28 FEB 2000

SCREENING FOR L-PHENYLGLYCINE AMINOTRANSFERASE PRODUCING MICROORGANISM, ENZYME PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

WANIDA KHAMPHA

With compliments
of
บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1999

ISBN 974-663-489-5

TH
W247a
1999

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

43720 e.1

4036439 SCMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY; M.Sc. (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS : L-PHENYLGLYCINE / L-4-HYDROXYPHENYLGLYCINE/ AMINOTRANSFERASE / BRANCHED CHAIN AMINO ACID / PURIFICATION/ CHARACTERIZATION

WANIDA KHAMPHA: SCREENING FOR L-PHENYLGLYCINE AMINOTRANSFERASE PRODUCING MICROORGANISM, ENZYME PURIFICATION AND CHARACTERIZATION. THESIS ADVISORS: VITHAYA MEEVOOTISOM, Ph.D., SUTHEP WIYAKRUTTA, Ph.D., BHINYO PANIJPAN, Ph.D., 189P. ISBN 974-663-489-5

Pseudomonas putida SC-501 was newly isolated from Thai soil under the screening method designed to search for microorganisms capable of producing an enzyme L-phenylglycine aminotransferase (L-PhgAT). The bacterium was induced to produce the enzyme in the minimal medium containing L-phenylglycine as the sole carbon and nitrogen sources. Cell homogenate was prepared and the enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation, isocratic hydrophobic interaction, SP-Sepharose Fast Flow cation exchange, phenyl agarose hydrophobic interaction, and Superdex gel filtration chromatography. The purified enzyme revealed homogeneity by SDS-PAGE analysis. Molecular weight of the native enzyme was estimated to be 67,000. The enzyme was composed of two identical subunits, each with a molecular weight of 35,400. N-terminal amino acid sequence of the enzyme was similar to that of branched-chain amino acid aminotransferases from *Helicobacter pylori* and *Haemophilus influenzae* at about 50% and 46%, respectively. The isoelectric point (p*I*) of the native enzyme was 6.0. The enzyme was most active at pH 9.0. Optimum temperature for enzyme activity was 40-45 °C. The enzyme was found to be stable at up to 45 °C. Substrate specificity was found to be broad with the decreasing preference with L-leucine, L-phenylglycine L-isoleucine, L-lysine, L-methionine, L-alanine, L-aspartate, L-valine, L-p-hydroxyphenylglycine, and L-phenylalanine. No D-amino acid including D-phenylglycine was used as a substrate. The enzyme preferred L-leucine as well as L-phenylglycine as the best amino donor in which 2-oxoglutarate was an amino group acceptor. The apparent K_M values for L-phenylglycine and for 2-oxoglutarate at 30 °C, pH 9.0 were 0.75 mM and 0.18 mM, respectively. The enzyme was strongly inhibited by typical inhibitors of pyridoxal-5′-phosphate-dependent enzymes. In summary L-PhgAT found in the present study is a new enzyme that has not been reported before.

Copyright by Mahidol University

4036439 SCMI/M : สาขาวิชา : จุลชีววิทยา : วท.ม. (จุลชีววิทยา)

วนิดา คำพา : การตรวจหาจุลชีพที่ผลิต แอล-ฟีนิลกลัยซีน อะมิโนทรานสเฟอเรส, การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ และการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ (SCREENING FOR L-PHENYLGLYCINE AMINOTRANSFERASE PRODUCING MICROORGANISM, ENZYME PURIFICATION AND CHARACTERIZATION). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิทยา มีวุฒิสม, Ph.D., สุเทพ ไวยครุฑธา, ปร.ด., ภิญโญ พานิชพันธ์, Ph.D. 189 หน้า. ISBN 974-663-489-5

แบคทีเรีย *Pseudomonas putida* SC-501 แยกได้จากดินในประเทศไทย ด้วยการตรวจหาจุลชีพที่สามารถผลิต L-phenylglycine aminotransferase (L-PhgAT) เชื้อแบคทีเรียถูกเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี L-phenylglycine เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเท่านั้น เซลล์โฮโมจีเนทได้ถูกเตรียมขึ้นและได้ทำการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ต่อด้วย isocratic hydrophobic interaction, SP-sepharose Fast Flow cation exchange, phenyl agarose hydrophobic interaction, และ Superdex gel filtration chromatography เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติมีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 67,000 ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 35,400 ลำดับ amino acid ด้าน N-terminal ของเอนไซม์นี้มีความคล้ายกับ branched-chain amino acid aminotransferases ของเชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Haemophilus influenzae* ประมาณ 50 % และ 46 % ตามลำดับ เอนไซม์มีค่า isoelectric point (p*I*) เท่ากับ 6.0, มีฤทธิ์สูงสุดที่ pH 9.0, ที่อุณหภูมิ 40-45 °ซ และสามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 45 °ซ เอนไซม์นี้ใช้ substrates ได้หลายชนิดมีความชอบตามลำดับมากไปน้อยคือ L-leucine, L-phenylglycine L-isoleucine, L-lysine, L-methionine, L-alanine, L-aspartate, L-valine, L-p-hydroxyphenylglycine, และ L-phenylalanine เอนไซม์นี้ไม่สามารถใช้ D-amino acid ซึ่งรวมทั้ง D-phenylglycine ด้วย ความชอบในการใช้หมู่อะมิโนพบว่าของ L-leucine ดีที่สุดเท่า ๆ กับ L-phenylglycine โดยใช้ 2-oxoglutarate เป็นตัวรับหมู่อะมิโน ค่า K_M ของเอนไซม์สำหรับ L-phenylglycine และ 2-oxoglutarate ที่อุณหภูมิ 30 °ซ, pH 9.0 คือ 0.75 และ 0.18 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ตัวยับยั้งทั่วไปที่มีผลต่อ pyridoxal phosphate สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ชะงัด โดยสรุปเอนไซม์ที่พบในการศึกษานี้เป็นเอนไซม์ใหม่ที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อน

Copyright by Mahidol University