

บทคัดย่อ

Project Code:

MRG5580048

Project Title:

โครงการการพัฒนากระบวนการหมักเอนไซม์โคแฟกเตอร์เพื่อใช้ในการกระบวนการออกซิโดรีดักชันโดยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ

Investigator:

ผศ.ดร.ธัญญารัตน์ พงศ์ทรงกูร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address:

thunyarat.pon@mahidol.ac.th

Project Period:

2 ปี

ในปัจจุบันการใช้เอนไซม์เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการผลิตสารเคมีและสารออกฤทธิ์ในเชิงการแพทย์ได้รับความสนใจจากอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่มีประโยชน์บางจำพวก (เช่น เอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส) จำเป็นต้องใช้ NADPH ซึ่งมีราคาแพงมากเป็นโคแฟกเตอร์ เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแบซิลลัสเป็นระบบหมักเอนไซม์โคแฟกเตอร์ที่มีความน่าสนใจมาก เนื่องจากสารตั้งต้นมีราคาถูก เอนไซม์มีความเสถียร ปฏิกิริยาเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถใช้กับโคแฟกเตอร์ได้ทั้ง NADH และ NADPH ในงานวิจัยนี้เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสจากเชื้อแบซิลลัส อะมัยโลลิควิเฟเชียน สายพันธุ์ SB5 (GDH-BA) ถูกนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสจากเชื้อแบซิลลัส ซับทิลิส สายพันธุ์ 168 (GDH-BS) แม้ว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะมีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกันมากแต่เอนไซม์ GDH-BA นอกจากจะมีอัตราการเร่งปฏิกิริยาที่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (97 U/mg-protein) แล้วยังมีความเสถียรในระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 6 มากกว่าเอนไซม์ GDH-BS (26 U/mg-protein) อีกด้วย แม้ว่าเอนไซม์ GDH-BA จะมีอัตราการเร่งปฏิกิริยาสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่ GDH-BA จะเสถียรที่อุณหภูมิต่ำกว่า 42 องศาเซลเซียส เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการผลิตที่รายงานในงานวิจัยนี้ (1,292 U/g-well cells) นับว่าสูงมากเมื่อเทียบกับรายงานการผลิตเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสจากเชื้อ *E. coli* ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรม นอกจากนี้เมื่อนำเชื้อ *B. subtilis* B-15 ซึ่งมีการแสดงออกของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสไปใช้เป็นตัวหมักเอนไซม์โคแฟกเตอร์ร่วมกับเชื้อ *E. coli* M20 ซึ่งมีการแสดงออกของเอนไซม์ P450 BM3 F87V พบว่าเชื้อ B-15 สามารถเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีนัยสำคัญ (10.8 เท่า)

Keywords: เอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส การหมักเอนไซม์โคแฟกเตอร์ แบซิลลัส อะมัยโลลิควิเฟเชียน

Abstract

Project Code:

MRG5580048

Project Title:

Development of a cofactor regeneration system for biocatalytic oxidoreductions

Investigator:

Asst.Prof.Thunyarat Pongtharangkul, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address:

thunyarat.pon@mahidol.ac.th

Project Period:

2 years

The use of enzymes as biocatalysts in the chemical and pharmaceutical industries has been growing at a tremendous rate; however, the use of NADPH-dependent catalysts (such as oxidoreductases) has been severely limited by the absence of efficient methods to recycling a prohibitively expensive NADPH. At present, biological approaches using either isolated enzyme or whole-cell biocatalyst seem to be most competitive for commercial applications. By far, glucose dehydrogenases (GDH) from *Bacillus* species offer several advantages over other systems including high stability, inexpensive co-substrate (glucose), thermodynamically favorable reaction and flexibility to regenerate both NADH and NADPH. In this research, glucose dehydrogenase (GDH) from *Bacillus amyloliquefaciens* SB5 (GDH-BA) was studied and compared with that of *Bacillus subtilis* 168 (GDH-BS), a common source of *gdh* gene for cofactor-regenerating applications. Despite a highly similar sequence when comparing with GDH-BS (26 U/mg-protein), GDH-BA exhibited significantly higher specific activity (97 U/mg-protein) and stability when pH was higher than 6. While an optimum activity of GDH-BA was observed at a temperature of 50°C, the enzyme was stable only up to 42°C. It should be noted that the productivity of GDH obtained in this study (1,292 U/g-wet cells) is among the highest productivity reported for recombinant *E. coli*. The fact that a recombinant, whole-cell *B. subtilis* expressing GDH-BA (B-15) increased the hexanols yields obtained from *n*-hexane bioconversion using recombinant *E. coli* M20 expressing P450 BM3 F87V by 10.8-folds proved that it can be used as an effective cofactor regenerator in a coupling whole-cell system.

Keywords: glucose dehydrogenase, cofactor regeneration, *Bacillus amyloliquefaciens*