

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA4780014

ชื่อโครงการ : เทคโนโลยีชีวภาพสำหรับการใช้เอนไซม์ในการสังเคราะห์สาร ดี-ฟีนิลกลัยซีน
อีแนนทิโอเมอร์บริสุทธิ์

ชื่อนักวิจัย : นายสุเทพ ไวยครุฑธา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

E-mail Address : scsvy@mahidol.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : กันยายน 2547 - มิถุนายน 2554

D-phenylglycine aminotransferase (D-PhgAT) จากแบคทีเรีย *Pseudomonas stutzeri* ST-201 เร่งปฏิกิริยา “stereo-inverting” transamination ที่สามารถใช้สำหรับสังเคราะห์ enantiopure D-phenylglycine หรือ D-4-hydroxyphenylglycine (ซึ่งเป็น side-chains สำคัญที่มีความต้องการสูงในอุตสาหกรรมการผลิตยาปฏิชีวนะกลุ่ม β -lactam) โดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ขั้นตอนเดียว และใช้ L-glutamate ซึ่งมีราคาถูก เป็นสารให้หมู่ amino โครงการวิจัยนี้ได้ใช้การพัฒนาทางเทคโนโลยีชีวภาพหลายด้าน เพื่อให้กระบวนการสังเคราะห์สารด้วยเอนไซม์ D-PhgAT มีประสิทธิภาพใช้งานได้ดี โดยได้ทำ directed mutagenesis ต่อยีน *dpgA* เพื่อเปลี่ยน serine ที่ปลายสายด้าน C ของ D-PhgAT ทำให้สามารถตรึงเอนไซม์กับ thiol-containing matrix ได้อย่างรวดเร็ว โดยที่ enzyme ยังมี activity ดีและคงตัวมากขึ้น ได้ใช้เอนไซม์ที่ตรึงนี้ในปฏิกิริยาที่มี benzoylformate คูดซับอยู่บน Amberlite (IRA400) และปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆ พบว่าได้สาร D-phenylglycine 20.25 กรัมต่อลิตร ได้พัฒนาระบบการแสดงออกของยีนเพื่อการผลิต D-PhgAT ในเซลล์เจ้าบ้าน 2 ชนิด ระบบแรกใช้ *Escherichia coli* โดยมี *E. coli* chaperones แสดงออกพร้อมด้วย สามารถผลิต D-PhgAT ได้เพิ่มขึ้นจาก 0.44 เป็น 1,768 unit.L⁻¹.OD⁻¹ ระบบที่สองใช้ยีสต์ *Pichia pastoris* โดยมี *E. coli* chaperones แสดงออกพร้อมด้วย สามารถผลิต D-PhgAT ได้ 14,717 unit.L⁻¹.OD⁻¹ ได้แก้ปัญหของ D-PhgAT ที่มีค่าการละลายต่ำ ด้วยการทำ structure-guided mutagenesis ซึ่งทำให้เพิ่มการละลายของ D-PhgAT จาก 11.5 เป็น 51 มก/มล ในโครงการยังได้มีการพัฒนาวิธีการใหม่สำหรับการพิสูจน์ stereospecificity ของการถ่ายทอดโปรตอนบน C-4' ของ coenzyme โดย aminotransferase รวมทั้งการประยุกต์ใช้เอนไซม์ D-PhgAT ในการตรวจวัดปริมาณ L-glutamate ด้วยวิธีหมุนเวียนสารตั้งต้น ซึ่งเป็นวิธีการวัดที่รวดเร็ว วัดได้ละเอียด และมีการรบกวนน้อย การวิจัยต่อเนื่องที่ควรทำในอนาคต ได้แก่ การดัดแปลงโครงสร้างโมเลกุลของ D-PhgAT เพื่อลดการยับยั้งจาก substrate การพัฒนากระบวนการตรวจวัดและเติม substrate ที่เหมาะสม และวิธีการดึง product ออกจากระบบ เพื่อให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ D-PhgAT มีอัตราเร็วเพิ่มขึ้น และทำได้ยาวนานมากขึ้นไปอีก

คำหลัก : อะมิโนทรานส์เฟอเรส, ดี-ฟีนิลกลัยซีน, การสังเคราะห์สารด้วยเอนไซม์

Abstract

Project code: RSA4780014

Project Title : Biotechnology for Enzymatic Synthesis of Enantiomerically Pure
D-Phenylglycine

Investigator : Dr Suthep Wiyakrutta

Department of Microbiology, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address : scsvy@mahidol.ac.th

Project Period : September 2004 - June 2011

D-phenylglycine aminotransferase (D-PhgAT) from *Pseudomonas stutzeri* ST-201 catalyzes the “stereo-inverting” transamination that can be used to synthesize enantiopure D-phenylglycine or D-4-hydroxyphenylglycine, the two important side-chains in high demand for the β -lactam antibiotics industry, in a single enzymatic step using L-glutamate as a low-cost amino donor. Biotechnological development in various aspects were attempted to make this enzymatic synthesis process effective and viable. Directed mutagenesis of *dpgA* gene to replace the C-terminus serine with cysteine could facilitate rapid and site specific immobilization of the D-PhgAT(S453C) on thiol-containing matrix while maintaining enzyme activity and enhancing its stability. Biocatalysis using the immobilized D-PhgAT(S453C) in a controlled-release system of Amberlite (IRA400)-adsorbed benzoylformate yielded a final D-phenylglycine concentration of 10.25 g.L⁻¹. Two systems for D-PhgAT high-expression were developed. The first system was based on *Escherichia coli* host with chaperones co-expressions which improved the D-PhgAT yield from 0.44 to 1,768 unit.L⁻¹.OD⁻¹. In the second system, codon-optimized synthetic *dpgA* gene was expressed in *Pichia pastoris* with bacterial chaperones co-expressions which yielded D-PhgAT at 14,717 unit.L⁻¹.OD⁻¹. Problem of the inherently low solubility of the wild-type D-PhgAT was alleviated by structure-guided mutagenesis which could increase the enzyme solubility from 11.5 to 51 mg/mL. During investigation of molecular and catalytic property of the D-PhgAT, a new method for determination of aminotransferase stereospecificity for C-4' hydrogen transfer on the coenzyme was developed. A spectrophotometric enzymatic cycling method using L-glutamate dehydrogenase and D-PhgAT for determination of L-glutamate in foods is another aspect of D-PhgAT application developed during this project. Genetically modification of the D-PhgAT to relief substrate inhibition, developing effective and logical systems for substrate addition and product removal are important research topics that should be done in the future.

Keywords : aminotransferase, D-phenylglycine, enzymatic synthesis