การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติบางประการของไนเทรตรีดักเทสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* ทนเค็ม

นางสาว โสรายา ไทยวานิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1578-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF NITRATE REDUCTASE FROM HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*.

Miss Soraya Thaivanich

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science in Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004
ISBN 974-53-1578-8

Thesis Title	PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF NITRATE REDUCTASE FROM HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*.
By	Miss.Soraya Thaivanich
Field of Study	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Aran Incharoensakdi, 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 Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Patchara Verakalasa, Ph.D.)

โสรายา ไทยวานิช : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติบางประการของไนเทรตรีดักเทสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* ทนเค็ม. (PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF NITRATE REDUCTASE FROM HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์ 100 หน้า. ISBN 974-53-1578-8

ไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความสำคัญ และ เป็นแหล่งไนโตรเจนหลักสำหรับการเจริญ ในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* เมื่อไนเตรทเข้าสู่เซลล์ กระบวนการนำไนเตรทไปใช้ภายในเซลล์จะถูกควบคุมโดยเอนไซม์ไนเตรทรีดักเตส งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการควบคุมการทำงานของไนเตรทรีดักเตสโดยวานาเค็มและแหล่งไนโตรเจน พบว่า ในภาวะที่มีความเครียดของเกลือจะมีระดับแอคติวิตีของไนเตรทรีดักเตสลดลงเป็นครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับสภาวะปกติ มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเป็น 0.278 และ 0.14 ในสภาวะปกติและสภาวะเครียด ตามลำดับ ในอาหารที่มีไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ระดับแอคติวิตีของไนเตรทรีดักเตสสูงสุดเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเมื่อเทียบกับการใช้ L-glutamine หรือ ammonium chloride เป็นแหล่งไนโตรเจน ไนเตรทจึงเป็นเสมือนตัวเหนี่ยวนำให้มีการผลิตแอคติวิตีของไนเตรทรีดักเตส ดังนั้นในอาหารที่ไม่มีไนเตรทจะมีผลต่อการยับยั้งแอคติวิตีของไนเตรทรีดักเตส ตำแหน่งของไนเตรทรีดักเตสในเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* โดยตรวจสอบแอคติวิตีของไนเตรทรีดักเตสพบมากที่สุดในส่วนไซโตพลาสซึมของเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการนำไนเตรทไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโตของ *A. halophytica* ไนเตรทรีดักเตสถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้ การปั่นเหวี่ยงที่มีแรงสูง , การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วแยกด้วยโครโมโตกราฟฟีคอลัมน์ดีอีเออีโทโยเพิร์ล และโครโมโตกราฟฟีคอลัมน์ไบโอเจลไฮดรอกซีอะพาไตท์ล พบว่ามีแอคติวิตีคงเหลือ 15.7 เปอเซ็นต์และมีความบริสุทธิ์ขึ้น 406 เท่า น้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยของเอนไซม์ มีน้ำหนักประมาณ 58,000 ไนเตรทรีดักเตสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์มีค่า Km เป็น 465 μMและอัตราเร็วสูงสุดเป็น V max เป็น 32 nmol/min/mg protein และสามารถใช้ ferredoxin เป็นตัวให้อิเลคตรอนในทางกายภาพได้ การศึกษาผลของตัวยับยั้ง พบว่า *p*-Chloromercuribenzoate , Iodoacetamide, KCN มีผลยับยั้งการทำงานของไนเตรทรีดักเตสลงมากกว่า 80 % ที่ความเข้มข้น 0.1 Mm และ ที่ความเข้มข้น 2.5 mM ของ N-Ethylmaleimideและเมื่อใช้สารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรท คือ ClO_3 พบว่า มีผลยับยั้งการทำงานของไนเตรทรีดักเตสเช่นกัน ขณะที่ผลผลิตของไนเตรทรีดักเตส, $NaNO_2$ ไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของไนเตรทรีดักเตส

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....โสรายา ไทยวานิช.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4472476423 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD : NITRATE REDUCTASE / PURIFICATION / CHARACTERIZATION / HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM

SORAYA THAIVANICH: PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF NITRATE REDUCTASE FROM HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*. THESIS ADVISOR: Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D. 100 pp.
ISBN 974-53-1578-8

Nitrate is a major nitrogen source for the growth of cyanobacteria. Nitrate reductase (NR) catalyzes the conversion of nitrate to nitrite. The enzyme is important in nitrate metabolism regulation. In this work, we found that ammonium, the intermediate of nitrogen metabolism, reduced nitrate reductase in *Aphanothece halophytica*. Glutamine also decreased nitrate reductase activity. Under salt stress condition, nitrate reductase was lower than normal condition due to repression of growth. Nitrate reductase from *A. halophytica* was localized in cytoplasmic fraction, suggesting its possible involvment in the nitrate assimilation. Purification of nitrate reductase was done by 4 steps including: ultracentrifugation, 20 – 60 % ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl chromatography and Bio–Gel hydroxyapatite chromatography. The enzyme was purified to homogeneity with 15.7 % yield and 406 purification folds. The Km value for nitrate was 465 μM and Vmax value was 32 nmol/min/mg protein using methyl viologen assay. The purified nitrate reductase used ferredoxin as physiological electron donor with specific activity was 14.6 nmol/ min/ mg protein. Inhibition studies revealed that p-chloromercuribenzoate, iodoacetamide, N-ethylmaleimide, potassium cyanide and chlorate could strongly inhibit enzyme activity whereas azide and nitrite had little or no effect on the enzyme activity.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....Biochemistry..... Student signature....Soraya Thaivanich.....
Field of study..... .Biochemistry..... Advisor signature.....Aran Incharoensakdi.....
Academic year.....2004..... Co-advisor signature.....

ACKNOWLDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Aran Incharoensakdi, for his excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this study. Without his kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Assistant Professor Suganya Soontaros and Associate Professor Patchara Verakalasa for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

Sincere thanks are extended to all staff members and friends of the Department of Biochemistry and Department of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for assistance and friendship.

Finally, I wish to express my deepest gratitude to my family for their support, infinite love and understanding.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES xi

LIST OF FIGURES xii

LIST OF ABBREVIATION.....xiii

CHAPTER I INTRODUCTION

1. 1 Nitrogen metabolism 1

1.1.1 Nitrogen fixation 1

1.1.2 Ammonium assimilation 2

1.1.3 Nitrate metabolism 2

1.1.4 Nitrification 4

1.1.5 Denitrification 5

1.2 Nitrate metabolism.....6

1.2.1 The nitrate assimilation 6

1.2.1.1 Ferredoxin-dependent nitrate reductase 6

1.2.1.2 NAD(P)H-nitrate reductase 8

1.2.2 The nitrate respiration 14

Page

1.2.3 The periplasmic nitrate reductase 18
1.3 Nitrate uptake 22
1.3.1 Nitrate uptake in cyanobacteria 23
1.3.2 Enhancement of cyanobacteria salt tolerance by combined nitrogen 26

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS

2.1 Equipments 28
2.2 Chemicals 29
2.3 Kit 30
2.4 Bacterial strains 30
2.5 Growth rate determination.....31
2.5.1 Growth of *A.halophytica* in various NaCl concentrations 31
2.5.2 Growth of *A.halophytica* in different nitrogen sources 31
2.6 Determination of nitrate reductase activity 32
2.6.1 Effect of NaCl concentration on nitrate reductase activity 32
2.6.2 Effect of different nitrogen source on nitrate rductace activity 32
2.7 The localization of nitrate reductase in *A.halophytica* cells.....33
2.7.1 Isolation of periplasmic proteins by cold osmotic shock 33
2.7.2 Preparation of membrane and cytoplasmic fraction 33
2.7.3 Spectrophotometric assay for nitrate reductase activity 34
2.8 Purification of nitrate reductase 34
2.8.1 Ultracentrifugation 34
2.8.2 Ammonium sulfate precipitation 35
2.8.3 DEAE-Toyopear chromatography 35

Page

2.8.4 Bio-Gel Hydroxyapatite chromatography 35
2.9 Characterization of nitrate reductase 36
2.9.1 Kinetics of nitrate reductase 36
2.9.2 Effect of various inhibitors on nitrate reductase 36
2.9.3 Electron donor availability.....37
2.10 Determination of enzyme purity by native PAGE.....38
2.10.1 Non-denaturing gel electrophoresis 38
2.10.2 Detection of protein bands 38
2.11 Molecular weight determination of nitrate reductase 39
2.11.1 SDS-PAGE 39

CHAPTER III RESULTS

3.1 Effect of salinity on growth rate and nitrate reductase activity 40
3.1.1 Effect of salinity on growth rate of *A.halophytica* 40
3.1.2 Effect of salinity on nitrate reductase activity 40
3.2 Effect of nitrogen source on growth and nitrate reductase of *A. halophytica* 41
3.2.1 Effect of nitrogen source on growth rate 41
3.2.2 Effect of nitrogen source on nitrate reductase activity 41
3.3 Localization of the nitrate reductase from *A.halophytica* cells 49
3.4 Purification of nitrate reductase from *A.halophytica* 51
3.4.1 Preparation of crude enzyme solution 51
3.4.2 Ultracentrifugation 51
3.4.3 Ammonium sulfate precipitation 51
3.4.4 DEAE-Toyopearl 52
3.4.5 Bio-Gel hydroxyapatite 52
3.4.6 Summary of nitrate redutase purification 52
3.4.7 Determination of enzyme on native-PAGE 53
3.5 Characterization of nitrate reductase enzyme.....53

Page

3.5.1 Molecular weight determination of nitrate reductase.....53
3.5.2 Initial velocity studies for nitrate reduction.....53
3.5.3 Electron donor availability.....60
3.5.4 Inhibitory effect of various agents on nitrate reductase activity 60

CHAPTER IV DISCUSSION

4.1 Effect of nitrogen sources on nitrate reductase.....64
4.2 Effect of salinity on nitrate reductase.....67
4.3 Localization of nitrate reductase in *A. halophytica*.....68
4.4 Purification of nitrate reductase from *A. halophytica* 69
4.5 The inhibitory effects of various reagents.....74

CHAPTER V CONCLUSIONS 76

REFERENCES.....78

APPENDICES.....87

BIOGRAPHY.....100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Page

CHAPTER I

1.1 Properties of highly purified assimilatory nitrate reductases.....10

CHAPTER III

3.1 The effect of salt and nitrogen source on specific activity of nitrate reductase.....48
3.2 Purification of the nitrate reductase from *A.halophytic*a 56
3.3 Effect of inhibitors on nitrate reductase activity.....62
3.4 Effect of inhibitors on nitrate reductase activity.....63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Page

CHAPTER I

1.1 The biological nitrogen cycles 3

1.2 Nitrate assimilation and comparison of the utilization 12

1.3 Nitrate respiration and denitrification pathways in bacteria.....15

1.4 The scheme of electron transfer and the effect of inhibitor on dissimilatory nitrate reductase 17

1.5 Periplasmic nitrate reductase of *R.sphaeroides* 20

CHAPTER III

3.1 Microscopic picture of *A.halophytica* 43

3.2 Growth of *A.halophytica* in Turk Island Salt Solution plus modified BG_{11} medium containing 0.5 M NaCl for normal condition and 2.0 M NaCl for salt-stress condition 44

3.3 The time course of nitrate reductase of *A.halophytica* grown under normal and salt stress condition for 8 days.....45

3.4 Growth of *A.halophytica* in different nitrogen source 46

3.5 The time course of nitrate reductase activity of *A.halopytica* grown in medium containing different nitrogen sources.....47

3.6 The localization of nitrate reductase activity in *A.halophytica* cells 50

3.7 Purification on DEAE-Toyopearl chromatography 54

3.8 Purification on Bio-Gel Hydroapatite 55

3.9 Non-denaturing PAGE of the *A.halophytica* nitrate reductase from each step of purification 57

Page

3.10 SDS-PAGE of the purified nitrate reductase fractions in 10% acrylamide gel 58

3.11 Calibration curve for molecular weight of purified nitrate reductase from *A. halophytica* on SDS – PAGE. 59

3.12 Lineweaver-Burk plot of nitrate reductase with nitrate as substrate 61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

A	absorbance
BSA	bovine serum albumin
^{o}C	degree celsius
DEAE	diethylaminoethyl
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
fd	ferredoxin
g	relative centrifugal force $= 1.12r\ (RPM/1000)^2$
h	hour
Hepes	*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-ethanesulfonic acid
HCl	hydrochloric acid
kDa	kilodalton
Km	Michealis constant
l	litre

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

lux	photometric (light density)
M	molar
mA	milliampare
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NR	nitrate reductase
µl	microlitre
µM	micromolar
nm	nanometer
nM	nanomolar

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OD	optical density
pI	isoelectric point
rpm	revolution per minute
SDS	sodium dodecyl sulphate
Tris-HCL	Tris hydrochloride
W	watt

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย