บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* ST-201 แยกได้จากดินในประเทศไทยในการตรวจหาจุลินทรีย์ซึ่งมีเอนไซม์ที่สามารถนำมาใช้สังเคราะห์ D-phenylglycine เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี D-phenylglycine เท่านั้นเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แบคทีเรียนี้สร้างเอนไซม์ D-phenylglycine aminotransferase (D-PhgAT) ที่สามารถเปลี่ยน D-phenylglycine เป็น benzoylformate ซึ่งถูกสลายต่อไปโดยเอนไซม์อื่นๆ ให้เป็น common metabolites เพื่อการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อทำให้เซลล์แตก เอนไซม์ D-PhgAT ได้ถูกแยกให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟท, isocratic phenyl agarose chromatography, LiChrospher TMAE 1000 anion-exchange chromatography และ SigmaChrom HIC-Phenyl hydrophobic interaction chromatography ตามลำดับ D-PhgAT ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์สูงเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE เอนไซม์ D-PhgAT ในสภาพธรรมชาติ มีน้ำหนักโมเลกุลปรากฏ (M_r) ประมาณ 92,000 ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 47,500 และมีค่า isoelectric point (p*I*) เท่ากับ 5.0 เอนไซม์ชนิดนี้เร่งปฏิกริยา transamination ที่ผันกลับได้ ซึ่งจำเพาะสูงเฉพาะกับ D-phenylglycine หรือ D-4-hydroxyphenylglycine เท่านั้น โดยใช้ตัวรับหมู่อะมิโนที่จำเพาะคือ 2-oxoglutarate ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น L-glutamic acid โดยที่ D- และ L-isomers ของ phenylalanine, tyrosine, alanine, valine, leucine, isoleucine และ serine ไม่สามารถเป็นซับสเตรทสำหรับเอนไซม์นี้ได้ D-PhgAT มีอัตราการทำงานสูงสุดที่ pH 9-10 และที่อุณหภูมิ 35-45°ซ ค่า K_M ของเอนไซม์สำหรับ D-phenylglycine และ 2-oxoglutarate ที่อุณหภูมิ 35°ซ, pH 9.5 คือ 1.1 และ 2.4 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ กลไกของปฏิกิริยาเป็นแบบ Ping Pong Bi Bi เอนไซม์ D-PhgAT ถูกยับยั้งได้ดีด้วยตัวยับยั้งของเอนไซม์ที่มี pyridoxal phosphate เป็น co-enzyme โดยทั่วไป

การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนส่วนปลายสายด้าน N และภายในสาย ของโมเลกุล D-PhgAT บริสุทธิ์ นำไปสู่การโคลน *dpgA* gene จาก genomic DNA ของ *P. stutzeri* ST-201 พบ promoter sequence และ ribosome binding site ที่ควบคุม *dpgA* gene ซึ่งมี 1362 นิวคลีโอไทด์ code สำหรับเอนไซม์ D-PhgAT ซึ่งประกอบขึ้นด้วยกรดอะมิโน 453 ตัว เมื่อนำ *dpgA* gene ไปแสดงออกใน *Escherichia coli* ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter พบว่ามีการสร้าง PhgAT ที่ทำงานได้ และสมบัติเหมือน PhgAT ที่เตรียมจาก *P. stutzeri* ST-201 ทุกประการ

D-PhgAT ที่พบในการศึกษานี้เป็นเอนไซม์ใหม่ ที่ยังไม่เคยมีรายงานว่ามีการทำให้บริสุทธิ์และ มีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆมาก่อน เอนไซม์นี้น่าสนใจทั้งด้าน วิทยาศาสตร์และ ด้านอุตสาหกรรม เนื่องจากเหตุผล 2 ประการ คือ ประการแรก เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติพิเศษคือ “sterio-inverting” transamination activity ซึ่งไม่มีในกลุ่ม aminotransferases เท่าที่ทราบในปัจจุบัน ประการที่สอง D-PhgAT เป็นเอนไซม์ตัวใหม่ที่สามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์ enantiomerically pure D-phenylglycine หรือ D-4-hydroxyphenylglycine โดยใช้สารให้หมู่อะมิโนราคาถูก คือ L-glutamate และ สามารถกระทำได้โดยใช้ปฏิกริยาเอนไซม์ในขั้นตอนเดียว ซึ่งสาร D-phenylglycine และ D-4-hydroxyphenylglycine เป็น side-chains ที่มีความต้องการสูงในอุตสาหกรรมผลิตยาปฏิชีวนะกลุ่ม β-lactam

Keywords: อะมิโนทรานส์เฟอเรส, ดี-ฟีนิลกลัยซีน, ซูโดโมแนส

Abstract

A bacterium, identified as *Pseudomonas stutzeri* ST-201, was newly isolated from Thai soil under a screening program designed to search for microorganisms possessing of enzyme(s) applicable for D-phenylglycine synthesis. When grown on a minimal medium containing D-phenylglycine as the sole carbon and nitrogen source, the bacterium produced D-phenylglycine aminotransferase (D-PhgAT) that converted D-phenylglycine to benzoylformate which was further degraded to other common metabolites. Cell homogenate was prepared and the enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation, isocratic phenyl agarose chromatography, LiChrospher TMAE 1000 anion-exchange chromatography and SigmaChrom HIC-Phenyl hydrophobic interaction chromatography. The purified D-PhgAT obtained was apparently homogeneous as analyzed by SDS-PAGE. The molecular weight (M_r) of the native enzyme was estimated to be 92,000. It was composed of two identical subunits, each with a molecular weight (M_r) of 47,500. The isoelectric point (p*I*) of the native enzyme was 5.0. The enzyme catalyzed reversible transamination reactions specific for D-phenylglycine or D-4-hydroxyphenylglycine in which 2-oxoglutarate was an exclusive amino group acceptor and was converted into L-glutamic acid. Neither the D- nor L-isomers of phenylalanine, tyrosine, alanine, valine, leucine, isoleucine or serine could serve as substrates. The enzyme was most active at alkaline pH with maximum activity at pH 9-10. The temperature for maximum activity was 35-45°C. The apparent K_M values for D-phenylglycine and for 2-oxoglutarate at 35°C, pH 9.5 were 1.1 mM and 2.4 mM, respectively. The transamination was found to proceed via a Ping Pong Bi Bi mechanism. The enzyme activity was strongly inhibited by typical inhibitors of pyridoxal phosphate-dependent enzymes.

N-terminal and internal amino acid sequences of purified D-PhgAT were determined leading to cloning of *dpgA* gene from genomic DNA of *P. stutzeri* ST-201. The *dpgA* gene was identified within an ORF of 1362 nucleotides downstream from a potential promoter sequence and a ribosome-binding site, and encodes the 453 amino acids-long D-PhgAT. Expression of the *dpgA* gene under a strong inducible T7 promoter in *E. coli* yielded active D-PhgAT having physical and catalytic properties identical to those of the enzyme produced by *P. stutzeri* ST-201.

The D-PhgAT found in this study is a new enzyme that has not been purified and characterized before. This enzyme is of both academic and industrial interest because it possesses a characteristic “stereo-inverting” transamination activity which is unusual among aminotransferases known to date. It allows utilization of L-glutamate, a cheap amino-group donor, for enzymatic synthesis of enantiomerically pure D-phenylglycine or D-4-hydroxyphenylglycine in a single enzymatic transamination reaction step. Both D-phenylglycine and D-4-hydroxyphenylglycine are important side-chains that are in high demand for the β-lactam antibiotics industry.

Keywords: aminotransferase, D-phenylglycine, *Pseudomonas*