50), gel filtration (Sephadex G-200), and hydrophobic interaction chromatography (phenyl Sepharose CL-4B). In this study enzyme purification could be achieved by only one chromatographic step (phenyl Sepharose CL-4B). The enzyme was obtained at a high degree of purity with 2.6 fold purification and 76% recovery of enzyme activity. Optimal pH and optimal

Copyright by Mahidol University

purification and 76% recovery of enzyme activity. Optimal pH and optimal temperature of the enzyme were 8.6 and 50°C , respectively. Complete loss of the enzymatic activity occurred when the enzyme was incubated for 90 min at 50^{0} C and for 15 h at pH lower than 4 or higher than 11 . Km and Vmax values of the enzyme were 12.5 mM penicillin G and 16.7 unit/ml, respectively. When 6-nitro-3-phenylacetamidobenzoic acid (NIPAB) was used as a substrate, these values were 0.53 mM and 8.20 unit/ml, respectively. Phenylacetic acid was found to be a competitive inhibitor while 6-aminopenicillanic acid was a non-competitive inhibitor. The Arrhenius plot of the enzyme catalysis showed a break at 35°C and the activation energies of the enzymatic hydrolysis below and above 35°C were 7.29 $Kcal.K.^{-1}mol^{-1}$ and 1.95 $Kcal.K.^{-1}mol^{-1}$, respectively.

In this study, a covalently linked α and β subunits of the enzyme (called α-β covalent heterodimer) was observed. This heterodimer of 2 peptides had no enzymatic activity and increased in concentration with increasing fermentation time.

Copyright by Mahidol University