LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

5 APR 1994

NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSIS AND STRAIN IMPROVEMENT FOR HIGH EXPRESSION OF PENICILLIN G ACYLASE GENE FROM *BACILLUS MEGATERIUM* UN-1

KANCHANA WEERADECHAPON

ยืมจากหอสมุดกลาง
จาก

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

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1993

Copyright by Mahidol University

25753

ชื่อวิทยานิพนธ์	การหาลำดับ nucleotide และการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Bacillus megaterium* UN-1 ที่สร้างเอนไซม์ penicillin G acylase.
ผู้วิจัย	กาญจนา วีระเดชาพล
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr. Eng. วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D. ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, D.Sc.
วันสำเร็จการศึกษา	31 มกราคม พ.ศ. 2537

บทคัดย่อ

เอนไซม์ penicillin G acylase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเพนนิซิลลินให้กลายเป็น 6-aminopenicillanic acid (6-APA) ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ใช้ในการผลิตสารเพนนิซิลลินกึ่งสังเคราะห์ ในการศึกษาลำดับ nucleotides ของยีนที่สร้าง penicillin G acylase (*pac*) นี้พบว่ายีน *pac* จาก *Bacillus megaterium* UN-1 ซึ่งกลายพันธุ์มาจาก *Bacillus megaterium* ATCC 14945 ควบคุมการสร้างโปรตีนซึ่งประกอบด้วย 802 amino acid มีขนาดประมาณ 92,000 Da ที่บริเวณโปรโมเตอร์จะมี conserved sequence ที่ตำแหน่ง -35, -10 เป็น TTGAAT และ TATAAG ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบลำดับ nucleotides ของยีนนี้กับ *pac* ของ *Arthrobacter viscosus* พบว่ามีความเหมือนกันสูงถึง 97% เมื่อนำโปรตีนบริสุทธิ์ไปทำ Gel electrophoresis โดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าเอนไซม์ตัวนี้มี 2 subunits โดยแต่ละ subunit มีขนาดประมาณ 23,000 Da และ 57,000 Da ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่เอนไซม์นี้จะผลิตออกมาเป็นโปรตีนสายเดี่ยวก่อน แล้วจึงผ่านกระบวน

Copyright© by Chulalongkorn University

การ Protein processing กลายเป็นเอนไซม์ที่สมบูรณ์ เหมือนเอนไซม์ชนิดเดียวกันนี้ ที่พบในเชื้ออื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ พลาสมิดสายผสมซึ่งมียีน *pac* อยู่จึงถูกสร้างขึ้น 4 แบบโดยอาศัยเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม ปรับปรุงและตัดต่อโปรโมเตอร์แล้ว transform กลับเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้าน 2 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* MI113 และ *Bacillus megaterium* UN-CAT1 ซึ่งทำให้กลายพันธุ์มาจาก *Bacillus megaterium* UN-1 โดยมีคุณสมบัติไม่สามารถสร้างเอนไซม์ penicillin acylaseได้ ผลเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนพบว่า *Bacillus megaterium* UN-CAT1 สามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่า *Bacillus subtilis* MI113 ที่มีพลาสมิดสายผสมชนิดเดียวกันอยู่ นอกจากนี้ *Bacillus megaterium* UN-CAT1 และ *Bacillus subtilis* MI113 ที่มีพลาสมิดสายผสม pBA402 ยังสามารถสร้างเอนไซม์ penicillin G acylase ได้มากกว่าสายพันธุ์เดิมถึง 26 เท่าและ 13 เท่าตามลำดับ ดังนั้น *Bacillus megaterium* UN-CAT1 (pBA402) จึงมีแนวโน้มว่าน่าจะเป็น สายพันธุ์ที่ดีในการผลิต penicillin G acylase ได้ต่อไป

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Nucleotide Sequence Analysis and Strain Improvement for High Expression of Penicillin G Acylase Gene from *Bacillus megaterium* UN-1.
Name	Kanchana Weeradechapon.
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Supervisor Committee	Watanalai Panbangred, Dr.Eng. Vithaya Meevootisom, Ph.D. Chuenchit Boonchaird, D.Sc.
Date of Graduation	31 January B.E. 2537 (1994).

ABSTRACT

Penicillin G acylase (PAC) catalyzes the hydrolysis of benzylpenicillin to 6-aminopenicillanic acid (6-APA), a key intermediate, in the synthesis of semisynthetic penicillins. The penicillin G acylase gene (*pac*) gene was isolated from *Bacillus megaterium* UN-1, a high penicillin G acylase producer mutant of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. Complete nucleotide sequence of *pac* gene was determined and found that the gene contained an open reading frame encoding for 802 amino acids with MW of about 92,000 Da. This polypeptide consisted of a 26 amino acid signal peptide. The putative -35 and -10 sequences were TTGAAT and TATAAG, respectively. Comparison of *pac* nucleotide sequence to that from *Arthrobacter viscosus* revealed 97% homology. Results from SDS-PAGE suggested that the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium*

Copyright by Mahidol University

UN-1 comprised of two subunits MW of about 23,000 Da and 57,000 Da. Therefore, this enzyme seem to be synthesized first as a single polypeptide and later being processed during maturation to two subunits as reported in the other *pac* gene of various microorganisms. In order to increase the yield of enzyme production, four plasmids containing *pac* gene were constructed and transfomed to *Bacillus megaterium* UN-CAT1, a penicillin G acylase negative mutant of *Bacillus megaterium* UN-1, and *Bacillus subtilis* MI113. The expression of the plasmids containing *pac* gene in *Bacillus megaterium* UN-CAT1, the mutant host, was higher than that in *Bacillus subtilis* MI113. The penicillin G acylase activity in *Bacillus megaterium* UN-CAT1 and *Bacillus subtilis* MI113, both carrying pBA402, a plasmid containing *pac* gene with its self-promoter) were approximate 26 times and 13 times higher than that in *Bacillus megaterium* UN-1, a donor penicillin G acylase producer which contained no plasmid. Hence, *Bacillus megaterium* UN-CAT1 carrying pBA402, is a good potential strain to be used for penicillin G acylase production.

Copyright by Mahidol University