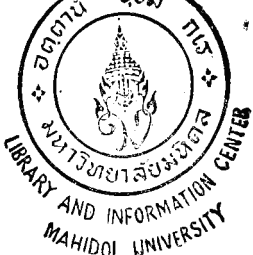


27 JUN 2003



**CONVERSION OF BACTERIAL PENICILLIN-G ACYLASE TO  
CEPHALOSPORIN-C ACYLASE BY PROTEIN ENGINEERING**

**CATLEYA ROJVIRIYA**

With compliments  
of  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล.....

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
(BIOCHEMISTRY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY**

**2003**

**ISBN 974-04-3113-5**

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

TH  
C 365C  
2003  
C. 2

Copyright by Mahidol University

**CONVERSION OF BACTERIAL PENICILLIN-G ACYLASE TO CEPHALOSPORIN-C ACYLASE BY PROTEIN ENGINEERING**

CATLEYA ROJVIRIYA 4236785 SCBC/M

M.Sc. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORS: JIRUNDON YUVANIYAMA, Ph.D., PIMCHAI CHAIYEN Ph.D., VITHAYA MEEVOOTISOM, Ph.D.

**ABSTRACT**

Cephalosporins are a group of  $\beta$ -lactam antibiotics, which are widely used nowadays. Semisynthetic cephalosporins are primarily synthesized from 7-amino-cephalosporanic acid (7-ACA), which is usually obtained by chemical deacylation of cephalosporin C (CC). The chemical production of 7-ACA includes, however, several steps and requires thorough treatment of chemical wastes. Therefore, a single-step enzymatic conversion of CC to 7-ACA using cephalosporin C acylase (CCA) is of great interest in terms of cost effectiveness as well as environmental safety. Unfortunately, identified CCAs from various sources are either of low activity toward CC or actually specific for 7- $\beta$ -(4-carboxybutanamido)-cephalosporanic acid (GL-7ACA). The high cost of running multiple bioreactors and the low activity of identified CCA for a single-step reaction make enzymatic production of these antibiotics unfavorable. In this study, penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* UNcat carrying the plasmid pBA402 (*BmPGA*), which is similar to CCA in molecular aspect, structure, and enzymatic reaction mechanism, was utilized to develop the CCA activity by protein engineering. The model structure of *BmPGA* was built substantially reliably by homology modeling from the template of known X-ray structure of PGA from *Escherichia coli* ATCC 11105. Two active-site residues were identified as candidates for mutagenesis to alter the active-site specificity to recognize CC as a substrate. The designed mutagenesis of *BmPGA* was carried out on the original PGA gene (*pac*) that was cloned into *E. coli*-compatible plasmid pET3a system. The wild-type and mutant proteins could be expressed and correctly processed in an *E. coli* expression system. However, preliminary assays using the *E. coli* culture containing CC or penicillin G suggested that such a mutation led to reduction in both PGA activity and survival of the recombinant host cells. Moreover, they did not significantly improve the desired CCA activity. This study shows that mutation of the selected amino acids could affect the enzyme activity although it did not produce the desired specificity. This could result from incorrect identification of proper amino acids for mutations, suggesting the homology model might not be accurate enough for protein engineering work. Fortunately, small crystals of the wild-type *BmPGA* could be obtained from preliminary crystallization trials, opening a possibility to obtain actual three-dimensional structure of *BmPGA* using X-ray crystallography.

**KEY WORDS : PENICILLIN G ACYLASE / CEPHALOSPORIN C ACYLASE /  
PROTEIN ENGINEERING**

144 P. ISBN 974-04-3113-5

การเปลี่ยนความจำเพาะของเอนไซม์เพนนิซิลิน-จี เอซิลเลส จากเชื้อแบคทีเรีย ให้เป็นเซฟฟาโลสปอริน-ซี เอซิลเลส โดยวิธีวิศวกรรมโปรตีน (CONVERSION OF BACTERIAL PENICILLIN-G ACYLASE TO CEPHALOSPORIN-C ACYLASE BY PROTEIN ENGINEERING)

แคลทเลีย โรจนวีริยะ 4236785 SCBC/M

วท.ม. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จิรันดร ยูวณิคม, Ph.D., พิมพ์ใจ ใจเย็น, Ph.D., วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D.

#### บทคัดย่อ

เซฟฟาโลสปอรินซึ่งเป็นกลุ่มยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในทุกวันนี้จำเป็นต้องผลิตจาก 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) แทบทั้งสิ้น กระบวนการผลิต 7-ACA ในอุตสาหกรรมยังคงต้องใช้ปฏิกิริยาเคมีซับซ้อนหลายขั้นตอนและจำเป็นต้องมีระบบจัดการที่ดีสำหรับสารเคมีเหลือทิ้ง จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ราคาของยาปฏิชีวนะกลุ่มนี้มีราคาแพงมากในปัจจุบัน การนำเอนไซม์เซฟฟาโลสปอริน-ซี เอซิลเลส (CCA) มาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิต 7-ACA จึงเป็นวิธีการที่ดี เนื่องจากสามารถทดแทนกระบวนการผลิตที่ยุ่งยากซับซ้อนด้วยปฏิกิริยาทางชีวภาพซึ่งปราศจากสารเคมีอันตรายเพียงขั้นตอนเดียวเท่านั้น อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มี CCA ที่มีประสิทธิภาพดีพอสำหรับอุตสาหกรรมการผลิต 7-ACA ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งหวังที่จะพัฒนาเอนไซม์ที่มีสมบัติเป็น CCA ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเปลี่ยนความจำเพาะของเอนไซม์เพนนิซิลิน-จี เอซิลเลส ซึ่งได้จาก *Bacillus megaterium* Uncat (*BmPGA*) ด้วยวิธีวิศวกรรมโปรตีน ผู้วิจัยได้ศึกษาวิเคราะห์บริเวณเร่งของ *BmPGA* นี้ผ่านแบบจำลอง 3 มิติ ซึ่งสร้างขึ้นโดยวิธี homology modeling จากแบบ โครงสร้าง 3 มิติของ PGA ที่ได้จาก *Escherichia coli* ATCC 11105 (*EcPGA*) ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกัน 49 เปอร์เซ็นต์ และทำการเปลี่ยนกรดอะมิโน 2 ตัวในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis ที่ยีนดั้งเดิม (wild-type *pac*) แล้วทำการศึกษาการแสดงออกของยีนดั้งเดิมและยีนกลายพันธุ์ (wild-type and mutant genes) บนพลาสมิด pET3a ใน *E. coli* ในเบื้องต้นนี้พบว่าทั้ง PGA ดั้งเดิมและ PGA กลายพันธุ์ต่างก็สามารถแสดงออกได้อย่างถูกต้องสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการทดสอบสมบัติของเอนไซม์ในเชิงเปรียบเทียบ พบว่า PGA กลายพันธุ์นั้นมีความจำเพาะต่อเพนนิซิลิน-จีลดลงแต่ยังไม่มีสมบัติเป็น CCA ดังที่ต้องการ แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ที่จะทำการเปลี่ยนแปลงความจำเพาะของ *BmPGA* แต่แบบจำลอง 3 มิติที่สร้างขึ้นนั้นอาจยังไม่ถูกต้องเพียงพอสำหรับการศึกษาวิศวกรรมโปรตีน อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยสามารถตกผลึกเอนไซม์ PGA ดั้งเดิมได้ในการทดลองตกผลึกเบื้องต้น ซึ่งสามารถนำไปสู่การหาโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ดังกล่าว โดยการศึกษาการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของผลึกต่อไปในอนาคต

144 หน้า. ISBN 974-04-3113-5