

เอนไซม์ phytase มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซึ่งมีความจำเพาะต่อสับสเตรต phytic acid (myo-inositol -1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate; IP<sub>6</sub>) หรือเกลือของ phytate ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โมเลกุล phytic acid ที่มีหมู่ฟอสเฟต 1 ถึง 5 กลุ่ม และ สาร inorganic phosphates ปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์ phytase มาผสมลงในอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น สุนัขและไก่ ซึ่งในระบบย่อยอาหารจะไม่มีเอนไซม์ phytase ทำให้สัตว์กระเพาะเดี่ยวสามารถนำแร่ธาตุฟอสฟอรัส จากสาร inorganic phosphates ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ phytase มาใช้ในการเจริญเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่น ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis พบว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 มีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ความจำเพาะต่อค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และ ความหลากหลายต่อสับสเตรต จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence alignment) ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* กับ *A. niger* TR170 phytase (PhyA 170) พบว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 ของ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* ตรงกับ กรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 และเมื่อทำการสร้างโครงสร้างจำลองสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 (PhyA170) โดยอาศัยโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 ที่ 2.5 Å เป็นต้นแบบ พบว่ากรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 อยู่ในบริเวณ active site ของเอนไซม์ เพื่อศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนตำแหน่งนี้ จึงทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 50 ด้วยเทคนิค site-directed mutagenesis พบว่าโปรตีนกลายทุกชนิดถูกผลิตเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนซึ่งมีขนาดประมาณ 66 kDa ในยีสต์ *Pichia pastoris* และพบว่าโปรตีนกลายทุกชนิดยังคงคุณสมบัติการทนต่อความร้อนและสภาวะความเป็นกรด-เบสในช่วงกว้างได้เช่นเดียวกับโปรตีนดั้งเดิม โปรตีนกลาย Q50A Q50I Q50N Q50P Q50T Q50V และ Q50S มีค่าอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่ 50 องศาเซลเซียส และ 5.5 ตามลำดับ เหมือนกับโปรตีนดั้งเดิม แต่โปรตีนกลาย Q50G และ Q50L จะมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 4.5 โดยโปรตีนกลาย Q50P มีค่า specific activity สูงกว่าโปรตีนกลายชนิดอื่นๆ และสูงกว่าโปรตีนดั้งเดิมเกือบ 2 เท่า และ มีค่า  $K_m$   $V_{max}$  และ  $k_{cat}$  สูงกว่าโปรตีนดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกลาย Q50P มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาที่ดีกว่าโปรตีนดั้งเดิม แต่

มีความเสถียรในการจับกับสับสเตรต phytic acid น้อยกว่าโปรตีนดั้งเดิม และจากการสร้างแบบจำลองการจับกันระหว่างสับสเตรต phytic acid กับ เอนไซม์ phytase พบว่า โปรตีนกลาย Q50L ที่มีการแทนที่ด้วยกรดอะมิโน Glutamine ด้วย Leucine ซึ่งมีหมู่ข้างที่ยาวกว่าโปรตีนดั้งเดิม และอยู่ในตำแหน่งที่มีผลรบกวนการจับกันของเอนไซม์กับสับสเตรต phytic acid ในขณะที่กรดอะมิโน Proline ในโปรตีนกลาย Q50P ซึ่งมีหมู่ข้างขนาดใกล้เคียงและไม่มีขั้วเช่นเดียวกับกรดอะมิโน Glutamine ในโปรตีนดั้งเดิม ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อ การจับกับสับสเตรต phytic acid น้อยกว่า และจากค่า  $k_{cat}$  ของโปรตีนกลาย Q50P ที่สูงกว่าโปรตีนดั้งเดิม อาจเป็นผลจากการที่กรดอะมิโนหลักในการเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ R85 และ D362 ของโปรตีนกลาย Q50P มีระยะห่างระหว่างอะตอมออกซิเจนของหมู่ฟอสเฟตเป้าหมายน้อยกว่าโปรตีนดั้งเดิม ทำให้มีการปลดปล่อยหมู่ฟอสเฟตเป้าหมายได้เร็วกว่าโปรตีนดั้งเดิม ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่ากรดอะมิโน Glutamine ที่ 50 ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 (PhyA170) น่าจะมีความสำคัญในการส่งเสริมการเข้าถึงสับสเตรต phytic acid เพื่อเร่งปฏิกิริยาการทำลายพันธะเพื่อปลดปล่อยหมู่ฟอสเฟตซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ออกจาก active site ของเอนไซม์

Phytases catalyze the hydrolysis of the phosphate moieties from phytic acid. . Phytases are used as feed additive for simple-stomached animals, such as swine and poultry. Addition of this phytase to feed substantially improved phosphorus utilization reduced excretion of phosphorus in the feces. . Previous studies showed that site-directed mutagenesis of Q27 (Q50 in *A. niger* TR170 phytase) of *Aspergillus fumigatus* phytase had a significant effect on specific activity, pH activity profile and substrate specificity. Amino acid sequence alignment of *A. fumigatus* phytase and *A. niger* TR170 phytase (PhyA 170) showed that Q50 is strictly conserved. By using the crystal structure of *A. niger* NRRL 3135 phytase at 2.5Å resolution as the template structure, the model structure of *A. niger* TR170 phytase (PhyA170) was built and found Q50 in the area of active site. In this study we used site-directed mutagenesis to analyze the function of Q50 of PhyA170. Q50 was substituted to nine amino acids; Q50A, Q50G, Q50I, Q50L, Q50N, Q50P , Q50T, Q50V, and Q50S. All mutants can be expressed as 66 kDa recombinant proteins in *Pichia pastoris* and the catalytic activity of nine mutant proteins were investigated. We found that Q50A, Q50I, Q50N, Q50P , Q50T, Q50V, and Q50S mutants as well as the wild-type have optimal temperature and pH for phytase activity at 50°C and pH 5.5, respectively. Q50G, and Q50L mutants have relatively the same optimal temperature as other mutants but their optimum pH is 4.5. Q50P mutant has the highest specific activity compared to other mutants and higher than the wild-type phytase at 50°C, pH 5.5. All of nine mutants still contain broad pH stability and thermostability especially Q50P mutant which has higher broad pH stability and thermostability than that of wild type. Q50P mutant showed higher  $K_m$ ,  $V_{max}$  and  $k_{cat}$  than the wild-type suggested that the rate of catalytic reaction of Q50P mutant is higher than that of wild-type but the stability of Q50P mutant structure in complex with phytic acid is less than the wild-type. The model of phytic acid-phytase complex showed that substitution of Q50 by Leucine caused interfere of enzyme-

substrate binding by the longer sidechain of Leucine and substitution of Q50 by Proline which has relatively the same side chain as Glutamine has lower effect in enzyme-substrate binding. Q50P mutant has higher  $k_{cat}$  than in wild-type enzyme may caused by the less distance between catalytic residues (R85, D362) of Q50P and oxygen atom of target phosphate than in wild-type. The results suggested that Q50 facilitates the hydrolysis of phosphodiester bond to liberate the phosphate group as a product from the active site of *A. niger* TR170 phytase (PhyA170).