LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY
16 SEP 1996

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CEPHALOSPORIN ACETYL ESTERASE

KWANCHIT DUANGSONK

ดุษฎีนิพนธ์
ของ
นางสาวขวัญจิต ด่วนสนิท

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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1996

Copyright by Mahidol University

TH
K98p
1996

36350

ชื่อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของเอ็นไซม์ cephalosporin acetyl esterase
ผู้วิจัย	ขวัญจิต ดวงสงค์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	กวี รัตนบรรณางกูร, Ph. D. วิทยา มีวุฒิสม, Ph. D. วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, D. Eng.
วันที่สำเร็จการศึกษา	10 พฤษภาคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

Cephalosporin acetylesterase เป็นเอ็นไซม์ที่ hydrolyze พันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง 3' ของโมเลกุลcephalosporin ผลผลิตจากเอนไซม์ที่ได้คือ deacetyl cephalosporin ซึ่งใช้เป็นตัวกลางในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะกึ่งสังเคราะห์ (semisynthetic antibiotic) อย่างแพร่หลาย โดยสามารถทำการแทนที่หมู่อซิเตต (acetate group) ที่ตำแหน่ง 3' เดิม ด้วยอนุพันธุ์อื่นๆ ทำให้เกิดสารตัวใหม่ที่มีคุณสมบัติทางชีววิทยาแตกต่างจากเดิม

เอ็นไซม์จาก *Bacillus subtilis* WRRL-B-558 ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี การทำให้ร้อน (selective heat denaturation), ultrafiltration, และใช้ chromatography ชนิดคอลัมน์ คือ Q-Sepharose Fast Flow, Sephadex G-200 และ Phenyl-Sepharose CL-4B เอ็นไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนต่างๆนี้ เมื่อนำมาศึกษาการแยกโปรตีนด้วยวิธี native-PAGE และย้อมโปรตีนด้วยวิธี silver staining รวมทั้งย้อมเอ็นไซม์ด้วย activity staining พบว่าเห็นแถบโปรตีนเพียง 1 แถบในทั้งสองวิธี นอกจากนี้ยังมี specific activity สูงกว่า 21.5 เท่าเมื่อเทียบกับ culture supernatant เมื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอ็นไซม์โดยวิธี gel filtrationพบว่า มีค่าประมาณ 130kDa และจากการหาขนาดหน่วยย่อย (subunit) ของเอ็นไซม์โดยวิธี SDS-PAGEพบว่า เอ็นไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน 4 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32 kDa ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอ็นไซม์คือ 50°C และ pH ที่เหมาะสมคือ 7.5 จากการศึกษาพบว่าเอ็นไซม์มีคุณสมบัติคงทนต่ออุณหภูมิสูง หลังจากผ่านการเก็บที่ 60°C เป็นเวลา 2ชั่วโมง รวมทั้งยังคงทนต่อ pH ในช่วง 5.0 ถึง 11.0 เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน จากการศึกษา kinetic พบว่า ค่า K_m และ V_{max}

Copyright by Mahidol University

ของเอ็นไซม์ในการทำปฏิกิริยากับ α-naphthyl acetate เป็น 5.97 mM และ 1.47 μmol/min/ml ตามลำดับ จากการศึกษาผลกระทบของสารต่างๆที่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์พบว่า Fe^{3+}และ Zn^{2+}สามารถยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ได้ รวมทั้งการที่ phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) และ 2-mercaptoethanol มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ จึงอาจกล่าวได้ว่าเอ็นไซม์นี้เป็น serine esterase และมี disulfide bridge เป็นองค์ประกอบสำคัญอยู่ด้วย ในขณะที่การวิเคราะห์โดยใช้ TLC และ HPLC พบว่าเอ็นไซม์จาก *B. subtilis* WRRL-B-558นี้ สามารถ hydrolyze cephalosporin C และ 7-ACAได้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Purification and Characterization of Cephalosporin Acetyl Esterase
Name	Kwanchit Duangsonk
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Supervisory Committee	Kavi Ratanabanangkoon, Ph. D. Vithaya Meevootisom, Ph. D. Watanalai Panbangred, D. Eng.
Date of graduation	10 May B.E.2539 (1996)

ABSTRACT

Cephalosporin acetylesterase hydrolyzes cephalosporins at 3'-position. Deacetylcephalosporins obtained are valuable intermediates in semisynthetic cephalosporin production. Many modifications can be made at the 3'-position by nucleophilic displacement of the acetate group to yield compounds with improved biological activity.

Cephalosporin acetylesterase was recovered from the supernatant of a *B. subtilis* WRRL-B-558 culture. Purification of the enzyme was achieved by procedures involving heat denaturation, ultrafiltration and column chromatographies on Q-sepharose Fast Flow, Sephadex G-200 and Phenyl-Sepharose CL-4B. The procedures resulted in 21.5 fold of purification and 14 % recovery of the enzyme activity. The purified enzyme was homogeneous on polyacrylamide gel electrophoresis as indicated by both silver staining and esterase activity staining. The molecular weight of the esterase was estimated to be 130 kDa by gel filtration. Subunit determination of the purified enzyme by SDS-PAGE showed that it composed of 4 identical subunits with a molecular weight about 32 kDa.The enzyme had a temperature optimum at 50° C and a pH optimum of 7.5. It was highly stable in the pH range of 5.0 to

Copyright by Mahidol University

11.0 and retained full activity at 60°C for at least 2 hours. The Michaelis-Menten constant (K_m) and V_{max} for α-naphthyl acetate were 5.97 mM and 1.47 μmol/min/ml, respectively. The enzyme was sensitive to Fe3+ and Zn2+. Since the enzyme was markedly affected by PMSF and 2-mercaptoethanol, the enzyme was probably a serine esterase with at least one disulfide bridge. Analysis of reaction mixtures prepared by incubation of the enzyme solution and cephalosporin C and 7-ACA using TLC and HPLC showed that cephalosporin acetylesterase from *B. subtilis* WRRL-B-558 could hydrolyze those substrates and yielded the deacetylated products.

Copyright by Mahidol University