- 6 AUG 2001

MODIFICATION AND IMMOBILIZATION OF *BACILLUS* PENICILLIN ACYLASE

PAIBOON CHALOK-KONGTHAVORN

ขอมอบหนังสือ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2001

ISBN 974-665-723-2

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
P162 ม
2001
C.2

Copyright by Mahidol University

3936438 SCMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc.(MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : *BACILLUS* / PENICILLIN G ACYLASE / MODIFICATION / IMMOBILIZATION
PAIBOON CHALOK-KONGTHAVORN : MODIFICATION AND IMMOBILIZATION OF *BACILLUS* PENICILLIN ACYLASE. THESIS ADVISORS : SUTHEP WIYAKRUTTA, Ph.D., VITHAYA MEEVOOTISOM, Ph.D., p142. ISBN 974-665-723-2

The purpose of this research was to change the amino acid of *Bacillus megaterium* penicillin G acylase (PAC) so that it can be immobilized onto thiopropyl-agarose gel matrix for use in enzyme column reactor for 6-aminopenicillanic acid production.

The *pac* gene from *B. megaterium* UN-1 was cloned into an *Escherichia coli-Bacillus* shuttle vector pRB373 and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* XL1-blue. Site-directed mutagenesis was performed to change three consecutive nucleotides at positions 2404-2406 (codon 802) of the *pac* gene from AAG to TGT in order to replace the lysine residue at the extreme end of the precursor protein with cysteine. The shuttle vector carrying the mutated *pac* gene was introduced into *B. megaterium* UN-CAT1 by protoplast transformation. In the *Bacillus* host, the mutated *pac* gene under the control of its own promoter could be successfully expressed and the mutant precursor protein could be processed correctly to the mature and active mutant enzyme. The mutant enzyme was overexpressed, purified by a single step of cation exchange chromatography to an apparent homogeneity, and analyzed for its structural and catalytic properties. The purified PAC mutant was found to be composed of α and β subunits of the same sizes as those of the wild-type enzyme. In addition, it was found to contain 0.48 mole of reactive thiol group per mole of the mature enzyme. Specific activity of the mutant enzyme was almost the same as that of the wild-type enzyme. The two enzymes displayed similar pH-activity profile, optimum pH, optimum temperature, and thermal stability. The mutant enzyme, and not the wild type, could be immobilized, via thiol group of its newly introduced terminal cysteine, onto thiopropyl Sepharose 6B at up to 20 μg enzyme per 9 mg dry weight of the gel matrix. The immobilized PAC mutant were used in an enzyme column reactor for production of 6-APA from penicillin G. In a continuous process, 2.03 % conversion of penicillin G to 6-APA was obtained.

In conclusion, it has been proven that genetically replacement of lysine with cysteine at C-terminal amino acid of *Bacillus* PAC did not affect gene expression and post-translational processing to the mature active enzyme. The mutant enzyme can be immobilized onto thiopropyl-agarose gel matrix and can be used in an enzyme column reactor as expected. Addition of longer C-terminal peptides with inclusion of more cysteine residues is recommended for further improvement of immobilization yield and to increase unit activity of the immobilized enzyme.

Copyright by Mahidol University

3936438 SCMI/M : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา : วท.ม. (จุลชีววิทยา)

ไพบูลย์ โฉลกคงถาวร : การดัดแปลงและการตรึงเอนไซม์เพ็นนิซิลลิน เอซิเลสของบาซิลลัส (MODIFICATION AND IMMOBILIZATION OF *BACILLUS* PENICILLIN ACYLASE). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สุเทพ ไวยครุฑธา, ปร.ด., วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D., 142หน้า. ISBN 974-665-723-2

จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ คือ การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนของ penicillin G acylase (PGA) เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ตรึงบนตัวค้ำจุน thiopropyl agarose สำหรับใช้ในขบวนการผลิต 6-aminopenicillanic acid ใน enzyme column reactor

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตัดต่อยีน *pac* จาก *B. megaterium* UN-1 เข้าในเวคเตอร์พาหะ pRB373 ซึ่งเป็น *Escherichia coli-Bacillus* shuttle vector และถ่ายโอนพลาสมิดเวคเตอร์นี้เข้าสู่ *E. coli* XL1-blue เพื่อเพิ่มปริมาณ จากนั้นนำพลาสมิดนี้มาทำให้เกิดการกลายพันธุ์อย่างเจาะจงต่อยีน *pac* โดยเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 2404-2406 จาก AAG เป็น TGT ซึ่งเป็นผลให้กรดอะมิโนตัวสุดท้าย (ตำแหน่ง 802) ของโปรตีนตั้งต้นเปลี่ยนจาก lysine เป็น cysteine ต่อมาได้มีการชักนำพลาสมิดที่กลายพันธุ์นี้เข้าสู่ *B. megaterium* UN-CAT1 โดยวิธี protoplast transformation ซึ่งเมื่ออยู่ใน *Bacillus* เจ้าบ้านนี้ ยีน *pac* ที่กลายพันธุ์สามารถแสดงออกได้ดีภายใต้การควบคุมของ promoter ของตนเอง โปรตีนตั้งต้นที่เกิดขึ้นผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงได้อย่างถูกต้องและเกิดเป็นเอนไซม์ที่สมบูรณ์ เอนไซม์ที่กลายพันธุ์สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ภายในขั้นตอนเดียวโดยใช้ cation exchange chromatography เพื่อนำไปศึกษาโครงสร้างและกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าประกอบด้วยหน่วยย่อย α และหน่วยย่อย β ที่มีขนาดเหมือนกับเอนไซม์ดั้งเดิม นอกจากนั้นยังพบว่ามีหมู่ reactive thiol อยู่ 0.48 โมลต่อเอนไซม์ 1 โมลและค่า specific activity ของ เอนไซม์ที่กลายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ดั้งเดิมโดยที่เอนไซม์ทั้งสองมีค่า optimum pH, optimum temperature, pH stability และ thermal stability คล้ายกัน เอนไซม์ที่กลายพันธุ์สามารถนำไปตรึงกับเจลโดยใช้หมู่ thiol ของ cysteine ตรึงกับ thiopropyl sepharose 6B ซึ่งใช้เอนไซม์ 20 μg ต่อน้ำหนักเจลแห้ง 9 mg เอนไซม์กลายพันธุ์ที่ตรึงแล้วถูกนำมาใช้ในขบวนการผลิต 6-APAใน enzyme column reactor ซึ่งในขบวนการผลิตอย่างต่อเนื่องได้ 6-APA จากการย่อยสลายของ penicillin G เกิดขึ้น 2.03 %

โดยสรุปแล้วการวิจัยนี้สามารถพิสูจน์ได้ว่าการแทนที่กรดอะมิโน lysine ด้วย cysteine ที่ C-terminal ของ penicillin acylase ของ *Bacillus* ไม่มีการส่งผลกระทบต่อการแสดงออกและเกิดขบวนการการเปลี่ยนแปลงได้อย่างถูกต้องโดยเกิดเป็นเอนไซม์ที่สมบูรณ์ได้ เอนไซม์ที่กลายพันธุ์สามารถนำมาตรึงบนเจล thiopropyl agarose ซึ่งนำมาใช้ใน enzyme reactor column ได้ตามจุดประสงค์ที่ต้องการ ในการปรับปรุงเพื่อให้เกิดการตรึงที่ดีขึ้นและเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ตรึง มีการเสนอแนะว่าควรเพิ่มความยาวของสายเปปไทด์ทางด้าน C-terminal ให้ยาวมากขึ้นกว่าเดิมโดยให้มีกรดอะมิโน cysteine มากกว่าหนึ่งตัวในสายของเปปไทด์

Copyright by Mahidol University