LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

17 SEP 1996

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CEPHALOSPORIN ACYLASE PRODUCING MICROORGANISMS

LINDA SIRIMEKWONG

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

อภินันทนาการ
จาก
.....

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright © by Mahidol University

TH
L748i
1996

36402

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกและศึกษาจุลินทรีย์ที่สร้าง Cephalosporin C acylase.

ผู้วิจัย ลินดา สิริเมฆวงศ์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D.Eng.

วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D.

ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D.

วันสำเร็จการศึกษา 14 พฤษภาคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

เอนไซม์ cephalosporin acylase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซฟฟาโลสปอรินให้กลายเป็น 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตสารเซฟฟาโลสปอรินกึ่งสังเคราะห์ การศึกษานี้ได้พัฒนาการคัดเลือกหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ cephalosporin acylases โดยใช้วิธีทางจุลชีววิทยา วิธีนี้อาศัยเชื้อจุลินทรีย์ *Pseudomonas vesicularis* LR27 ซึ่งแยกได้จากดินเป็นตัวบ่งชี้ จุลินทรีย์ชนิดนี้มีคุณสมบัติไวต่อ 7-ACA ที่ความเข้มข้น 1.25 mg/ml (≥ 25 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตรต่อหลุม) แต่ดื้อต่อ cephalosporin C ที่ความเข้มข้นสูง

Copyright by Mahidol University

ถึง 10 mg/ml (200 ไมโครกรัมต่อ 20 ไมโครลิตรต่อหลุม) ดังนั้น การเทราดเชื้อที่ต้องการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อผสมวุ้นที่มีส่วนผสมของ cephalosporin C และ *P. vesicularis* LR27 จะเห็นเป็นโซนใสรอบๆโคโลนีของเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ cephalosporin acylases การคัดเลือกด้วยวิธีนี้กระทำได้ง่าย รวดเร็วและไม่ต้องใช้สารเคมีหรือเครื่องมือพิเศษใดๆ ได้ทำการทดสอบจุลินทรีย์กว่า 60,000 โคโลนีที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำเพื่อตรวจหา cephalosporin acylase activity ด้วยการใช้วิธีทางจุลชีววิทยานี้ ผลการทดลองพบว่า มีเพียง 10 โคโลนีเท่านั้นที่สร้างโซนใสเมื่อเทราดด้วย *P. vesicularis* LR27 ผสมกับ cephalosporin C อย่างไรก็ตามเมื่อนำเชื้อเหล่านี้ทดสอบด้วยวิธี p-DAB colorimetric และ HPLC ปรากฏว่าไม่มีจุลินทรีย์ตัวใดที่มี cephalosporin C acylase activity อย่างแท้จริงเนื่องจากตรวจไม่พบ 7-ACA ในปฏิกริยา

Arthrobacter viscosus ATCC 53594 เป็นแบคทีเรียที่มีการอ้างในสิทธิบัตรว่าสามารถสร้างเอนไซม์ cephalosporin C acylase จึงได้ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อนี้ในการย่อยสลาย cephalosporin C หรือ GL-7-ACA ไปเป็น 7-ACA โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยนำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากปั่นแยกเชื้อออกไปแล้วมาทำให้เข้มข้นขึ้น 100 เท่าโดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ความเข้มข้นระหว่าง 60-80% พบว่า Crude enzyme preparation ที่ได้มีทั้ง cephalosporin C และ GL-7-ACA acylase activities จากการศึกษาปริมาณของ 7-ACA ที่ผลิตได้เมื่อบ่มกับสารตั้งต้นคือ cephalosporin C และ GL-7-ACA เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ 37 องศา

Copyright by Mahidol University

เซลเซียส ได้ผลว่ามีการเปลี่ยนเป็น 7-ACA 2.55% และ 24.68% ตามลำดับ และสามารถตรวจพบ acylase activity ของ *A. viscosus* ATCC 53594 ในรูปเอนไซม์เข้มข้นนี้ได้ด้วยวิธี colorimetric แม้ว่าจะมีความไวและค่าของ activity ที่ได้จากการคำนวณจะมีค่าที่น้อยกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี HPLC ได้ทดลองใช้ *P. viscosus* ATCC 53594 เป็น cephalosporin acylase positive strain เพื่อนำมาทดสอบว่า จะสามารถนำวิธีทางจุลชีววิทยา โดยการใช้ *P. vesicularis* LR27 นี้ในการคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่สร้าง GL-7-ACA acylase ได้หรือไม่ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า วิธีทางจุลชีววิทยานี้สามารถนำมาใช้คัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ cephalosporin acylase ที่สามารถย่อยเซฟฟาโลสปอรินให้กลายเป็น 7-ACA ในปริมาณ $\geq$ 25 ไมโครกรัม หรือที่ความเข้มข้น $\geq$ 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Isolation and characterization of cephalosporin C acylase producing microorganisms
Name	Linda Sirimekwong
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee	
	Watanalai Panbangred, D.Eng.
	Vithaya Meevootisom, Ph.D.
	Chuenchit Boonchird, Ph.D.
Date of Graduation	14 May B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

Cephalosporin acylase is an enzyme that catalyzes hydrolysis of the aliphatic acyl side chain of cephalosporins to yield 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA), the starting material for production of many semisynthetic cephalosporin antibiotics. A microbiological method for screening of bacteria capable of producing cephalosporin acylases was developed by using *Pseudomonas vesicularis* LR27, a soil isolate as a test microorganism . This bacterium is sensitive to 7-ACA at the concentration of at least 1.25 mg/ml (≥ 25 μg/ 20 μl/ well) but

Copyright by Mahidol University

resistant to cephalosporin C up to 10 mg/ml (200 µg/ 20 µl/ well). Therefore, overlaying of test colonies with medium containing cephalosporin C and this bacterium, will produce a clear halo zone around colonies which produce cephalosporin C acylase. This screening method was simple and required no special chemical reagents or equipments. More than 60,000 colonies of bacteria were isolated from soil and wastewater samples and screened for cephalosporin acylase activity by using this microbiological method. Only 10 isolates were found to produce clear inhibition zones with overlaid *P. vesicularis* LR27 and cephalosporin C. However, none of them showed any measurable acylase activity towards cephalosporin C when analysed by p-DAB colorimetric or HPLC methods in which 7-ACA was not detected.

Arthrobacter viscosus ATCC 53594, a patent bacterium which was claimed to be cephalosporin C acylase producer, was examined for the ability to hydrolyse cephalosporin C or GL-7-ACA to 7-ACA by HPLC analysis. The culture supernatant was concentrated to 100-folds using 60-80% ammonium sulfate fractionation. The crude enzyme preparation was found to possess both cephalosporin C and GL-7-ACA acylase

Copyright by Mahidol University

activities, since 7-ACA product was released from both substrates. The quantity of 7-ACA produced were calculated to be at conversion of 2.55% and 24.68% when incubated for 1 h at 37°C with cephalosporin C and GL-7-ACA, respectively. Acylase activity of the concentrated enzyme preparation from *A. viscosus* ATCC 53594 could also be detected by colorimetric method, though at the sensitivity and activity lower than that of HPLC analysis. *A. viscosus* ATCC 53594 was also used as a cephalosporin acylase positive strains to test for the applicability of the microbiological method using *P. vesicularis* LR27 as a test microorganism for screening of GL-7-ACA acylase-producer. The results showed that this microbiological method could be used to screen for cephalosporin acylase-producing microorganisms which were able to hydrolyse cephalosporin to produce 7-ACA at the amount of ≥ 25 μg or at concentration of ≥ 1.25 mg/ml.

Copyright by Mahidol University