BENZOYLFORMATE DECARBOXYLASE FROM <u>PSEUDOMONAS</u> <u>STUTZERI</u> ST-201: GENE CLONING, ENZYME CHARACTERIZATION AND ROLE IN D-PHENYLGLYCINE DEGRADATION

CHOEDCHAI SAEHUAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

เอนไซม์เบนโซอิลฟอร์เมต ดีคาร์บอกซิเลส จาก Pseudomonas stutzeri ST-201: การโคลนยีน การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ และบทบาทของเอนไซม์ในการย่อยสลายดี-ฟีนิลกลัยซีน
(BENZOYLFORMATE DECARBOXYLASE FROM PSEUDOMONAS STUTZERI ST-201: GENE CLONING, ENZYME CHARACTERIZATION AND ROLE IN D-PHENYLGLYCINE DEGRADATION)

เชิดชาย แซ่ฮ่วน 4336653 SCMI/D

ปร.ด. (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D., สุเทพ ไวยครุฑธา, Ph.D., พิมพ์ใจ ใจเย็น, Ph.D., ศราวุฒิ จิตรภักดี, Ph.D.,

บทคัดย่อ

การศึกษานี้รายงานบทบาทของเอนไซม์เบนโซอิลฟอร์เมต ดีคาร์บอกซิเลส (*Ps*BFDC) ใน *Pseudomonas stutzeri* ST-201 ในการย่อยสลายดี-ฟีนิลกลัยซีน รวมถึงการโคลนยีน การทำให้ยีนแสดงออก การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยพบว่า *P. stutzeri* ST-201 สร้างเอนไซม์ดี-ฟีนิลกลัยซีน อะมิโนทรานสเฟอเรส และตามด้วย *Ps*BFDC ในเวลาต่อมาเมื่อถูกชักนำด้วยดี-ฟีนิลกลัยซีน แต่แบคทีเรียชนิดนี้สร้างเพียง *Ps*BFDC เท่านั้นเมื่อถูกชักนำด้วยเบนโซอิลฟอร์เมต ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า *Ps*BFDC มีบทบาทในขั้นตอนต่อจากการย่อยสลายดี-ฟีนิลกลัยซีน เมื่อแยก *Ps*BFDC จาก *P. stutzeri* ST-201 และทำให้บริสุทธิ์แล้ว นำไปหาลำดับของกรดอะมิโนด้านปลาย N เพื่อใช้ออกแบบ probe สำหรับทำ hybridization ในการโคลนยีน ได้ชิ้นดีเอนเอที่มี open reading frame ให้ชื่อว่า *dpgB* เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ *Ps*BFDC ซึ่งเมื่อทำ sequence alignment พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนในกลุ่ม thiamin-diphosphate dependent enzymes ยีน *dpgB* นี้ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 1,581 คู่เบส และสร้างโพลีเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 526 ตัว เมื่อนำยีนนี้ซึ่งโคลนอยู่ในเวกเตอร์ pET17b ไปทำให้เกิดแสดงออกใน *Escherichia coli* BL21 (DE3) แล้วนำเอนไซม์ที่ได้ไปผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งประกอบด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วย ammonium sulfate ต่อด้วย Phenyl Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography, ultrafiltration และ Q-Sepharose FF anion-exchange chromatography ในที่สุดได้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่มี specific activity เท่ากับ 243 U mg^{-1} น้ำหนักโมเลกุลของ native *Ps*BFDC มีค่าประมาณ 224 kDa และหน่วยย่อยของเอนไซม์มีน้ำหนัก 56 kDa นั่นคือเอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เหมือนกัน 4 หน่วย เอนไซม์มี isoelectric point (p*I*) ที่ 5.2 ทำงานได้ดีที่สุดในช่วง 35-50 ^{o}C pH 6.0 ค่า K_m สำหรับเบนโซอิลฟอร์เมตคือ 0.69 mM และค่า k_{cat} คือ 222 s^{-1} การศึกษาครั้งนี้ยังสามารถโคลนยีนสำหรับ $NAD^+/NADP^+$-dependent benzaldehyde dehydrogenase จาก *P. stutzeri* ST-201(*Ps*BADH) ซึ่งให้ชื่อว่ายีน *dpgC* และทำให้เกิดการแสดงออกของยีนได้ เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ในวิถีการย่อยสลายแมนดีเลต พบว่าทั้งเอนไซม์ *Ps*BFDC และ *Ps*BADH มีความคล้ายคลึงทั้งในแง่ลำดับกรดอะมิโน (มากกว่า 85% identity) และคุณสมบัติทางจลนศาสตร์กับ homologous enzymes ที่พบใน *P. putida* ATCC 12633 อย่างไรก็ตามเนื่องจาก *P. stutzeri* ST-201 ไม่สามารถเจริญเติบโตได้โดยใช้แมนดีเลต อีกทั้งยีน *dpgB* ก็มิได้เป็นส่วนหนึ่งของโอเปอรอน ดังนั้นเอนไซม์ *Ps*BFDC และ *Ps*BADH ใน *P. stutzeri* ST-201 น่าจะทำหน้าที่ในวิถีการย่อยสลายดี-ฟีนิลกลัยซีน แทนที่จะเป็นวิถีการย่อยสลายแมนดีเลต

103 หน้า

BENZOYLFORMATE DECARBOXYLASE FROM PSEUDOMONAS STUTZERI ST-201: GENE CLONING, ENZYME CHARACTERIZATION AND ROLE IN D-PHENYLGLYCINE DEGRADATION

CHOEDCHAI SAEHUAN 4336653 SCMI/D

Ph.D. (MICROBIOLOGY)

THESIS ADVISORS: VITHAYA MEEVOOTISOM, Ph.D.,
SUTHEP WIYAKRUTTA, Ph.D., PIMCHAI CHAIYEN, Ph.D.,
SARAWUT JITRAPAKDEE, Ph.D.

ABSTRACT

In this study, the role in D-phenylglycine degradation, gene cloning, expression, purification and characterization of a benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas stutzeri* ST-201 (*Ps*BFDC) were investigated. Following induction with D-phenylglycine, both D-phenylglycine aminotransferase and then BFDC activity were detected in cultures of *P. stutzeri* ST-201. Induction with benzoylformate, on the other hand, induced only BFDC activity. Sequential expression of the enzymes demonstrated the role of BFDC in the pathway in a step following D-phenylglycine degradation. Purification and N-terminal sequencing of *Ps*BFDC enabled the design of probes for hybridization in gene cloning. Sequencing of one genomic DNA restriction fragment revealed an open reading frame designated as *dpgB* which encoded *Ps*BFDC. Sequence alignment also suggested that the gene encoded a thiamin-diphosphate dependent enzyme. A *dpgB* gene which consisted of 1,581 bps of nucleotides and encoded a polypeptide of 526 amino acids was expressed with pET17b in *Escherichia coli* BL21 (DE3) and purified to homogeneity in a series of steps including ammonium sulfate fractionation, followed by Phenyl Sepharose FF hydrophobic interaction chromatography, ultrafiltration and Q-Sepharose FF anion-exchange chromatography with specific activity of 243 U mg^{-1}. Molecular weight (M_r) of the native *Ps*BFDC was estimated to be 224 kDa whereas M_r of the enzyme subunit was approximately 56 kDa. This indicated that the enzyme associated as a homotetramer. The isoelectric point (pI) of the enzyme was 5.2. The temperature and pH for maximal activity were 35-50 ^{o}C and 6.0, respectively. K_m value for benzoylformate was 0.69 mM and k_{cat} value was 222 s^{-1}. In addition to *Ps*BFDC, in this study a gene encoding a NAD^+/$NADP^+$-dependent benzaldehyde dehydrogenase (*Ps*BADH) denoted *dpgC* was cloned and expressed. Both *Ps*BFDC and *Ps*BADH had high sequence identities (both greater than 85%) and kinetic properties similar to those of the homologous enzymes in the mandelate pathway of *P. putida* ATCC 12633. However, *P. stutzeri* ST-201 was unable to grow on either isomer of mandelate, and sequencing indicated that the *dpgB* gene did not form part of an operon. Thus it appears that the two enzymes form part of a D-phenylglycine, rather than mandelate, degradation pathway.

KEY WORDS: BENZOYLFORMATE DECARBOXYLASE/ PSEUDOMONAS STUTZERI ST-201/ GENE CLONING/ CHARACTERIZATION/ D-PHENYLGLYCINE DEGRADATION PATHWAY

103 pp.