

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG4680118

Project Title : Purification and characterization of D-amino acid amidase from *Delftia acidovorans*

Investigator : ดร. ทิพรัตน์ หงษ์ภักดิ์ศรี

E-mail Address : tipparat.h@psu.ac.th

Project Period : 1 ปี

Delftia acidovorans เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ดีอะมิโนเอซิดอะมิเดส ซึ่งถูกแยกจากตัวอย่างดินโดยใช้เทคนิคการทำให้เชื้อคุ้นเคย (acclimation culture technique) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี D-phenylalanine amide เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์ดีอะมิโนเอซิดอะมิเดสโดยไม่จำเป็นต้องมีสาร D-amino acid amide ไปเหนี่ยวนำแต่ไม่หลังเอนไซม์ออกนอกเซลล์ เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 380 เท่าโดยใช้ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ แบบไฮโดรโฟบิก MonoQ และ Superdex มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 54 กิโลดาลตันจาก sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis กิจกรรมของเอนไซม์มีความจำเพาะกับ amino acid amides รูปร่างกว่ารูปร่างแอลโดยเฉพาะ กลุ่มที่มีโครงสร้างวงแหวน เช่น D-phenylalanine amide, D-tryptophan amide and D-tyrosine amide แต่ไม่มีความจำเพาะต่อ D-amino acid amide ที่มีขนาดเล็ก เช่น D-, L-alanine amide และ L-serine amide รวมถึงพวกโอลิโกเปปไทด์ กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 40°C พีเอช 8.5 และมีความคงตัวที่ 45°C โดยที่ยังมีกิจกรรมอยู่ถึง 92.5% เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที

ดังนั้นการนำเอนไซม์จาก *Delftia acidovorans* ไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมจึงยังต้องมีการปรับปรุงโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ให้มีความจำเพาะสูงต่อสารตั้งต้นในรูปดีหรือรูปแอลเท่านั้น

Delftia acidovorans was D-amino acid amidase producing bacteria isolated from soil samples using acclimation culture technique in medium broth containing D-phenylalanine amide as a sole source of nitrogen. This strain produced intracellular, D-amino acid amidase constitutively. The enzyme was purified about 380-fold to homogeneity using ammonium sulfate fractionation, anion exchange chromatography on DEAE Toyopearl 650M, hydrophobic column chromatography on Ether Toyopearl, Butyl Toyopearl and Phenyl Superpose column, MonoQ HR 10/10 and Superdex 200 HR 10/35. The molecular mass of the purified enzyme was estimated to be about 54 kDa on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme was active preferentially toward D-amino acid amides to their L-counterparts. It exhibited the strong amino acid amidase activity toward aromatic amino acid amide including D-phenylalanine amide, D-tryptophan amide and D-tyrosine amide, yet it was not specifically active toward low molecular weight D-amino acid amide such as D-, L-alanine amide and L-serine amide. Moreover, it was not specifically active toward oligopeptides. The enzyme showed maximum activity at 40°C and pH 8.5, and appeared to be very stable with the remaining activity of 92.5% in the reaction performed at 45°C for 30 min.

Therefore the industrial application of the enzyme from *Delftia acidovorans* still need further structural development regarding substrate specificity of the enzyme to be strictly acting towards either D- or L-amino acids amides

Keywords : D-Amidase, D-Amino acids, enantioselective amidase, Amino acid amides, *Delftia acidovorans*.