

การปรับปรุงวิธีการตรึงฟีนอละลาโนน ดีไฮโดรจินเนสเพื่อการผลิตฟีนอละลาโนน

นางสาวนิภาวรรณ คั่นใจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**IMPROVEMENT OF THE PHENYLALANINE DEHYDROGENASE  
IMMOBILIZATION METHOD FOR THE PRODUCTION OF  
PHENYLALANINE**

**Miss Nipawan Tanchai**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology**

**Faculty of Science**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 2007**

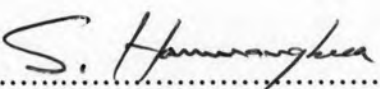
**Copyright of Chulalongkorn University**

**500481**

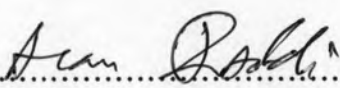
Thesis Title           IMPROVEMENT    OF    THE    PHENYLALANINE  
                          DEHYDROGENASE IMMOBILIZATION METHOD FOR  
                          THE PRODUCTION OF PHENYLALANINE  
By                       Miss Nipawan Tanchai  
Field of Study        Biotechnology  
Thesis Advisor       Assistant Professor Manchumas Prousoontorn, Ph.D.  
Thesis Co-Advisor   Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.

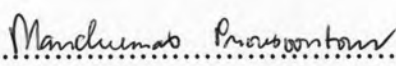
---

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

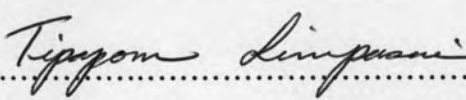
  
.....Dean of the Faculty of Science  
(Professor Supot Hannongbua, Ph.D.)

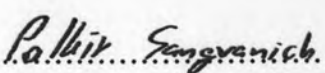
#### THESIS COMMITTEE

  
..... Chairman  
( Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

  
..... Thesis Advisor  
(Assistant Professor Manchumas Prousoontorn, Ph.D.)

  
..... Thesis Co-Advisor  
(Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

  
..... Member  
(Associate Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

  
..... Member  
(Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)

นิภาวรรณ ตันใจ : การปรับปรุงวิธีการตรึงฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนสเพื่อการผลิตฟีนิลอะลานีน (IMPROVEMENT OF THE PHENYLALANINE DEHYDROGENASE IMMOBILIZATION METHOD FOR THE PRODUCTION OF PHENYLALANINE) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร มัญจมาศ เพราะสุนทร, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, 162 หน้า.

ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจิเนส (PheDH) ที่ผลิตจากรีคอมบิแนนท์โคลนของ *Escherichia coli* ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและแยกโดยคอลัมน์ดีไอเออีโทโยเพิร์ล พบว่าเอนไซม์มีแอกติวิตีคองเหลือ 20.2 เปอร์เซ็นต์และมีความบริสุทธิ์ขึ้น 2.6 เท่า เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 44.5 กิโลดาลตัน การตรวจหากรดอะมิโนจำเป็นของเอนไซม์ด้วยวิธีการตัดแปรทางเคมีพบว่า กรดอะมิโนทริปโตเฟน เมทไธโอนีน ฮิสติดีน และไลซีน อาจเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นจึงทำการศึกษาวิธีการตรึงเอนไซม์หลายวิธี โดยทำการตรึงเอนไซม์ผ่านหมู่อะมิโน คาร์บอกซิลิก และวิธีดูดซับเอนไซม์บนวัสดุหลายชนิด ได้แก่ ซิลิกา อลูมินา ไคโตซาน อีพอกซี-อลูมินา และ อีพอกซี-ไคโตซาน พบว่าการตรึงเอนไซม์ผ่านหมู่คาร์บอกซิลิกบนซิลิกาโดยใช้คาร์โบไดอิมิดเป็นตัวกระตุ้นให้แอกติวิตีของเอนไซม์ตรึงมากที่สุด ภาวะที่เหมาะสมในการตรึงคือการกระตุ้นหมู่คาร์บอกซิลิกของเอนไซม์เป็นเวลา 6 ชั่วโมงด้วยสารละลายคาร์โบไดอิมิดเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำเอนไซม์ 25 ยูนิตมาบ่มกับซิลิกา 500 มิลลิกรัมที่ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายอะมิโนโพรพิลไตรเอทอกซีไซเลนเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็นเวลา 21 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าจะสามารถตรึงเอนไซม์ได้ 1.41 ยูนิต คิดเป็น 5.17 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีของเอนไซม์เริ่มต้น เมื่อเปรียบเทียบสมบัติเอนไซม์ตรึงกับเอนไซม์อิสระโดยอาศัยปฏิกิริยากู้ควบกับโคอะฟอเรส พบว่าเอนไซม์ตรึงและเอนไซม์อิสระมีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 9.5 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 5.0 ถึง 12.0 ในขณะที่เอนไซม์อิสระจะมีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 5.0 ถึง 8.5 เอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์อิสระเล็กน้อยและมีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์อิสระในการเก็บระยะยาวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำเอนไซม์ตรึงมาใช้ในการผลิตแอลฟีนิลอะลานีนแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าเอนไซม์ตรึงสามารถผลิตแอลฟีนิลอะลานีนได้ 58 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มกับฟีนิลไพรูเวท 5 ไมโครโมลที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมงและมีแอกติวิตีคองเหลือ 84 เปอร์เซ็นต์ภายหลังการใช้งาน 3 ครั้ง จากนั้นนำเอนไซม์ตรึงไปใช้ในการผลิตกรดอะมิโนรูปแบบแอลชนิดต่างๆ จากสับสเตรทที่เป็นกรดคีโต พบว่าได้ผลผลิตในช่วง 62.5-100 เปอร์เซ็นต์

สาขาวิชา...เทคโนโลยีชีวภาพ.....

ปีการศึกษา.....2550.....

ลายมือชื่อนิสิต ..... จิภาวรรณ ตันใจ .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... มัญจมาศ เพราะสุนทร .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ..... กนกทิพย์ ภักดีบำรุง .....

## 487 23372 23: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: PHENYLALANINE DEHYDROGENASE/ IMMOBILIZATION/ SILICA SUPPORT

NIPAWAN TANCHAI: IMPROVEMENT OF THE PHENYLALANINE DEHYDROGENASE IMMOBILIZATION METHOD FOR THE PRODUCTION OF PHENYLALANINE. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. MANCHUMAS PROUSOONTORN, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASST. PROF. KANOKTIP PACKDIBAMRUNG, Ph.D., 162 pp.

Phenylalanine dehydrogenase (PheDH) produced from recombinant *Escherichia coli* was partially purified by ammonium sulfate precipitation and DEAE-Toyopearl column chromatography with a 20.2% yield and 2.6 purification fold. The enzyme had a molecular weight of 44.5 kDa. The enzyme was chemically modified with a series of group-specific reagents to identify essential amino acid residues. It was found that tryptophan, methionine, histidine and lysine residues may play an important role in the enzyme catalysis. Different immobilization methods were then used, i.e. immobilization via its amino groups, carboxylic groups and ionic interaction on various supports including silica, alumina, chitosan, epoxy-alumina and epoxy-chitosan. The immobilization of PheDH via its carboxylic groups by using carbodiimide gave the highest immobilized activity on silica. The optimum condition for enzyme immobilization was to activate carboxylic groups of the enzyme for 6 hours using 10 mM carbodiimide. Twenty five units of activated PheDH were then added to the silica (500 mg) which was activated with 2% (v/v)  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane and incubated for 21 hours at 4°C. The activity of the immobilized enzyme was 1.41 U/g support with 5.17% of immobilization yield. When compared to the free enzyme, using coupled reaction with diaphorase, both enzymes showed the same optimum pH at 9.5 and the optimum temperature at 40°C. The immobilized enzyme was stable over the pH range of 5.0-12.0 whereas the free enzyme was in the range 5.0-8.5. The immobilized enzyme had slightly higher temperature stability and storage stability at room temperature over the free enzyme. When the immobilized PheDH was used in batch production of L-phenylalanine, the immobilized PheDH produced L-phenylalanine 58% yield when incubated with 5  $\mu$ mol of phenylpyruvate at room temperature for 6 hours and retained its activity up to 84% after being used for three cycles. The immobilized PheDH was further applied for the production of amino acids using their corresponding keto acids as substrates, the product yields were ranging between 62.5-100%.

Field of study.....Biotechnology....

Academic year.....2007.....

Student's signature.....Nipawan Tanchai

Advisor's signature.....Manchumas Prosoontorn

Co-Advisor's signature.....Kanoktip Packdibamrung

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my appreciation to my admirable advisor, Assist. Prof. Dr. Manchumas Prousoontorn for her great advice, encouragement and her kind support throughout this thesis. My gratitude is also extended to my co-adviser, Assist. Prof. Dr. Kanoktip Packdibamrung, for her excellent guidance, suggestion and comment.

In addition, I also would like to thank Prof. Dr. Aran Incharoensakdi, Assoc. Prof. Dr. Tipaporn Limpaseni and Assoc. Prof. Dr. Polkit Sangvanich, serving as the members of the master committees, for their helpful suggestions and comments.

For all friends of the Department of Biochemistry and Biotechnology program, I am pleased to tell that I thank for their assistance and friendships.

Eventually, the big gratitude is expressed to my family for their understanding, helping, supporting whereas I have spent a lot of time with this thesis rather than with them.

This work was supported in part by the Grant from Graduate School.

## CONTENTS

	<b>Page</b>
ABSTRACT (THAI) .....	iv
ABSTRACT (ENGLISH) .....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Phenylalanine dehydrogenase .....	1
1.2 Purification of phenylalanine dehydrogenase .....	3
1.3 Basic molecular and catalytic properties of phenylalanine dehydrogenase.....	4
1.4 Structure of phenylalanine dehydrogenase.....	10
1.5 Current method for phenylalanine production.....	12
1.6 Enzyme immobilization.....	19
1.6.1 Method of immobilization.....	19
1.6.2 Comparison of immobilization techniques.....	23
1.6.3 Review of phenylalanine dehydrogenase immobilization.....	23
1.7 Objectives of this research.....	28
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	31
2.1 Equipments.....	31
2.2 Chemicals.....	32
2.3 Bacterial strain.....	34
2.4 Bacteria growth medium.....	34
2.5 Free enzyme assay.....	35

	<b>Page</b>
2.6 Protein measurement.....	35
2.7 Partial purification of phenylalanine dehydrogenase.....	36
2.7.1 Enzyme production.....	36
2.7.2 Crude extract preparation.....	36
2.7.3 Purification procedures of phenylalanine dehydrogenase.....	37
2.8 Effect of group-specific reagents on phenylalanine dehydrogenase activity.....	40
2.9 Immobilization of phenylalanine dehydrogenase.....	42
2.9.1 Preparation of supports.....	42
2.9.2 Surface modification of the carriers.....	43
2.9.3 Enzyme coupling.....	45
2.10 Colorimetric method for the determination of phenylalanine dehydrogenase activity.....	48
2.11 Optimization of phenylalanine dehydrogenase immobilization.	49
2.12 Calculation of the immobilized yield.....	49
2.13 Characterization of the catalytic properties of the immobilized phenylalanine dehydrogenase.....	50
2.13.1 Effect of pH on the phenylalanine dehydrogenase activity.....	50
2.13.2 Effect of temperature on the phenylalanine dehydrogenase activity.....	50
2.13.3 Effect of pH on the phenylalanine dehydrogenase stability.....	50
2.13.4 Effect of temperature on the phenylalanine dehydrogenase stability.....	51
2.13.5 Storage stability.....	51
2.13.6 Batch reusability of immobilized enzyme.....	51
2.14 Synthesis of amino acids from their keto acids using immobilized phenylalanine dehydrogenase.....	52



	<b>Page</b>
2.14.1 phenylalanine and other amino acids production.....	52
2.14.2 Determination of phenylalanine and other amino acids produced in the reaction by thin-layer chromatography (TLC).....	52
2.14.3 Semiquantitative product analysis.....	53
<b>CHAPTER III RESULTS.....</b>	<b>54</b>
3.1 Partial purification of phenylalanine dehydrogenase.....	54
3.1.1 Preparation of crude extract.....	54
3.1.2 Ammonium sulfate precipitation.....	54
3.1.3 DEAE-Toyopearl column chromatography.....	54
3.1.4 Determination of enzyme purity and protein pattern on non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.....	56
3.2 Effect of group-specific reagents on phenylalanine dehydrogenase.....	61
3.3 Selection of a suitable solid support and an appropriate method of surface activation.....	63
3.3.1 Immobilization via its amino groups.....	63
3.3.2 Immobilization via ionic interaction.....	73
3.3.3 Immobilization via its carboxylic groups.....	77
3.4 Optimization of the immobilization method.....	77
3.4.1 Effect of activation time.....	81
3.4.2 Effect of immobilization time.....	81
3.4.3 Effect of the APTS concentration.....	81
3.4.4 Effect of the carbodiimide concentration.....	85
3.4.5 Effect of enzyme concentration.....	85
3.5 Characterization of the free and immobilized phenylalanine dehydrogenase.....	88
3.5.1 Effect of pH on phenylalanine dehydrogenase activit.....	88

	<b>Page</b>
3.5.2 Effect of temperature on phenylalanine dehydrogenase activity.....	88
3.5.3 Effect of pH on phenylalanine dehydrogenase stability.....	88
3.5.4 Effect of temperature on phenylalanine dehydrogenase stability.....	91
3.5.5 Storage stability.....	91
3.5.6 Batch reusability of immobilized PheDH for L-phenylalanine production.....	95
3.6 Production of amino acids .....	95
<b>CHAPTER IV DISCUSSION.....</b>	<b>101</b>
4.1 Partial purification of phenylalanine dehydrogenase from recombinant <i>E. coli</i> .....	102
4.2 Effect of group specific reagents on phenylalanine dehydrogenase activity.....	104
4.3 Selection of a suitable solid support and an appropriate method for the surface activation.....	106
4.4 Optimization of immobilization of phenylalanine dehydrogenase.....	111
4.5 Properties of the immobilized phenylalanine dehydrogenase on silica.....	113
4.6 Synthesis of amino acids from their keto acids using immobilized enzyme.....	117
<b>CHAPTER V CONCLUSION.....</b>	<b>119</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>121</b>
<b>APPENDICES.....</b>	<b>130</b>
<b>BIOGRAPHY.....</b>	<b>162</b>

**LIST OF TABLES**

	<b>Page</b>
1.1 Properties of phenylalanine dehydrogenase from various sources.....	5
1.2 Synthesis of L-amino acids from keto acids by <i>S. ureae</i> PheDH and <i>C. boidinii</i> FDH.....	18
1.3 Comparison of the attributes of different classes of immobilization Techniques.....	24
3.1 Purification of recombinant phenylalanine dehydrogenase from <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	57
3.2 Effect of various group-specific reagents on phenylalanine dehydrogenase from <i>Escherichai coli</i> BL 21 (DE3).....	62
3.3 Rf value of product from each reaction separated by TLC.....	99

## LIST OF FIGURES

	Page
1.1 The reaction of L-phenylalanine dehydrogenase.....	2
1.2 Stereospecificity of hydrogen transfer of NADH catalyzed with dehydrogenases.....	11
1.3 Structure of <i>Rhodococcus</i> sp. M4 phenylalanine dehydrogenase.....	13
1.4 Enzymatic synthesis of L-phenylalanine with coenzyme regeneration....	15
1.5 Enzymatic routes for the preparation of L-phenylalanine.....	17
1.6 Immobilized enzyme system.....	20
1.7 Schematic representation of an NADH-detecting biosensor.....	27
3.1 Purification of phenylalanine dehydrogenase from pBLPheDH clone by DEAE-Toyopearl column.....	55
3.2 Non-denaturing PAGE of recombinant phenylalanine dehydrogenase expressed in <i>E. coli</i> .....	58
3.3 SDS polyacrylamide gel electrophoresis of phenylalanine dehydrogenase from recombinant <i>E. coli</i> . ....	59
3.4 Calibration curve for molecular weight of phenylalanine dehydrogenase subunit from recombinant <i>E. coli</i> on SDS polyacrylamide gel electrophoresis.....	60
3.5 Schematic diagram showing an approach of covalent attachment of PheDH to inorganic support using glutaraldehyde as a cross-linking agent.....	64
3.6 Influence of APTS concentrations on the amount of PheDH immobilization on silica.....	66
3.7 Influence of glutaraldehyde concentrations on the PheDH immobilization on silica.....	67
3.8 Influence of coupling time on the amount of PheDH immobilization on silica.....	68
3.9 Influence of the amount of PheDH applied on the exhibited activity.....	70
3.10 The optimal conditions for PheDH immobilization on silica by activation with APTS and crosslinking with glutaraldehyde.....	71

	<b>Page</b>
3.11 Schematic diagram showing the preparation of epoxy activated support using 1,4-butanedioldiglycidyl ether and was converted into amino-group with 1,6-diaminohexane.....	72
3.12 Immobilization of phenylalanine dehydrogenase by 1,6-diaminohexane method.....	74
3.13 Immobilization of phenylalanine dehydrogenase via ionic interaction by using polyethyleneimime.....	75
3.14 Immobilization of phenylalanine dehydrogenase by polyethyleneimine (PEI) method.....	76
3.15 Schematic illustration of activation of carboxyl groups by EDC for the covalent immobilization of enzyme.....	78
3.16 Immobilization of phenylalanine dehydrogenase by carbodiimime (EDC) method.....	79
3.17 Immobilization of phenaylanine dehydrogenase on various support materials and different activation method.....	80
3.18 Influence of activation time on the amount of phenylalanine dehydrogenase immobilized on silica.....	82
3.19 Influence of APTS concentration on the amount phenylalanine dehydrogenase immobilized on silica.....	83
3.20 Influence of APTS concentration on the amount phenylalanine dehydrogenase immobilized on silica.....	84
3.21 Influence of coupling time on the amount phenylalanine dehydrogenase immobilization on silica.....	86
3.22 Influence of PheDH concentration on the amount phenylalanine dehydrogenase immobilization on silica.....	87
3.23 Effect of pH on the activity of free and immobilized phenylalanine dehydrogenase.....	89
3.24 Effect of temperature on the activity of free and immobilized phenylalanine dehydrogenase.....	90
3.25 Effect of pH on the stability of free and immobilized phenylalanine dehydrogenase.....	92
3.26 Effect of temperature on the stability of free and immobilized	

phenylalanine dehydrogenase.....	93
3.27 Storage stability at room temperature (A), and 4°C (B) of the free and immobilized PheDH on aminated silica.....	94
3.28 Batch reusability of immobilized phenylalanine dehydrogenase on silica for L-phenylalanine production.....	96
3.29 TLC chromatogram illustrating the production of L-phenylalanine.....	97
3.30 TLC analysis of the products catalyzed by the immobilized phenylalanine dehydrogenase.....	98

## LIST OF ABBREVIATIONS

APTS	$\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane
BSA	bovine serum albumin
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
CT	chloramines T
Da	Dalton
DEAE	diethylaminoethyl
DECP	diethylpyrocarbonate
DTT	dithiothreitol
EDC	<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimide hydrochloride
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
G	gram
GluDH	glutamate dehydrogenase
GlyDH	glycine dehydrogenase
HPLC	high-performance liquid chromatography
HCl	hydrochloric acid
IPTG	isopropyl-thiogalactoside
KCl	potassium chloride
kDa	kiloDalton
$K_m$	Michaelis constant
KOH	potassium hydroxide
l	liter
LB	Luria-Bertani
LeuDH	leucine dehydrogenase
$\mu\text{g}$	microgram
$\mu\text{l}$	microliter
$\mu\text{M}$	micromolar
M	mole per liter (molar)
mA	milliampere
mg	milligram
ml	milliliter
mM	millimolar

MW	molecular weight
N	normal
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized)
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NAI	<i>N</i> -acetylimidazole
NaOH	sodium hydroxide
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
ng	nanogram
nm	nanometer
NH <sub>4</sub> Cl	ammonium chloride
NH <sub>4</sub> OH	ammonium hydroxide
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ammonium sulfate
OD	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PEI	polyethyleneimine
<i>phedh</i>	phenylalanine dehydrogenase gene
PheDH	phenylalanine dehydrogenase
pI	isoelectric point
pmol	picomole
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethyl ethylene diamine
TLC	thin-layer liquid chromatography
TNBS	2, 4, 6- Trinitrobenzene sulfonic acid
U	unit
UV	ultraviolet
V	voltage
v/v	volume by volume
WST-1	water soluble tetrazolium
w/w	weight by weight