Thesis Title Minimization of Propeptide of Subtilisin and Characterization of Extracellular Thermostable Protease for Bioorganic Synthesis

Author Ms. Boonyaras Sookkheo

Ph.D. Biotechnology

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul	Chairman
Prof. Dr. Shui-Tein Chen	Member
Prof. Dr. M.R. Jisnuson Svasti	Member
Asst. Prof. Dr. Sirirat Sarawek	Member
Lect.Dr. Dararat Tongkao	Member

ABSTRACT

The fractions of the synthetic propeptide of bacterial subtilisin BPN′ and Carlsberg were investigated for their inhibitory function on the enzymatic activity of subtilisin BPN′ and Carlsberg. Dividing the 77-residues of propeptide of subtilisin BPN′ from N-terminal propeptide to three 30, 30 and 27-residues fragments, propeptide-BPN′ I, II and III, respectively, were synthesized. The propeptide-BPN′ fraction III showed the highest inhibition as the 77-residues propeptide. The inhibition constant K_i of propeptide-BPN′ I, II and III were 0.12 μM, 0.15 μM and 50 nM to subtilisin BPN′, and 1.09 μM, 0.92 μM and 126 nM to subtilisin Carlsberg, respectively. The propeptide BPN′ fraction III was further minimized to 23, 19, 13 and 10-residues. All of mini-propeptides showed competitive inhibition to subtilisin BPN′ and Carlsberg at 50-200nM concentration. Mini-propeptide of pro-subtilisin Carlsberg fragment III, 27, 23, 19 and 13-residues were synthesized to compare

inhibitory function, had also shown competitive inhibition to both of subtilisin BPN′ and Carlsberg in the same range of concentration, 50-200 nM too. Both of the fractions of propeptide of pro-subtilisin BPN′ and Carlsberg, 27 amino acid residues showed the inhibitory mechanism as a typical rapid equilibrium competitive inhibitor. For studying of the complex structure of the synthesis peptide, ^{15}N-Labeled amino acid was used and it was prepared by using the enzymatic method.

A preparative scale synthesis of ^{15}N-aspartic acid from fumarate and $^{15}NH_4OH$ catalyzed by L-aspartase in membrane enclosed enzyme immobilization with the total yield of 69%. Cloned L-aspartase in *E.coli* asp1297 was improved to give a higher yield to 82% and cloned L-aspartase was purified to homogeneity by DEAE anion exchange chromatograpy and gel filtration and enzyme subunit was determined to be 53 kDa by SDS-PAGE. Some α-keto acid of amino acid derivatives were prepared by using immobilized L-amino acid oxidase with CNBr-Sepharose 4B oxidized from their amino acid derivatives. Kinetic parameters (K_m and V_{max}) of L-amino acid oxidase type I and II were studied. The product of α-keto acid was purified for synthesis of ^{15}N-amino acid derivative with ^{15}N-aspartic and aminotransferase. Kinetic parameters of AspAT were also studied between aspartic and a number of keto acids. The result showed that it preferred dicarboxylic acid or aromatic more than the aliphatic carbon keto acid. AspAT, cloned AspAT in *E.coli* KK-ATT and cloned TyrAT in *E.coli* Ivel were used to synthesis of ^{15}N-labeled amino acids and the products were characterized with ^{15}N-NMR.

Three thermostable proteases, designated S, N and B were extracellular enzymes produced by *Bacillus stearothermophilus* strain TLS33. They were purified by lysine-affinity chromatography, strongly anion-exchange Q HyperD chromatography and Ultrogel AcA44 gel filtration. The molecular masses of the enzymes determined by SDS-PAGE and zymography were approximately 36, 53, and 71 kDa, respectively. The optimum pH values of the three proteases S, N and B were

shown to be pH 8.5, 7.5 and 7.0, respectively. The maximum activities for the enzymes were at 70, 85 and 90°C, respectively. The proteases S, N and B at pH 7.0 in the presence of 5 mM $CaCl_2$ retained half of their activities after 30 min at the temperatures 72, 78 and 90°C, respectively. All three thermostable proteases were strongly inhibited by metal chelators EDTA and 1,10-phenanthroline, and the proteolytic activities were restored by addition of $ZnCl_2$. They can thus be classified as Zn^{2+}-metalloproteases. The cleavage specificities of the proteases S, N and B on a 30-residue synthetic peptide from pro-BPN' subtilisin were Tyr-Ile, Phe-Lys and Gly-Phe, respectively.

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การลดขนาดของโปรเปปไทด์ของสับติไลซิน และการหาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์ชนิดที่ทนความร้อนเพื่อการสังเคราะห์ทางไบโอออร์แกนิค

ชื่อผู้เขียน นางสาวบุณยรัศมิ์ สุขเขียว

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. สุรีย์ ฟูตระกูล	ประธานกรรมการ
ศ.ดร. สุยเถียน เฉิน	กรรมการ
ศ.ดร. มรว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์	กรรมการ
ผศ.ดร. ศิริรัตน์ สาระเวก	กรรมการ
อ.ดร. ดารารัตน์ ทองขาว	กรรมการ

บทคัดย่อ

โปรเปปไทด์ของสับติไลซินประกอบด้วยกรดอะมิโน 77 ตัว ได้ถูกลดขนาดเป็น 3 ส่วน คือ โปรเปปไทด์ BPN′ I, II และ III ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 30, 30 และ 27 ตัว ตามลำดับ ทั้งสามส่วนย่อยของโปรเปปไทด์ BPN′ ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยวิธีทางเคมี และศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์สับติไลซิน BPN′ และ Carlsberg พบว่าค่าคงที่การยับยั้ง (K_i) ของโปรเปปไทด์ BPN′ I, II และ III ที่มีต่อเอนไซม์สับติไลซิน BPN′ เท่ากับ 0.12 μM, 0.15 μM และ 56 nM ตามลำดับ และที่มีต่อเอนไซม์สับติไลซิน Carlsberg เท่ากับ 1.09 μM, 0.92 μM และ 126 nM ตามลำดับ ซึ่งโปรเปปไทด์ BPN′ III ได้แสดงความสามารถในการยับยั้งต่อสับติไลซินสูงสุด จึงถูกนำมาสังเคราะห์ใหม่ โดยลดขนาดลงให้เหลือกรดอะมิโน 10, 13, 19, 23 และ 27 ตัว ในขณะเดียวกันโปรเปปไทด์ของ Carlsberg ก็ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นในขนาดของกรดอะมิโน 13, 19, 23 และ 27 ตัวด้วยเช่นกัน ซึ่งส่วนย่อยโปรเปปไทด์ของ BPN′ และ Carlsberg ทั้งหมดยังคงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สับติไลซิน BPN′ และ Carlsberg ได้ในระดับความเข้มข้น 50-200 nM ด้วย และผลการยับยั้งการทำงานของโปรเปปไทด์เป็นแบบแข่งขันกับสารตั้งต้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโปรเปปไทด์กับโมเลกุลของสับติไลซิน

สามารถที่จะใช้เปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ติดฉลาก ไนโตรเจน-15 มาช่วยอธิบาย และกรดอะมิโนที่ติดฉลากไนโตรเจน-15นี้สามารถเตรียมได้จาก วิธีทางเอนไซม์

กรดแอสปาติกที่มีไนโตรเจน-15 ถูกเตรียมขึ้นจากปฏิกริยาระหว่างฟูมาเรตและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่มีไนโตรเจน-15 โดยมีเอนไซม์แอสปาเตสที่ถูกตรึงในเมมเบรน และที่ได้จากการโคลนใน *E.coli* asp1297 ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกริยา ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ 69 และ 82% ตามลำดับ นอกจากนั้นเอนไซม์แอสปาเตสที่ได้จากการโคลนใน *E.coli* asp1297 ยังถูกทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี DEAE anion-exchange chromatography และ gel filtration ซึ่งเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีขนาดมวลโมเลกุล 53 kDa ในขณะเดียวกันสารคีโตของอนุพันธ์ กรดอะมิโนสามารถเตรียมได้จากเอนไซม์อะมิโนออกซิเดสที่ตรึงกับ CNBr-Sepharose 4B และได้ศึกษาค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์อะมิโนออกซิเดสด้วย สารคีโตเหล่านี้ถูกทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์อนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่ติดฉลากไนโตรเจน-15 จากกรดแอสปาติกที่มีไนโตรเจน-15 และเอนไซม์อะมิโนทรานสเฟอเรส จากการศึกษาตัวแปรทางจลน์ศาสตร์ของเอนไซม์อะมิโนทรานสเฟอเรสระหว่างแอสปาติกกับสารคีโต พบว่าเอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับสารคีโตที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก 2 หมู่ หรือหมู่ที่เป็นอะโรมาติกได้ดีกว่าสายคาร์บอนปกติ ทั้งนี้เอนไซม์อะมิโนทรานสเฟอเรสที่ใช้มีทั้งแอสปาเตทอะมิโนทรานสเฟอเรส โคลนแอสปาเตทอะมิโนทรานสเฟอเรสใน *E.coli* KK-ATT และโคลนไทโรซีนอะมิโนทรานสเฟอเรสใน *E.coli* Ivel ได้ถูกนำมาใช้สังเคราะห์กรดอะมิโนที่ติดฉลากไนโตรเจน-15 และนำผลิตผลที่ได้มาตรวจสอบคุณสมบัติ ด้วย ^{15}N-NMR

โปรดิเอสทนความร้อน S, N และ B เป็นเอนไซม์ที่ส่งออกนอกเซลล์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* strain TLS33 เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ถูกทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี lysine-affinity chromatography, strongly anion-exchange Q HyperD chromatography และ Ultrogel AcA44 gel filtration มวลโมเลกุลของโปรดิเอส S, N และ B โดย SDS-PAGE และ zymography มีค่าเท่ากับ 36, 53, and 71 kDa ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีพีเอช 8.5, 7.5 และ 7.0 และ อุณหภูมิที่ 70, 85 และ 90°C ตามลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่พีเอช 7.0 เมื่อเติม 5 mM $CaCl_2$ จะทำให้เอนไซม์มีค่าครึ่งชีวิตที่เวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 72, 78 และ 90°C นาทีตามลำดับ เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้จะถูกยับยั้งโดยการเติม metal chelators ได้แก่ EDTA และ 1,10-phenanthroline โดยแอคติวิตีจะกลับคืนมาโดยการเติม $ZnCl_2$ ซึ่งสามารถจัดประเภทของเอนไซม์นี้เป็นพวก Zn^{2+}-metalloproteases นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะในการย่อยเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีกรดอะมิโน 30 ตัว จากโปรเปปไทด์ BPN' คือ Tyr-Ile, Phe-Lys และ Gly-Phe ตามลำดับ