

Abstract

Project Code: MRG5280190

Project Title: Expression and characterization of the *azoR1* gene encoding azoreductase from *Bacillus subtilis*

การแสดงออกและการศึกษาลักษณะเฉพาะของ azoreductase โดยยีน *azoR1* จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

Investigator: Montira Leelakriangsak

Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University

E-mail Address: montira-l@bunga.pn.psu.ac.th

Project Period: 16 มีนาคม 2552 ถึง 15 กันยายน 2554

Azoreductases have been characterized as enzymes that can decolorize azo dyes by reducing azo groups. Our previous study uncovered the regulation of *azoR1* expression in soil bacterium, *Bacillus subtilis*. The *azoR1* expression was negatively controlled by YodB repressor. The level of *azoR1* transcription and AzoR1 protein were increased in *yodB* mutant. In this study, the gene encoding FMN-dependent NADH-azoreductase (*azoR1*) was identified and overexpressed in *Escherichia coli*. The purified AzoR1 from recombinant plasmid using the N-terminal His tag vector (pET-16b) as overexpression vector was oxygen insensitive. The molecular mass of the native form of AzoR1 was determined to be a homodimer of 49 kDa by gel filtration and bore FMN as a flavin cofactor. Analysis of coenzyme requirement for AzoR1 activity showed that NADH promoted 14 times higher than NADPH as electron donor to reduce Methyl red (MR). The K_m values for both NADH and MR substrates were 0.018 and 0.267 mM, respectively. The V_{max} for NADH and MR were 7.74 and 44.44 U/mg protein, respectively. This activity was NADH dependent. The AzoR1 was also able to reduce Congo Red with specific activity of 0.13 ± 0.006 U/mg protein. The enzyme was not able to decolorize Orange G and Orange II.

Keywords: azoreductase, AzoR1, *Bacillus subtilis*, Methyl red

บทคัดย่อ

เอโซรีดักเทสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสีเอโซโดยการรีดิวซ์ที่หมู่เอโซ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การควบคุมการแสดงออกของยีน *azoR1* ของแบคทีเรียที่อาศัยในดิน *Bacillus subtilis* เป็นการควบคุมแบบลบโดยตัวยับยั้ง YodB ระดับของยีน *azoR1* และปริมาณโปรตีน AzoR1 เพิ่มขึ้นในสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *yodB* ในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษายีน *azoR1* ที่สังเคราะห์โปรตีนชนิด FMN-dependent NADH-azoreductase โดยเพิ่มการแสดงออกของยีนใน *Escherichia coli* โปรตีน AzoR1 สกัดได้จากพลาสมิดลูกผสมที่ใช้ดีเอ็นเอพาหะที่มี His tag ตรงบริเวณปลายอะมิโน (pET-16b) เอนไซม์ที่ได้สามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีอากาศ เมื่อวิเคราะห์โดยเทคนิค gel filtration พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ AzoR1 มีขนาด 49 กิโลดาลตัน และมี FMN เป็นโคแฟกเตอร์ การวิเคราะห์ชนิดของโคเอนไซม์สำหรับแอคติวิตีของ AzoR1 พบว่าเมื่อใส่ NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในการรีดิวซ์สีเมทิลเรด เอนไซม์แอคติวิตีเพิ่มขึ้น 14 เท่า เปรียบเทียบกับการใส่ NADPH ค่า K_m มีค่าเท่ากับ 0.018 mM สำหรับ NADH และ 0.267 mM สำหรับเมทิลเรด ส่วนค่า V_{max} มีค่า 7.74 และ 44.44 U/mg protein สำหรับ NADH และ เมทิลเรด ตามลำดับ ซึ่งแอคติวิตีของเอนไซม์ต้องอาศัย NADH AzoR1 ยังสามารถรีดิวซ์สีคองโกเรด ด้วยค่าแอคติวิตีเท่ากับ 0.13 ± 0.006 เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลาย Orange G และ Orange II

คำหลัก: เอโซรีดักเทส เอโซอาร์ 1 บาซิลลัส ซับทิลิส เมทิลเรด