22 JAN 2001

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

ISOLATION AND PURIFICATION OF THE METHYL PARATHION HYDROLASE ENZYME FROM METHYL PARATHION-DEGRADING *PSEUDOMONAS* SP.

WANPHEN YAMKUNTHONG

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(ENVIRONMENTAL BIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2000

Copyright © by Mahidol University

ISBN 974-665-129-3

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
W249is
2000
b10114398
i1294439

3836531 SCEB/M : MAJOR : ENVIRONMENTAL BIOLOGY ; M.Sc. (ENVIRONMENTAL BIOLOGY)
KEY WORDS : METHYL PARATHION HYDROLASE / ENZYME PURIFICATION / ORGANOPHOSPHATE HYDROLASE / ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDES

WANPHEN YAMKUNTHONG : ISOLATION AND PURIFICATION OF THE METHYL PARATHION HYDROLASE ENZYME FROM METHYL PARATHION-DEGRADING *PSEUDOMONAS* SP. THESIS ADVISORS : VITHOON VIYANANT, Ph.D., JESDAWAN WICHITWECHKARN, Ph.D., SUKSIRI VICHASRI GRAMS, Dr.rer.nat., BOONSRI JONGSAREEJIT, Ph.D. 147 p. ISBN 974-665-129-3

This study was intended to determine that methyl parathion-degrading bacteria *Pseudomonas stutzeri* used methyl parathion as a carbon source and investigate the metabolism of the methyl parathion hydrolase from this bacterium.

This study was achieved by using Southern hybridization, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography, and hydrophobic interaction chromatography. The bacteria hydrolyzed methyl parathion to *p*-nitrophenol, which is the hydrolytic product of methyl parathion, and then degraded *p*-nitrophenol further. A Southern hybridization study indicated that this bacteria does not carry a gene homologous to the *opd* gene and *adp* B gene from the parathion-degrading bacteria *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 and the coumaphos-degrading bacteria *Nocardia* sp. strain B-1, respectively. In addition, the expression of the methyl parathion hydrolase is an inducible one and it was found to be a membrane-bound enzyme. The enzyme was purified in 3 steps using Resource S, Sephadex G-100, and Octyl sepharose 4 FF columns. It was purified to approximately 212 fold with a specific activity of about 430 units/mg of protein. After running the partially purified protein from each purification step on an SDS-polyacrylamide gel and performing an activity staining, this enzyme was found to have a molecular weight of approximately 40 kDa. In addition, the enzyme activity was inhibited by DTT but $CuCl_2$ and EDTA had very little effect on the methyl parathion hydrolase activity.

Methyl parathion-degrading bacteria, *Pseudomonas stutzeri*, were found to be capable of using methyl parathion, an organophosphate insecticide as a carbon source. The enzyme was isolated and purified with the aim to use its N-terminal amino acid sequence as information for synthesizing a specific probe to identify and clone its gene in the future.

Copyright © by Mahidol University

3836531 SCEB/M : สาขาวิชา : ชีววิทยาสภาวะแวดล้อม ; วท.ม. (ชีววิทยาสภาวะแวดล้อม)

วันเพ็ญ แย้มขุนทอง : การศึกษาการแยกบริสุทธิ์ของเอ็นไซม์เมธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจากแบคทีเรียที่ย่อยสลายเมธิลพาราไธออน *Pseudomonas* sp. (ISOLATION AND PURIFICATION OF THE METHYL PARATHION HYDROLASE ENZYME FROM METHYL PARATHION-DEGRADING *PSEUDOMONAS* SP.) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิฑูรย์ ไวยนันท์, Ph.D., เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ, Ph.D.. สุขศิริ วิชาศรีกรามส์, Dr.rer.nat., บุญศรี จงเสรีจิตต์, Ph.D. 147 หน้า. ISBN 974-665-129-3

เชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมธิลพาราไธออน (methyl parathion) ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate insecticide) ได้แก่ เชื้อ *Pseudomonas* sp. ซึ่งเชื้อนี้สามารถใช้เมธิลพาราไธออนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสามารถย่อยสลายเมธิลพาราไธออนเป็นพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ซึ่งเป็น hydrolytic metabolite ของเมธิลพาราไธออน จากการศึกษาโดยวิธี Southern hybridization พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายยาฆ่าแมลงเมธิลพาราไธออนชนิดนี้ไม่มียีนที่ homology กับ *opd* ยีน และ *adp* B ยีน ของเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยสลายยาฆ่าแมลงพาราไธออน (parathion) และยาฆ่าแมลงคูมาฟอส (coumaphos) ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ได้แก่ เชื้อ *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 และ *Nocardia* sp. strain B-1 ตามลำดับ นอกจากนี้การแสดงออกของเอ็นไซม์เมธิลพาราไธออนไฮโดรเลส (methyl parathion hydrolase enzyme) ของเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นแบบ inducible (inducible expression) และเกาะติดอยู่ที่เมมเบรน (membrane-bound) เอ็นไซม์ชนิดนี้ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ 3 ขั้นตอนคือ ใช้คอลัมน์ Resource S, Sephadex G-100, และ Octyl sepharose 4 FF พบว่า เอ็นไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 212 เท่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) 430 ยูนิต/มิลลิกรัมของโปรตีน เมื่อนำเอ็นไซม์ที่ได้ไปแยกแถบโปรตีนบน SDS polyacrylamide gel และเมื่อนำไปทำ activity staining จะเกิดแถบของโปรตีนใน SDS polyacrylamide gel พบว่าเอ็นไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน นอกจากนี้เอ็นไซม์เมธิลพาราไธออนไฮโดรเลสจะถูกยับยั้งด้วย dithiothreitol (DTT) แต่ cupric chloride ($CuCl_2$) และ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) จะมีผลต่อกิจกรรมของเอ็นไซม์เพียงเล็กน้อย เอ็นไซม์ชนิดนี้ถูกทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอติดตามในการหายีนของเอ็นไซม์ตัวนี้ต่อไป

Copyright © by Mahidol University