# การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์ และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

นางสาว ปิยะรัตน์ พึ่งแสงธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-639-076-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17939185

# SCREENING OF PYRIDINE NUCLEOTIDE - DEPENDENT L-ALANINE DEHYDROGENASE PRODUCING BACTERIA AND PURIFICATION OF THE ENZYME

Miss Piyarat Phungsangthum

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biochemistry
Department of Biochemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997

ISBN 974-639-076-7

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการ ไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ |
| โดย | นางสาว ปิยะรัตน์ พึ่งแสงธรรม |
| ภาควิชา | ชีวเคมี |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | อาจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง |

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุลัญญา สุนทรส)

ปิยะรัตน์ พึ่งแสงธรรม: การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (SCREENING OF PYRIDINE NUCLEOTIDE - DEPENDENT L-ALANINE DEHYDROGENASE PRODUCING BACTERIA AND PURIFICATION OF THE ENZYME) อ.ที่ปรึกษา : อ.ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, 99 หน้า. ISBN 974-639-076-7.

การคัดเลือกแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์จากแบคทีเรียในดิน พบว่าไอโซเลทที่มีค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ชนิดนี้สูงสุด คือ *Aeromonas hydrophila* ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารอุดม peptone 1 เปอร์เซนต์ในระดับขวดเขย่า คือ pH 4.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและแยกโดยโครมาโตกราฟฟีคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส คอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ คอลัมน์บลูเซฟาโรสและเซฟาเด็กซ์จี-200 เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ขึ้น 100 เท่า น้ำหนักโมเลกุลของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสซึ่งวิเคราะห์โดยใช้เซฟาเด็กซ์จี-200 เท่ากับ 230,000 ดาลตัน การวิเคราะห์ด้วยเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิสแสดงว่าเอนไซม์แอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสประกอบด้วย 6 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 40,000 ดาลตัน เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงมาก โดยเฉพาะปฏิกิริยา oxidative deamination และมีความจำเพาะต่อ $NAD^+$ สูงเช่นกัน นอกจากนี้พบว่าหมู่ซัลไฟดิลน่าจะมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเร่งปฏิกิริยา reductive amination และ oxidative deamination คือ 45 และ 55 องศาเซลเซียสตามลำดับ และเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสนาน 16 ชั่วโมง ค่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา reductive amination และ oxidative deamination คือ pH 8.0 และ 10.5 ตามลำดับ จากการศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ตลอดจนการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา (product inhibition) แสดงให้เห็นถึงกลไกของปฏิกิริยาเป็นแบบ sequential ordered binary-ternary mechanism ซึ่งจะมีลำดับการจับของสับสเตรทคือ $NAD^+$ จับกับเอนไซม์ก่อนตามด้วยแอล-อะลานีนแล้วปล่อยไพรูเวทออกมาตามด้วยแอมโมเนียและ NADH ตามลำดับ ค่า *Km* ของ $NAD^+$ แอล-อะลานีน ไพรูเวท แอมโมเนีย และ NADH เท่ากับ 0.17, 20, 1.33, 77 และ 0.25 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลาย N คือ MIIGVPTEIANHELRVGMSV

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต ปิยะรัตน์ พึ่งแสงธรรม

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา กนกทิพย์ ภักดีบำรุง

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

## #C826190 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: L-ALANINE DEHYDROGENASE / *Aeromonas hydrophila* / SCREENING / PURIFICATION / CHARACTERIZATION
PIYARAT PHUNGSANGTHUM : SCREENING OF PYRIDINE NUCLEOTIDE-DEPENDENT L-ALANINE DEHYDROGENASE PRODUCING BACTERIA AND PURIFICATION OF THE ENZYME. THESIS ADVISOR : KANOKTIP PACKDIBAMRUNG, Ph. D. 99 pp. ISBN 974-639-076-7.

Alanine dehydrogenase producing bacteria was screened from soil and the isolate which produced the highest enzyme activity was identified as *Aeromonas hydrophila* . Optimum conditions for producing L-alanine dehydrogenase in 1% peptone medium were pH 4.5 at 25 degree celcius for 24 hours. L-alanine dehydrogenase was purified 100 folds from culture of *Aeromonas hydrophila* by using ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose column, hydroxyapatite column, Blue Sepharose column and Sephadex G-200 column. Molecular weight of 230,000 daltons was estimated for L-alanine dehydrogenase by Sephadex G-200 chromatography. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the purified L-alanine dehydrogenase showed 1 polypeptide band with the molecular weight of 40,000 daltons, indicating that the enzyme is the hexamer. L-alanine dehydrogenase is highly specific for L-alanine and $NAD^+$. Sulfhydyl group of the enzyme plays an important role in the catalysis. Optimum temperature for reductive amination and oxidative deamination were 45 and 55 degree celcius, respectively. Enzyme activity remained high when incubated at 55 degree celcius for 16 hours. The optimum pH for reductive amination was 8.0 while the reverse reaction rate was highest at pH 10.5. The steady state kinetic studies including product inhibition on the enzyme reaction indicated that the oxidative deamination proceeds through a sequential ordered binary-ternary mechanism in which $NAD^+$ binds first to the enzyme followed by L-alanine and products are released in the order of pyruvate, ammonia and NADH, respectively. The *Km* values for $NAD^+$, L-alanine, pyruvate, ammonia and NADH were 0.17, 20, 1.33, 77 and 0.25 millimolar, respectively. N-terminal amino acid sequence of the enzyme was MIIGVPTEIANHELRVGMSV.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต ปิยะรัตน์ พึ่งเสงี่ยม

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [illegible]

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของอาจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการวิจัยมาด้วยดีตลอด

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งรองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา สุนทรส ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณท่านอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความรู้และประสบการณ์แก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคคลากรทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้มาโดยตลอด

และเนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับมาจาก สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูป ..... ญ
คำย่อ ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ ..... 1
2. วัสดุและวิธีการทดลอง ..... 15
    2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง ..... 15
    2.2 อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ..... 16
    2.3 การเตรียมสารละลาย ..... 17
    2.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถใช้แอล-อะลานีนเป็นสารต้นตอของคาร์บอนและไนโตรเจน ..... 21
    2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์ ..... 21
    2.6 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ..... 25
    2.7 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในแบคทีเรียที่เลี้ยงในระดับขวดเขย่า ..... 25
    2.8 การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียปริมาณมาก ..... 27
    2.9 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ (cell free extract) ปริมาณมาก ..... 27
    2.10 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ..... 28
    2.11 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ ..... 33
    2.12 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ ..... 37
    2.13 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ..... 40
3. ผลการทดลอง ..... 41
    3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถใช้แอล-อะลานีนเป็นสารต้นตอของคาร์บอนและไนโตรเจน ..... 41

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์ ..... 41
3.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสในแบคทีเรียที่เลี้ยงในระดับขวดเขย่า ..... 44
3.4 การทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสให้บริสุทธิ์ ..... 48
3.5 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ ..... 57
3.6 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ ..... 68
3.7 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ..... 76
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง ..... 82
รายการอ้างอิง ..... 91
ภาคผนวก ..... 95
ประวัติผู้เขียน ..... 99

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แอล-อะมิโนแอซิดดีไฮโดรจิเนสชนิดต่างๆ ที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์ ..... 4
2. สมบัติบางประการของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ..... 6
3. แอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสในสารละลายเอนไซม์ของแบคทีเรียที่แยกได้ ..... 42
4. ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 ..... 43
5. ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ..... 49
6. ผลการทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ให้บริสุทธิ์ ..... 56
7. ผลของสารเคมีที่มีต่อแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส ..... 64
8. ค่า $K_m$ ของสับสเตรทชนิดต่างๆ ของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ..... 75
9. รูปแบบการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ..... 80
10. การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* กับเอนไซม์จากสายพันธุ์ต่างๆ ใน GENBANK ..... 80

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1. | แผนภาพปฏิกิริยาของแอล-อะมิโนแอซิดดีไฮโดรจิเนส | 3 |
| 2. | แผนภาพปฏิกิริยาของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส | 3 |
| 3. | stereospecificity ของการถ่ายโอนไฮโดรเจนอะตอมของ NADH ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยดีไฮโดรจิเนส | 7 |
| 4. | กลไกการเร่งปฏิกิริยาของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ | 9 |
| 5. | การผลิตแอล-อะลานีนโดยวิธี ultrafiltration membrane reactor | 11 |
| 6. | ระบบเอนไซม์หลายชนิดในการผลิตกรดอะมิโนฟอร์มดี | 11 |
| 7. | ระบบการตรวจสอบแกมมา-กลูตามิลไซโคลทรานสเฟอเรส | 13 |
| 8. | ขั้นตอนการทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ให้บริสุทธิ์ | 29 |
| 9. | ผลของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* และแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส | 45 |
| 10. | ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* และแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส | 46 |
| 11. | รูปแบบการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* และแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่เวลาต่างๆ | 47 |
| 12. | ผลการแยกเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตโดยผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส | 51 |
| 13. | ผลการแยกเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสโดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ | 52 |
| 14. | ผลการแยกเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์โดยผ่านคอลัมน์บลูเซฟาโรส | 54 |
| 15. | ผลการแยกเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์บลูเซฟาโรสโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 | 55 |
| 16. | รูปแบบของโปรตีนในแต่ละขั้นตอนของการทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสให้บริสุทธิ์เทียบกับผลการย้อมสีแอคติวิตี | 58 |
| 17. | ความสัมพันธ์ระหว่าง $K_{av}$ และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 | 59 |

# สารบัญรูป (ต่อ)


รูปที่ หน้า

18. รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่บริสุทธิ์จากการทำเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส ..... 61
19. ความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสโดยวิธีเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส ..... 62
20. ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส ..... 65
21. ผลของระยะเวลาต่อความเสถียรของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ..... 66
22. ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส ..... 67
23. ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส ..... 69
24. รูปแบบความเร็วเริ่มต้นระหว่างแอล-อะลานีนกับ $NAD^+$ ..... 70
25. รูปแบบความเร็วเริ่มต้นระหว่างแอมโมเนียมคลอไรด์กับไพรูเวท ..... 72
26. รูปแบบความเร็วเริ่มต้นระหว่าง NADH กับไพรูเวท ..... 73
27. รูปแบบความเร็วเริ่มต้นระหว่าง NADH กับแอมโมเนียมคลอไรด์ ..... 74
28. รูปแบบของการยับยั้งโดย NADH ต่อ $NAD^+$ และแอล-อะลานีน ..... 77
29. รูปแบบของการยับยั้งโดยไพรูเวทต่อ $NAD^+$ และแอล-อะลานีน ..... 78
30. รูปแบบของการยับยั้งโดยแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อ $NAD^+$ และแอล-อะลานีน ..... 79
31. กลไกการเร่งปฏิกิริยาของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ..... 81
32. ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ..... 81

# คำย่อ

| | | |
|---|---|---|
| $NAD^+$ | = | Nicotinamide adenine dinucleotide |
| NADH | = | Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form) |
| $NADP^+$ | = | Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate |
| Pyr | = | pyruvate |
| DH | = | dehydrogenase |