การพิสูจน์เอกลักษณ์สารเมตาบอไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนธีน ในวิถีโคเมตาบอลิสมกับฟีแนนทรีน โดย *Sphingomonas* sp. P2 และการศึกษาเบื้องต้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีน

นางสาว อรฤทัย ภิญญาคง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-333-575-7

IDENTIFICATION OF METABOLITES FROM DEGRADATION OF PYRENE AND FLUORANTHENE VIA CO-METABOLISM WITH PHENANTHRENE BY *Sphingomonas* sp. STRAIN P2 AND PRELIMINARY STUDY ON GENES INVOLVED IN PHENANTHRENE DEGRADATION

Miss Onruthai Pinyakong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-333-575-7

Thesis Title	IDENTIFICATION OF METABOLITES FROM DEGRADATION OF PYRENE AND FLUORANTHENE VIA CO-METABOLISM WITH PHENANTHRENE BY *Sphingomonas* sp. STRAIN P2 AND PRELIMINARY STUDY ON GENES INVOLVED IN PHENANTHRENE DEGRADATION
By	Miss Onruthai Pinyakong
Department	Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Suthep Thaniyavarn
Thesis Co-advisor	Associate Professor Kanchana Juntongjin

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Naline Nilubol, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Suthep Thaniyavarn, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Kanchana Juntongjin, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)

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

อรฤทัย ภิญญาคง : การพิสูจน์เอกลักษณ์สารเมตาบอไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีน และฟลูออแรนธีน ในวิถีโคเมตาบอลิสมกับฟีแนนทรีน โดย *Sphingomonas* sp. P2 และการศึกษาเบื้องต้นของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายฟีแนนทรีน (IDENTIFICATION OF METABOLITES FROM DEGRADATION OF PYRENE AND FLUORANTHENE VIA CO-METABOLISM WITH PHENANTHRENE BY *Sphingomonas* sp. STRAIN P2 AND PRELIMINARY STUDY ON GENES INVOLVED IN PHENANTHRENE DEGRADATION) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุเทพ ชนียวัน, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. กาญจนา จันทองจีน, 139 หน้า, ISBN 974-333-575-7

การพิสูจน์เอกลักษณ์สารเมตาบอไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนธีน ในวิถีโคเมตาบอลิสมกับฟีแนนทรีนโดย *Sphingomonas* sp. P2 ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว carbon free mineral medium (CFMM) ที่มีฟีแนนทรีนกับไพรีน หรือฟีแนนทรีนกับฟลูออแรนธีน ในถังหมักขนาด 30 ลิตร เป็นเวลา 4 วัน ใช้ส่วนน้ำหมักมาแยกและทำสารเมตาบอไลท์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ silica gel open column, thin-layer และ high performance liquid chromatography และจำแนกชนิดสารเมตาบอไลท์โดยเทคนิค GC-MS และ NMR ไม่พบสารเมตาบอไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายไพรีนและฟลูออแรนธีน แต่ตรวจพบและพิสูจน์เอกลักษณ์สารเมตาบอไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายฟีแนนทรีนในอาหารที่มีไพรีนอยู่ด้วยได้ 5 ชนิด พบว่ามีสารเมตาบอไลท์ที่สำคัญ 2 ชนิดคือ 5,6-เบนโซคิวมาริน (5,6-benzocoumarin) ซึ่งเกิดจากการปฏิกิริยาออกซิเดชันที่คาร์บอนตำแหน่ง 1 และ 2 ของวงฟีแนนทรีน และ 1,5-ไดไฮดรอกซี-2-แนพโธอิก แอซิด (1,5-dihydroxy-2-naphthoic acid) โดยทั้ง 2 ชนิดเป็นสารเมตาบอไลท์ชนิดใหม่ในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีน นอกจากนี้อีก 3 ชนิด ได้แก่ 7,8-เบนโซคิวมาริน (7,8-benzocoumarin) 1-ไฮดรอกซี-2-แนพโธอิก แอซิด (1-hydroxy-2-naphthoic acid) และคิวมาริน (coumarin) อย่างไรก็ตามคิวมาริน 5,6-เบนโซคิวมาริน และ 7,8-เบนโซคิวมาริน อาจเกิดจากการเปลี่ยนรูปของสารเมตาบอไลท์ในวิถีการย่อยสลายฟีแนนทรีนโดยปฏิกิริยาที่ไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่า *Sphingomonas* sp. P2 สามารถเริ่มปฏิกิริยาออกซีจีเนชั่นฟีแนนทรีนได้ทั้งที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1,2 และ 3,4 ในการย่อยสลายฟีแนนทรีน โดย *Sphingomonas* sp. P2 จากการศึกษาเบื้องต้นของยีนที่ประมวลรหัสของเอนไซม์ไดออกซีจีเนสใน *Sphingomonas* sp. P2 พบว่ายังไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนไดออกซีจีเนสได้โดยวิธี PCR ซึ่งใช้ nahAc, phnAc, modified pPAH, and Rieske type เป็นไพรเมอร์ และยังไม่สามารถได้โคลนที่มียีนไดออกซีจีเนสโดยวิธี shot gun cloning เช่นกัน

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2542

ลายมือชื่อนิสิต.....Onrottrej Pinyakong.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4172533223 : MAJOR MICROBIOLOGY

KEY WORD PHENANTHRENE/ METABOLITES/ DIOXYGENASE GENE

ONRUTHAI PINYAKONG: IDENTIFICATION OF METABOLITES FROM DEGRADATION OF PYRENE AND FLUORANTHENE VIA CO-METABOLISM WITH PHENANTHRENE BY *Sphingomonas* sp. STRAIN P2 AND PRELIMINARY STUDY ON GENES INVOLVED IN PHENANTHRENE DEGRADATION. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. KANCHANA JUNTONGJIN, Ph.D., 139 pp. ISBN 974-333-575-7

Metabolites from pyrene and fluoranthene degradation via co-metabolism with phenanthrane by *Sphingomonas* sp. P2. were investigated. After 4-day cultivation of *Sphingomonas* sp. P2 in carbon free mineral medium (CFMM) supplemented with phenanthrane and pyrene or fluoranthene in 30 l-fermenters, no metabolite from pyrene and fluoranthene was found, whilst five metabolites in phenanthrene degradation pathway in the presence of pyrene were detected and purified by silica gel open column, thin-layer and high performance liquid chromatography. Based on gas chromatography-mass spectral, ^{1}H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectral analyses, two novel metabolites in phenanthrene degradation were characterized. One was identified as 5,6-benzocoumarin deriving from catabolism initiated by dioxygenation at the 1 and 2 positions of phenanthrene ring and the other one as 1,5-dihydroxy-2-naphthoic acid. Other metabolites from phenanthrene degradation, including 7,8-benzocoumarin, 1-hydroxy-2-naphthoic acid, and coumarin were also identified. The detection of coumarin, 5,6-benzocoumarin and 7,8-benzocoumarin suggested that these three compounds were formed from nonenzymatic conversion of certain metabolites in phenanthrene degradation pathway. Therefore, the results obtained suggested that phenanthrene could be degraded by *Sphingomonas* sp. P2 via dioxygenation at both 1,2 and 3,4 positions and subsequently undergone *meta*-cleavege. Pathway for phenanthrene degradation is proposed. Preliminary study of gene encoding dioxygenase revealed that this gene could not be amplified by PCR using nahAc, phnAc, modified pPAH and Rieske type primers while *Escherichia coli* clones containing dioxygenase gene from shot gun cloning have not yer obtained.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....Onruthai Pinyakong.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....Kanchana Juntongjin.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude and appreciation to Dr. Suthep Thaniyavarn, Dr. Kanchana Juntongjin, Dr. Pairoh Pinphanichakarn and Dr. Kobchai Pattaragulwanit for their valuable advice, guidance, and encouragement throughout the preparation of the thesis. My special appreciation is also extended to the chairman of the advisory committee, Dr. Naline Nilubol for valuable comments and suggestions.

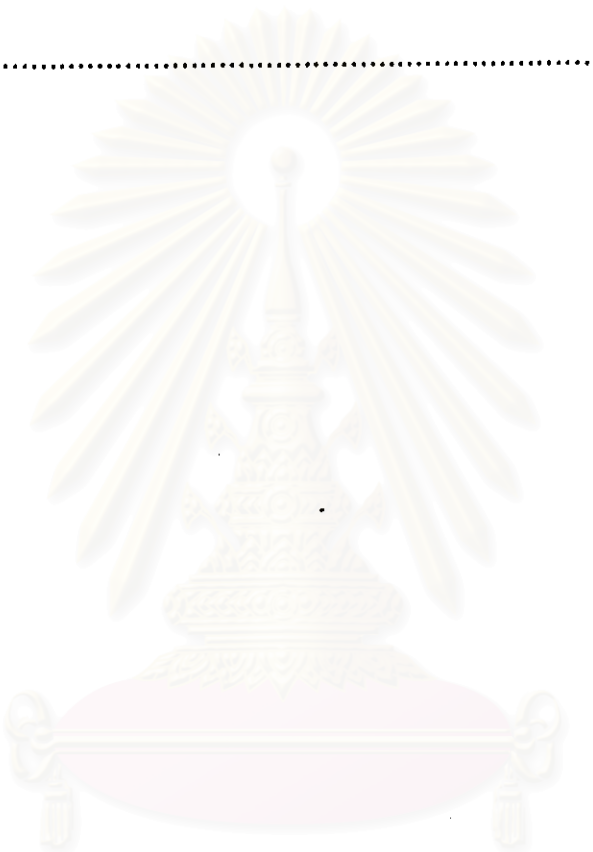
I would like to express my sincere appreciation to Prof. T. Omori, Prof. H. Yamane, Dr. H. Nojiri and my friends at Biotechnology Research Center, The University of Tokyo for their valuable advice and guidance, support and encouragement. My special appreciation is also extended to Mr. Hiroshi Habe for his advice, patience, technical support and helpfulness. I also thank Miss T. Yamagishi for performing some part of molecular genetic experiment and her friendship. I gratefully acknowledge Prof. K. Furihata for determining NMR spectra.

I am grateful to Mr. Nuttapun Supaka for providing *Sphingomonas* sp. P2 and technical support. I also thank Miss Saranya Phaengthai, Miss Poatchanee Chanthamalee, Miss Thanyanuch Kriengkaipipat, Miss Chuenjit Prakitchaiwattana, all members in Department of Microbiology and my friends in Tokyo for their help and friendship.

I thank Thai Japan Technology Transfer Project- Oversea Education Exchange Foundation (TJTTP-OECF) for financial support to work at Biotechnology Research Center, The University of Tokyo.

Finally, I am deeply grateful to my family for encouragement, moral support and great love.

CONTENTS



LIST OF TABLES

Page

LIST OF FIGURES

Page

LIST OF ABBREVIATIONS

Ap	ampicillin
Ap^r	resistance to ampicillin
bp	base pair
δ	chemical shift
°C	degree Celsius
$CDCl_3$	deuterated chloroform
CD_3OD	deuterated methanol
CFMM	carbon free mineral medium
COSY	Correlated spectroscopy
CTAB	hexadecyl trimethyl ammoniumbromide
d	doublet
dd	doublet of doublet
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
et al.	Et alii (latin), and other
FAD	flavine adenine dinucleotide
Fe	Iron
flu	fluoranthene
g	gram
GC-MS	Gas chromatography-Mass Spectrometry
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
hr	hour

IPTG	isopropylthio-β-D-galactoside
J	coupling constant
kb	kilobase
kDa	kilodalton
kg	kilogram
l	litre
LD_{50}	Medial lethal dose fifty
M	Molar
M^+	molecular ion
m	multiplet
m^3	cubic metre
m/z	mass to charge ratio
MES	2 [N-morpholino]ethanesulfonic acid
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
MHz	megahertz
MW	molecular weight
µg	microgram
µl	microlitre
µm	micrometre
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NOESY	Nuclear overhauser enhancement spectroscopy
nm	nanometre
NMR	Nuclear magnetic resonance
nt	nucleotide
OD	optical density
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons
PCR	Polymerase chain reaction

phe	phenanthrene
pmol	picomole
ppm	parts per million
psi	pound per square inch
pyr	pyrene
R_t	retention time in chromatography
rpm	revolution per minute
Suc	succinate
SDS	sodium dodecyl sulphate
sec	second
sp.	species
sq.	square
t	triplet
TAE	Tris-acetate/EDTA
TE	Tris-EDTA
TEG	Tris-EDTA/glucose
TLC	Thin layer chromatography
U	unit
UV	ultraviolet
V	volt
v	volume
w	weight
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside