CATABOLISM OF ACENAPHTHYLENE BY *Rhizobium* sp. CU-A1

Mr. Siriwat Poonthrigpun

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of Doctor of Philosophy Program in Environmental Management
(Interdisciplinary Program)
Graduate school
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

ISBN 974-14-2532-5

แคแทบอลิซึมของอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* sp. CU-A1

นายศิริวัตร ปุณฑริกพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ISBN 974-14-2532-5

Thesis Title	Catabolism of acenaphthylene by *Rhizobium* sp. CU-A1
By	Mr. Siriwat Poonthrigpun
Field of Study	Environmental Management
Thesis Advisor	Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.
	Professor Rudolf Müller, Dr. rer. nat.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

..... Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Manaskorn Rachakornkij, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Professor Rudolf Müller, Dr. rer. nat.)

..... Member
(Assistant Professor Kobchai Pattaragulwanit, Dr. rer. nat.)

..... Member
(Ekawan Luepromchai, Ph.D.)

..... Member
(Mayuree Fuangthong, Ph.D.)

ศิริวัตร ปุณฑริกพันธ์ : แคแทบอลิซึมของอะซีแนพธิลีนโดย *Rhizobium* sp. CU-A1 (CATABOLISM OF ACENAPHTHYLENE BY *Rhizobium* sp. CU-A1) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.อมร เพชรสม, Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Müller จำนวนหน้า 170 หน้า. ISBN 974-14-2532-5.

จากรายงานก่อนหน้านี้ถึงวิถีการย่อยสลายอะซีแนพธิลีนใน *Rhizobium* sp. CU-A1 พบว่าสร้าง อะซีแนพธีนควิโนน, กรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก และกรดเจนทิสิกเป็นสารมัธยันต์ งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกสารมัธยันต์เพิ่มเติมจากส่วนสกัดจากน้ำเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์กลายของสายพันธุ์ CU-A1 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยทรานสโปซอนให้มีความบกพร่องในการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน รวมทั้งทำสารมัธยันต์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี preparative TLC, ซิลิกาเจลคอลัมน์โครมาโทกราฟี และ HPLC และพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีแกสโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทเมทรี จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารมัธยันต์สามารถทำนายวิถีแคแทบอลิซึมของอะซีแนพธิลีนอย่างสมบูรณ์ใน *Rhizobium* sp. CU-A1 ได้ดังนี้ คือ อะซีแนพธิลีนจะถูกเติมออกซิเจน 2 อะตอมลงบนโมเลกุลของอะซีแนพธิลีนได้เป็นอะซีแนพธีนไดออล ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็นอะซีแนพธีนควิโนน หลังจากนั้นจะถูกเติมออกซิเจนได้เป็นผลิตภัณฑ์จากการแตกวงอะโรมาติกคือกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก หลังจากนั้นกรดแนพธาลีน-1,8-ไดคาร์บอกซิลิก จะถูกดึงหมู่คาร์บอกซิลบนวงเบนซีนออกหนึ่งหมู่ กลายเป็นสารมัธยันต์ชนิดใหม่คือกรดแนพโธอิก ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น 1,2-ไดไฮดรอกซีแนพธาลีน กรดซาลิไซลิก และกรดเจนทิสิก ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดการไฮดรอกซิเลชั่นและการแตกวงอะโรมาติกของกรดเจนทิสิก ได้เป็น สารมัธยันต์ในวัฏจักรเครบส์ โดยผ่านการสร้างมาเลอิลไพรูเวท และ ฟูมาริลไพรูเวท

ส่วนสกัดปราศจากเซลล์ ที่เตรียมได้จากเชื้อนี้เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวเกลือแร่ที่มีกรดโปรโตคาทีคูอิกและกระตุ้นด้วยอะซีแนพธิลีน มีความสามารถในการออกซิไดซ์อะซีแนพธิลีนไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆที่สอดคล้องกัน เอนไซม์ อะซีแนพธิลีน ไดออกซีจีเนสที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาขั้นแรกของการย่อยสลายอะซีแนพธิลีน ได้ถูกแยกออกเป็น 3 องค์ประกอบ เรียกว่า ส่วนประกอบ A, B และ C ในระหว่างขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วย เจลฟิลเตรชันโครมาโทกราฟี ส่วนประกอบทั้ง 3 ส่วนมีความจำเป็นร่วมกันในการแสดงแอคติวิตีและได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซีแนพธีนไดออล ส่วนประกอบ A คือเทอร์มินัล ออกซีจิเนส ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยที่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่เท่ากัน คือ 45 และ 22 กิโลดาลตัน ส่วนประกอบ B และ ส่วนประกอบ C คือ รีดักเทส และ เฟอร์รีดอกซิน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 48.2 และ 9.8 กิโลดาลตัน ตามลำดับ สเปกตรัมของการดูดกลืนแสงยูวี/วิซิเบิลของส่วนประกอบ A และ C มีลักษณะเช่นเดียวกับโปรตีนที่มี Rieske type iron-sulfur center ขณะที่ยูวี/วิซิเบิลสเปกตรัมของส่วนประกอบ B เป็นลักษณะของฟลาโวโปรตีน ดังนั้นในเบื้องต้นอะซีแนพธิลีน ไดออกซีจีเนส ของ *Rhizobium* sp. CU-A1 ถูกจัดให้อยู่ในไดออกซีจีเนสกลุ่ม IIB ที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนและการแตกวงอะโรมาติกของสารตั้งต้น

ลายมือชื่อนิสิต.....ศิริวัตร ปุณฑริกพันธ์.....

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2549.....ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4689687620: MAJOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT
KEY WORD: *Rhizobium* sp./ ACENAPHTHYLENE/ ACENAPHTHENEQUINONE/ NAPHTHALENE-1,8-DICARBOXYIC ACID/ 1-NAPHTHOIC ACID/ GENTISIC ACID/ DIOXYGENASE

SIRIWAT POONTHRIGPUN : CATABOLISM OF ACENAPHTHYLENE BY *Rhizobium sp.* CU-A1 THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PAIROH PINPANICHAKARN, PH.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, PH.D., PROF. RUDOLF MÜLLER, DR. RER. NAT., 170 pp. ISBN 974-14-2532-5.

Rhizobium sp. CU-A1 was previously shown to mineralize acenaphthylene via the formation of acenaphthenequinone, naphthalene-1,8-dicarboxylic acid and gentisic acid as the intermediates. In this work, several additional intermediates were isolated from the extracts of the culture broth of its blocked mutants, purified by thin-layer, silica gel column or high-performance liquid chromatography and identified by gas chromatography-mass spectrometry. As a result, a complete pathway for the catabolism of acenaphthylene by *Rhizobium* sp. CU-A1 is proposed as follow: the initial reaction is the incorporation of two oxygen atoms into acenaphthylene molecule to form acenaphthenediol which then further oxidized to acenaphthenequinone. Subsequent dioxygenation would yield a ring fission product, naphthalene-1,8-dicarboxylic acid. A possible decarboxylation would give a novel intermediate, 1-naphthoic acid, which would further be oxidized to 1,2-dihydroxynaphthalene, salicylic acid and gentisic acid, respectively. Then, hydroxylation of gentisic acid, following by ring cleavage, would give central intermediates in the TCA cycle via maleylpyruvate or fumarylpyruvate formation.

Crude cell free extract prepared from this organism grown in mineral medium supplemented with protocatechuic acid and induced by acenaphthylene showed ability to oxidize acenaphthylene to the corresponding oxidation products. The enzyme catalyzing the initial reaction of acenaphthylene degradation, acenaphthylene dioxygenase, was separated into three components, designated as components A, B, and C by gel filtration chromatography. All three components were essentially required for the activity giving acenaphthenediol as a product. Component A, terminal oxygenase, was a dimer with two subunits with molecular mass of 45 and 22 kDa. Component B, reductase, and C, ferridoxin, consisted of a single polypeptide with a molecular mass of 48.2 and 9.8 kDa, respectively. Component A and C had UV/visible spectra of a Rieske type iron-sulfur center while component B had a UV/vivible spectrum of flavoprotein. Acenaphthylene dioxygenase from *Rhizobium* sp. CU-A1 was presumed to be a class IIB dioxygenase which had ring hydroxylating and ring fission activity.

Student's Signature.....

Field of Study Environmental Management..Advisor's Signature.....

Academic Year 2006..... Co-advisor's Signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my grateful appreciation to Assoc. Prof. Dr. Pairoh Pinphanichakarn, my thesis advisor, for her useful advices, valuable information and great encouragement throughout this research. My sincere thanks also go to Assoc. Prof. Dr. Amorn Petsom, my co-advisor, for all his advices, guidance and technical support.

I do wish to express my gratitude to Prof. Dr. Rudolf Muller, my thesis co-advisor, for granting me to do the research in his laboratory at Institute of Biocatalysis, Technical University Hamburg-Harburg, Germany. I sincerely appreciate his valuable advice, enthusiastic support, laboratory facilities and research techniques. I also gratefully thank Dr. Sugima Rappert for her supervision and useful guidance during my visit at Technical University Hamburg-Harburg.

I am grateful to Asst. Prof. Dr. Kobchai Pattaragulwanit for his valuable advices, many useful comments and helps especially with the preparing of manuscript. I gratefully appreciated Assoc. Prof. Dr. Kanchana Juntongjin and Assit. Prof. Dr. Suthep Thaniyavarn for their advices, guidances and support.

I also appreciate the guidance, discussion and technical assistance from laboratory technicians, officers and my friends at National Research Center for Environmental and Hazardous Waste Management (NRC-EHWM), Department of Microbiology, Chulalongkorn University and Technical University Hamburg-Harburg.

I would like to thank National Research Center for Environmental and Hazardous Waste Management (NRC-EHWM) for the research grant. I also would like to thank Chulalongkorn University for funding the Bioremediation Research Unit, Department of Microbiology, Faculty of Science.

Finally, I wish to express deeply gratitude to my family for their endless love and continuing support.

CONTENTS

Pages

LIST OF TABLES

Table **Pages**

LIST OF TABLES (CONT)

Table **Pages**

LIST OF FIGURES

Figure **Pages**

LIST OF FIGURES (CONT)

Figure **Pages**

LIST OF FIGURES (CONT)

Figure **Pages**

LIST OF FIGURES (CONT)

Figure **Pages**

LIST OF FIGURES (CONT)

Figure **Pages**

LIST OF FIGURES (CONT)

Figure **Pages**

LIST OF FIGURES (CONT)

Figure **Pages**

LIST OF FIGURES (CONT)

Figure **Pages**