ปกใน

กลูตาเมตดีคาร์บอกซีเลส อะมัยเลส และโปรตีเนส จากแลคโตบาซิลลัส และเอนเทอโรคอคคัสสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

นางสาว ศิรพรรณ สุคนธสิงห์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

GLUTAMATE DECARBOXYLASE, AMYLASE AND PROTEINASE FROM SELECTED *LACTOBACILLUS* AND *ENTEROCOCCUS* STRAINS

Miss Sirapan Sukontasing

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic year 2006

Thesis Title	GLUTAMATE DECARBOXYLASE, AMYLASE AND PROTEINASE FROM SELECTED *LACTOBACILLUS* AND *ENTEROCOCCUS* STRAINS
By	Miss Sirapan Sukontasing
Field of Study	Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Thesis Advisor	Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Professor Kohei Oda, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

Pornpen Pramyothin ..... Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

Pintip Pongpech ..... Chairman

(Associate Professor Pintip Pongpech, Ph.D.)

Somboon Tanasupawat ..... Thesis Advisor

(Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.)

Somporn Moonmangmee ..... Member

(Somporn Moonmangmee, Ph.D.)

..... Member

(Wonnop Visessanguan, Ph.D.)

Warangkana Warisnoicharoen ..... Member

(Assistant Professor Warangkana Warisnoicharoen, Ph.D.)

ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ : กลูตาเมตดีคาร์บอกซีเลส อะมัยเลส และโปรตีเนส จากแลคโตบาซิลลัส และเอนเทอโรคอคคัสสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ (GLUTAMATE DECARBOXYLASE, AMYLASE AND PROTEINASE FROM SELECTED *LACTOBACILLUS* AND *ENTEROCOCCUS* STRAINS) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : Professor Kohei Oda Ph. D., 130 หน้า.

การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติก ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์กลูตาเมตดีคาร์บอกซีเลส อะมัยเลส และ/หรือ โปรตีเนส พบว่าจากแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนทั้งสิ้น 116 สายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆในประเทศไทย มีแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริค (กาบา) รูปร่างแท่งจำนวน 4 สายพันธุ์ แบคทีเรียรูปร่างแท่งที่ย่อยแป้งจำนวน 2 สายพันธุ์ และรูปร่างกลมเป็นสายโซ่จำนวน 3 สายพันธุ์ รวมทั้งแบคทีเรียรูปร่างแท่งที่ย่อยโปรตีนได้จำนวน 2 สายพันธุ์ ผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะอนุกรมวิธานเคมีร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rpoA*, *pheS* และ 16SrDNA การวิเคราะห์แผนภาพไฟโลจีเนติกส์ และการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันของดีเอ็นเอ (DNA-DNA similarity) สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียที่ผลิตกรดแกมมาอะมิโนบิวทีริค สายพันธุ์ LSF8-13 ได้เป็น *Lactobacillus brevis* FS73-1, SEA62-2 และ SR11-2 เป็น *L. plantarum* แบคทีเรียที่ย่อยแป้งสายพันธุ์ SB2-3 และ U3-1 เป็น *L. plantarum* FP 15-1 และ N2-1A เป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Enterococcus* และ N12-9 เป็น *E. gallinarum* โดยได้เสนอให้สายพันธุ์ FP 15-1 ซึ่งแยกได้จากใบเมี่ยงหมักเป็น *E. camelliae* sp. nov. แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีนสายพันธุ์ SMC1 และ SCR1เป็น *E. faecalis* and *L. sakei* ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ และศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียรูปร่างแท่งสายพันธุ์ L13 ซึ่งแยกได้จากผักดองพื้นบ้านของญี่ปุ่น และพบว่าแบคทีเรียเป็นสปีชีส์ใหม่ ในสกุล *Lactobacillus*

การศึกษาเปรียบเทียบยีน *gadB* ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์กลูตาเมคดีคาร์บอกซีเลส (GAD) ของสายพันธุ์ L13, LSF 8-13, FS73-1, SEA62-2 และ SR11-2 โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากข้อมูลการวิเคราะห์จีโนมของ *L. brevis* ATCC 367 และ *L. plantarum* WCFS1 ร่วมกับเทคนิค TAIL-PCR พบว่ายีน *gadB* ของ L13 มีขนาด 1437 เบส ถอดรหัสได้เป็นกรดอะมิโนขนาด 479 อะมิโน มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ชนิดเดียวกันของ *L. brevis* ATCC 367, *L. plantarum* WCFS1 และ LSF 8-13 คิดเป็น 82.2, 51.5 และ 51.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อทำการโคลนยีนที่แยกได้จาก L13 และ LSF 8-13 เข้าสู่พลาสมิดพาหะชนิด pQE70 และทำการกระตุ้นการแสดงออกของยีนใน *Escherichia coli* JM109 พบว่าสามารถกระตุ้นการผลิต และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านสารสกัดเซลล์เข้าสู่คอลัมน์ Ni^{2+}-HiTrap เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จาก L13 สามารถเร่งปฏิกริยาการผลิตสารกาบาโดยมีความต้องการโคเอนไซม์ชนิด PLP ขณะที่เอนไซม์บริสุทธิ์จาก LSF 8-13 ไม่สามารถเร่งปฏิกริยาการผลิตสารกาบาได้ เอนไซม์บริสุทธิ์ทั้งสองมีขนาดประมาณ 59 กิโลดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติ การศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการแยก โคลน และกระตุ้นการแสดงออกของยีนกลูตาเมคดีคาร์บอกซีเลสจากแบคทีเรียกรดแลคติคสปีชีส์ใหม่สายพันธุ์ L13

สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

4676973933: MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND NATURAL PRODUCTS
KEY WORD: GABA / GLUTAMATE DECARBOXYLASE / AMYLASE / PROTEINASE / LACTIC ACID BACTERIA

SIRAPAN SUKONTASING : GLUTAMATE DECARBOXYLASE. AMYLASE, AND PROTEINASE FROM SELECTED *LACTOBACILLUS* AND *ENTEROCOCCUS* STRAINS THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT Ph.D., THESIS COADVISOR : PROF. KOHEI ODA Ph. D., 130 pp.

Totally 116 strains of lactic acid bacteria isolated from various sources in Thailand were screened for glutamate decarboxylase, amylase, and/or proteinase abilities. Four rod-shaped of γ-aminobutyric acid (GABA) producing bacteria, two rod-shaped and three cocci in chains of starch hydrolyzing bacteria including two rod-shaped of proteinase producing bacteria were isolated. On the basis of the phenotypic characteristics, *rpoA*, *pheS* and 16S rDNA sequencing, phylogenetic analysis, and DNA-DNA similarity, the GABA producing strains, LSF8-13 was identified as *Lactobacillus brevis*, FS73-1, SEA62-2 and SR11-2 were identified as *L. plantarum*. The rod-shaped starch hydrolyzing strains SB2-3 and U3-1 were identified as *L. plantarum*. The starch hydrolyzing cocci in chains, FP 15-1 and N2-1A were the novel species in *Enterococcus* and N12-9 was *E. gallinarum*. The strain FP15-1 isolated from fermented tea leaves is proposed as *Enterococcus camelliae* sp. nov. The proteinase producing strains, SMC1 and SCR1 were *E. faecalis* and *L. sakei* respectively. A high GABA producing lactobacilli L13 isolated from a traditional Japanese pickle (senmaizuke) was polyphasic studied. This strain is belonged to a new species in *Lactobacillus*

Glutamate decarboxylase (GAD) encoding gene (*gadB*) of the strains L13, LSF8-13, FS73-1, SEA62-2 and SR11-2 were subjected to be comparatively studied. The core fragments of *gadB* were isolated from the isolates, using primers based on highly conserved regions of predicted gadB from genomic sequence of *L. brevis* ATCC 367 and *L. plantarum* WCFS1. A full-length *gadB* of of the strain L13 was subsequently isolated by TAIL-PCR method. Nucleotide sequence analysis of L13 *gadB* revealed that the open reading frame (ORF) consisted of 1437 bases and encoded a protein of 479 amino acid residues. The deduced amino acid showed 82.2, 51.5, and 51.3 % identity to the predicted GAD of *L. brevis* ATCC 367, *L. plantarum* WCFS1 and that of the isolated LSF 8-13 *gadB*, respectively. The isolated *gadB* of the strain L13 and LSF8-13 was constructed in an expression vector pQE70, cloned and expressed in *E. coli* JM109. The expressed GADs in crude extract of the transformed *E. coli* were purified by Ni^{2+}-HiTrap chelating HP affinity column. The purified GAD showed a single protein band on SDS-PAGE. The molecular weight of the purified L13 and LSF8-13 GADs were approximately 59 kDa. The recombinant GAD of L13 showed GAD activity significantly depended on a present of PLP in enzyme reaction while that of LSF8-13 had no activity. Deduced amino acids and 3D structures were comparatively analyzed. Addressed here, a novel glutamate decarboxylase gene from the novel species L13 was successfully identified, cloned, and expressed.

Field of study Pharmaceutical Chemistry and Natural Products
Academic year 2006

Student's signature Sirapan S.

Advisor's signature Somboon Tanasupawat

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my deepest gratitude and immense respect to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat, for making this dissertation accomplished. Dr. Somboon has provided me with guidance, support, and advice for my research studies. He is the great teacher I have had. He introduced me to the world of bacterial systematics, showed me the single-minded dedication on his work. Besides that, his kindness has not been only in laboratory but student's situation, health, and life.

Second, I give thanks, very sincere thanks to my thesis co-advisor in Japan, Professor Dr. Kohei Oda from Kyoto Institute of Technology (KIT) without whom none of the main theme of this thesis would has been thought of and conducted. He had offered and supported me the opportunities to do research at KIT for totally 8 and a half months. He is a real scientist actively engaged in research and development. Besides guiding, teaching, pushing, discussing and re-discussing throughout my research studies made me learn the value of hard work and his style of thinking. I would also like to thank Assistant Professor Dr. Kazumi Hiraga from KIT for his kindness support, help, and being such a reliably treasure box of materials, methods, and knowledge for my experiments. Perhaps most importantly he discovered such an amazing isolate of L13, the high level of GABA producing strain, which have been subjected for my research.

I have been fully indebted to Dr. Somporn and Assistant Professor Dr. Daungtip Moonmangmee at Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) and King Mongkut Institute of Technology Thonburi (KMUTT), respectively, who are not only my best seniors but teachers since I was an undergraduate student at Department of Microbiology, Kasetsart University. Following them, doing research on microbiology and basic molecular techniques inspired me to the road of being a molecular microbiologist. Moreover, they introduced and recommended me to Dr. Somboon, my supervisor.

Associate Professor Dr. Pintip Pongpech and Lecturer Penphan Naenna have been providing me kindness suggestions, insights, supports, encouragements,

consulting and follow-up especially my health problems throughout my years of research as a doctoral student here. I'm very grateful for all they have done for me.

Thanks, my past advisors Associate Professor Gunjana Theeragool and Associate Professor Ancharida Akaracharanya for their kindness and given me opportunities to do special problem research and Master thesis in field of molecular cloning at Kasetsart University and Chulalongkorn University, respectively. Also grateful thank would give to Professor Tatsuji Seki and Assistant Professor Hiroko Kawasaki for valuable one year trained in molecular taxonomy at ICB Osaka University. The background knowledge I had learned from them making this Ph.D. thesis possible.

I wish to thank the members of my committee, Assistant Professor Warangkana Warisnoicharoen and Dr. Wonnop Visessanguan for supports, consults, comments, suggestions and also reading and correcting my thesis manuscript.

During my research at KIT, I had a great deal of help. All of Japanese friends and their family especially Miss Hiroko Iwasa who has been both friend and tutor was always stay around helping, communicating, supporting, accompanying, taking care and resolving all my problems there. Many other lab members and friends whom I have not mention their name also had supported and helped me in everyway that they can. Also the staffs of International Planning Division and KIT international house for everything they arranged and accommodated. It made my last stay in Japan fruitful. I have been appreciated until now.

All the people here, lecturers, officers, staffs, the past and current students and facilities of Dept. of Microbiology, Dept. of Food Chemistry, Dept. of Chemistry, Pharmaceutical chemistry and Natural products Ph. D. program, and Pharmaceutical Research Instrument Center at Faculty of Pharmaceutical Sciences, and who have all one way or another contributed to make my success inside and outside the laboratory. Special thanks would give to the past and present members of Dr. Somboon's lab: Dr. Sirilak Namwong, Ms. Nitcha Chamroensaksri, Ms. Saowapar Kinegam, Ms. Piyapat Sripairoj, Ms. Apakorn Songsumanus, Mr. Amnat Pakdeeto, and Mrs. Waree Niyomtham for their help and being such a good collaborative. Thankful, Mr. Anirut

Limtrakul for help search data and proofreading my manuscript. Also thanks to staffs, students and facilities of King Mongkut Institute of Technology Thonburi (KMUTT).

I have been being encouraged and unconditional supported by my younger sister Ms. Kamolvan and my relatives: Ms. Sivaporn and Mr. Krit; Mrs. Morakot and Ms. Kanchana; my niece Ploy and nephew Pae. All of them stay back with full sense of humor to make me refresh at anytime. Last but not the least, a proteinase producing strain SMC1 was isolated from my dog "Makham". Once again, I say thank to her my beloved dog even she is not now and forever.

And of course, all of you that I did not specifically addressed here.

This thesis has been financially supported by the Royal Golden Jubilee Ph.D. Program. Contact No. PHD/0191/2546. Code No. 5.C.CU/46/I.1

Dedicated to my passed away parents without whose painstaking labors during my childhood this work would never have been done.

CONTENTS

Page

LIST OF TABLES

Table **Page**

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

LIST OF SCHEMES

Scheme **Page**

LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

3D	three dimensional
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, USA
BSA	bovine serum albumin
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pair
DDBJ	DNA data bank of Japan
DNA	deoxynucleic acid
GABA	γ-aminobutyric acid
GAD	Glutamate decarboxylase
*gad*B	Glutamate decarboxylase encoding gene
kb	kilobases
kDa	kilo Dalton
kg	kilogram
LAB	Lactic acid bacteria
mg	milligram
ml	milliliter
MW	molecular weight
NCBI	National Center for Bioinformation
OD	optical density
ORF	open reading frame
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
rDNA	ribosomal deoxynucleic acid
SDS	sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
λ	wavelength of light