

การทำให้อริสทูทและลักษณะสมบัติของฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจีเนส

จากแบคทีเรียทร้อน *Bacillus badius* BC1

นางสาวอรุณี เล็กสาคร



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-17-0479-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF  
PHENYLALANINE DEHYDROGENASE FROM  
THERMOTOLERANT *Bacillus badius* BC1**

**Miss Arunee Leksakorn**

**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**

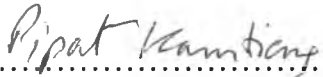
**Academic year 2001**

**ISBN 974-17-0479-8**


Thesis Title                      Purification and Characterization of Phenylalanine  
Dehydrogenase from Thermotolerant *Bacillus badius* BC1  
By                                      Miss Arunee Leksakorn  
Field of study                      Biochemistry  
Thesis 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


  
..... Deputy Dean for Administrative Affairs,  
Acting Dean, Faculty of Science  
(Associate Professor Pipat Karntiang, Ph.D.)

#### THESIS COMMITTEE

  
..... Chairman  
(Associate Professor Piamsook Pongsawadi, Ph.D.)

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

  
..... Member  
(Associate Professor Patchara Verakalasa, Ph.D.)

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

อรุณี เล็กสาคร : การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจีเนสจากแบคทีเรีย  
ทนร้อน *Bacillus badius* BC1. ( PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF  
PHENYLALANINE DEHYDROGENASE FROM THERMOTOLERANT *Bacillus badius*  
BC1 ) อ.ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง, 174 หน้า, ISBN 974-17-0479-8.

แบคทีเรียทนร้อนซึ่งผลิตแอล-ฟีนิลอะลานีนดีไฮโดรจีเนสโดยใช้  $NAD^+$  เป็นโคเอนไซม์จำนวน 2 สาย  
พันธุ์ได้ถูกคัดเลือก ในการศึกษานี้พบว่าสายพันธุ์ BC1 ซึ่งถูกจำแนกเป็น *Bacillus badius* มีค่าแอดคิวิตีของ  
เอนไซม์ชนิดนี้สูงที่สุดจึงเลือกสายพันธุ์นี้มาศึกษาต่อไป ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ คือ การเลี้ยง  
แบคทีเรียในอาหารอุดมเปปโตเน 1 เปอร์เซ็นต์ pH 6.5 ที่เสริมด้วยแอล-ฟีนิลอะลานีน 0.8 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37  
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต  
และแยกโดยโครโมโตกราฟีคอลัมน์คืออีโทไซเพิร์ล คอลัมน์บิวทิลโทไซเพิร์ลครั้งที่หนึ่งและคอลัมน์บิวทิลโทไซ  
เพิร์ลครั้งที่สอง พบว่ามีแอดคิวิตีเฉลี่ย 20 เปอร์เซ็นต์และบริสุทธิ์ขึ้น 160.7 เท่า เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล  
ประมาณ 358,000 และประกอบด้วย 8 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยย่อยละประมาณ 44,500 เอนไซม์มี  
ความจำเพาะสูงมากต่อแอล-ฟีนิลอะลานีนและฟีนิลไพรูเวทซึ่งเป็นสับสเตรทในปฏิกิริยา oxidative deamination และ  
reductive amination ตามลำดับ และมีความจำเพาะต่อ 3-อะเซทิลไพรูวีนไดนิวคลีโอไทด์มากกว่า  $NAD^+$  ประมาณ  
1.65 เท่า pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา oxidative deamination และ reductive amination คือ 10.7 และ 8.3 ตาม  
ลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเร่งปฏิกิริยาเป็น 50 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีความ  
เสถียรต่อ pH ในช่วง 6.0 ถึง 11.0 และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิค่อนข้างสูงโดยไม่สูญเสียแอดคิวิตีเมื่อบ่มเอนไซม์ที่  
40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเอนไซม์ยังคงมีแอดคิวิตีเหลืออยู่ 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิเดียวกันนี้  
เป็นเวลา 30 ชั่วโมง เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ได้โดยซิลเวอร์ไนเตรท เมอร์คิวริกคลอไรด์และเฟอร์รัสซัลเฟต  
ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ปฏิกิริยา oxidative deamination ของแอล-ฟีนิลอะลานีนถูกยับยั้งได้  
ด้วย ดี-ฟีนิลอะลานีน ดี-ทริปโตเฟน ดี-เมทไธโอนีน และ ออโร-ฟลูออโร-ดีแอล-ฟีนิลอะลานีน การตรวจหา  
กรดอะมิโนจำเป็นของเอนไซม์ด้วยวิธีตัดแปรทางเคมีพบว่า เมื่อตัดแปรกรดอะมิโนทริปโตเฟน เมทไธโอนีน  
ฮิสติดีน และไลซีน ด้วย *N*-bromosuccinimide (NBS), chloramine T (CT), diethylpyrocarbonate (DEPC) และ 2, 4,  
6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) ตามลำดับที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 20 นาที พบว่ามีผล  
ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอดคิวิตีทั้งหมด เมื่อตัดแปรกรดอะมิโนอาร์จินีนด้วย phenylglyoxal (PG) พบว่าเอนไซม์มี  
แอดคิวิตีเหลือ 10% ขณะที่ *N*-acetylimidazole (NAI), dithiothreitol (DTT) และ phenylmethylsulfonyl fluoride  
(PMSF) ซึ่งตัดแปรจำเพาะต่อกรดอะมิโนไทโรซีน ซิสเตอีนและเซอรีน ตามลำดับ ไม่มีผลต่อแอดคิวิตีของเอนไซม์  
ค่า  $K_m$  ของแอล-ฟีนิลอะลานีน  $NAD^+$   $NADH$  ฟีนิลไพรูเวท และ แอมโมเนีย เท่ากับ 0.59 , 0.28 , 0.07, 0.33 และ  
200 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ จากการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ตลอดจนการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา  
แสดงให้เห็นว่า กลไกของปฏิกิริยาเป็นแบบ sequential ordered binary-ternary mechanism ซึ่งมีลำดับของการจับ  
ของสับสเตรทคือ  $NAD^+$  จับกับเอนไซม์ก่อน ตามด้วยแอล-ฟีนิลอะลานีนแล้วจึงปล่อยแอมโมเนียออกมาตามด้วย  
ฟีนิลไพรูเวทและ  $NADH$  ตามลำดับ

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....  
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....  
ปีการศึกษา.....2544.....

ลายมือชื่อนิสิต.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

# # 4272470423 : MAJOR BIOCHEMISTRY  
 KEY WORD : L-PHENYLALANINE DEHYDROGENASE / *Bacillus badius* BC1 /  
 PURIFICATION / CHARACTERIZATION  
 ARUNEE LEKSAKORN : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF  
 PHENYLALANINE DEHYDROGENASE FROM THERMOTOLERANT  
*Bacillus badius* BC1. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. KANOKTIP  
 PACKDIBAMRUNG, Ph.D. 174 pp. ISBN 974-17-0479-8.

Thermotolerant bacteria producing NAD<sup>+</sup>-dependent phenylalanine dehydrogenase were screened and identified as *Bacillus badius* in the previous study. Two strains were obtained and strain BC1, having the highest enzyme activity, was further studied. The optimal conditions for enzyme production was 24 hours of cultivation in 1% peptone medium, pH 6.5 containing 0.8% L-phenylalanine at 37°C. The enzyme was purified to homogeneity by 40-50% saturated ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl, first Butyl-Toyopearl and second Butyl-Toyopearl column chromatography with 20 % yield and 160.7 purification fold. The relative molecular weight of the native enzyme was estimated to be about 358,000 by gel filtration and consisted of 8 subunits identical in molecular weight (44,500). The enzyme showed high substrate specificity in the oxidative deamination on L-phenylalanine while that of the reductive amination was on phenylpyruvate. 3-Acetylpyridine-NAD<sup>+</sup> gave 1.65 times higher activity than its natural coenzyme, NAD<sup>+</sup>. The optimum pH for the oxidative deamination and reductive amination were 10.7 and 8.3, respectively whereas optimum temperature were 50 and 45°C, respectively. The enzyme was stable over a pH range from 6.0 to 11.0. No loss of the enzyme activity was observed upon incubation at 40 °C for 2 hours and 50% of the activity was retained after incubation at the same temperature for 30 hours. The enzyme reaction was inactivated by HgCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub> and FeSO<sub>4</sub>. D-phenylalanine, D-tryptophan, D-methionine and *o*-fluoro-DL-phenylalanine significantly inhibited the oxidative deamination of L-phenylalanine. The enzyme was chemically modified with a series of group-specific reagents to identify essential amino acid residues. Incubation of the enzyme with 10 mM of *N*-bromosuccinimide (NBS), chloramine T (CT), diethylpyrocarbonate (DEPC) and 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) which were specific for tryptophan, methionine, histidine and lysine, respectively, led to complete loss of enzyme activity. In addition 10 mM of phenylglyoxal (PG) which was specific for arginine reduced the enzyme activity to about 10%, while *N*-acetylimidazole (NAI), dithiothreitol (DTT) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), the modifiers of tyrosine, cysteine and serine, respectively, did not affect the enzyme activity. The apparent *K<sub>m</sub>* values for L-phenylalanine, NAD<sup>+</sup>, NADH, phenylpyruvate and ammonium were calculated to be 0.59 mM, 0.28 mM, 0.07 mM, 0.33 mM and 200 mM, respectively. Initial velocity and product inhibition studies showed that the oxidative deamination proceeded through a sequential ordered binary-ternary mechanism, in which the sequence of substrate binding to the enzyme was NAD<sup>+</sup> and L-phenylalanine and then the sequence of product release was ammonia, phenylpyruvate and NADH, respectively.

Department.....Biochemistry.....  
 Field of study.....Biochemistry.....  
 Academic year.....2001.....

Student's signature ..... *Arunee Leksakorn* .....  
 Advisor's signature ..... *K. Packdibamrung* .....  
 Co-advisor's signature ..... - .....  
 .....

## ACKNOWLEDGEMENTS



I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Kanoktip Packdibamrung, for her excellent instruction, guidance, encouragement, attention and support throughout this thesis.

My gratitude is also extended to Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Associate Professor Patchara Verakalasa and Assistant Professor Tipaporn Limpaseni for serving as thesis committee for valuable comments and also for useful suggestions.

My appreciation is also expressed to Professor Haruo Misono, Laboratory of Applied Microbiology, Department of Bioresources Science and Research Institute of Molecular Genetics, Kochi University, Japan for many chemical reagents. I am very grateful to Miss Nantavadee Suwanabun, Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS) and also the laboratory of Veterinary pathology department, Faculty of Veterinary science, Chulalongkorn University for their support in the sonicator and dismembrator equipments. Thank you very much to my big brother, Mr. Supachai Kanpanich for his helpful in computer graphic suggestions.

Sincere thanks are extended to all staff members, especially lovely Uncle Juob, and lovely friends of the Biochemistry Department (Room 604, 617, 618, 707, 708 and 709) for their assistance and friendship.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents, Mr. Boonmee and Mrs. Ratchanee Leksakorn, my sisters, Miss Nattakarn Wetchaya and Miss Tiraporn Leksakorn for their infinite love, support, willpower, understanding and everything giving to my life.

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

# CONTENTS

	<b>Page</b>
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 Isolation and purification of phenylalanine dehydrogenase.....	3
1.2 Basic molecular and catalytic properties of phenylalanine dehydrogenase.....	4
1.3 Catalytic mechanism and structure of phenylalanine dehydrogenase.....	10
1.4 Applications of phenylalanine dehydrogenase.....	20
1.5 Objectives of this research.....	32
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	33
2.1 Equipments.....	33
2.2 Chemicals.....	34
2.3 Bacteria.....	36
2.4 Bacteria growth medium.....	36
2.5 Enzyme assay.....	37
2.6 Protein determination.....	37
2.7 Optimization for phenylalanine dehydrogenase production of bacterial strain BC1 and BC2	
2.7.1 Enzyme induction by amino acids.....	38
2.7.2 Optimal concentration of inducer.....	39
2.7.3 Optimal pH of medium.....	39

	<b>Page</b>
2.7.4 Optimal cultivation temperature.....	39
2.7.5 Optimal cultivation time.....	40
2.8 Purification of phenylalanine dehydrogenase from <i>Bacillus badius</i> BC1	
2.8.1 Bacterium cultivation.....	40
2.8.2 Preparation of crude enzyme solution.....	41
2.8.3 Purification procedures of enzyme.....	41
2.9 Characterization of phenylalanine dehydrogenase from <i>Bacillus badius</i> BC1	
2.9.1 Molecular weight determination of phenylalanine dehydrogenase.....	46
2.9.2 Substrate specificity of phenylalanine dehydrogenase.....	47
2.9.3 Coenzyme specificity of phenylalanine dehydrogenase...	48
2.9.4 Effect of pH on phenylalanine dehydrogenase activity....	48
2.9.5 Effect of temperature on phenylalanine dehydrogenase activity.....	49
2.9.6 Effect of pH on phenylalanine dehydrogenase stability....	49
2.9.7 Effect of temperature on phenylalanine dehydrogenase stability.....	49
2.9.8 Effect of metal ions and chemical substances on phenylalanine dehydrogenase activity.....	49
2.9.9 Inhibitory effect of various amino acids and keto acids on phenylalanine dehydrogenase activity.....	50
2.9.10 Effect of group-specific reagents on phenylalanine dehydrogenase activity.....	50
2.10 Kinetic mechanism studies of phenylalanine dehydrogenase from <i>Bacillus badius</i> BC1	
2.10.1 Initial velocity studies for the oxidative deamination.....	53
2.10.2 Initial velocity studies for the reductive amination.....	53
2.10.3 Product inhibition studies.....	55



CHAPTER III RESULTS.....	58
3.1 Optimization for phenylalanine dehydrogenase production of bacterial strain BC1 and BC2	
3.1.1 Enzyme induction by amino acids.....	58
3.1.2 Optimal concentration of inducer.....	59
3.1.3 Optimal pH of medium.....	59
3.1.4 Optimal cultivation temperature.....	62
3.1.5 Optimal cultivation time.....	62
3.2 Purification of phenylalanine dehydrogenase from <i>Bacillus badius</i> BC1	
3.2.1 Preparation of crude enzyme solution.....	65
3.2.2 Ammonium sulfate precipitation.....	65
3.2.3 DEAE-Toyopearl column chromatography.....	67
3.2.4 First Butyl-Toyopearl column chromatography.....	67
3.2.5 Second Butyl-Toyopearl column chromatography.....	70
3.2.6 Summary of phenylalanine dehydrogenase purification....	70
3.2.7 Determination of enzyme purity and protein pattern on non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis.....	70
3.3 Characterization of phenylalanine dehydrogenase from <i>Bacillus badius</i> BC1	
3.3.1 Molecular weight determination of phenylalanine dehydrogenase.....	74
3.3.2 Substrate specificity of phenylalanine dehydrogenase.....	74
3.3.3 Coenzyme specificity of phenylalanine dehydrogenase....	79
3.3.4 Effect of pH on phenylalanine dehydrogenase activity.....	79
3.3.5 Effect of temperature on phenylalanine dehydrogenase activity.....	79
3.3.6 Effect of pH on phenylalanine dehydrogenase stability.....	83
3.3.7 Effect of temperature on phenylalanine dehydrogenase stability.....	83
3.3.8 Effect of metal ions and chemical reagents on phenylalanine dehydrogenase activity.....	83

	Page
3.3.9 Inhibitory effect of various amino acids and keto acids on phenylalanine dehydrogenase activity.....	88
3.3.10 Effect of group-specific reagents on phenylalanine dehydrogenase activity.....	88
3.4 Kinetic mechanism studies of phenylalanine dehydrogenase from <i>Bacillus badius</i> BC1	
3.4.1 Initial velocity studies for the oxidative deamination.....	91
3.4.2 Initial velocity studies for the reductive amination.....	94
3.4.3 Product inhibition studies.....	99
CHAPTER IV DISCUSSION.....	104
4.1 Optimization for phenylalanine dehydrogenase production of bacterial strain BC1 and BC2.....	105
4.2 Purification of phenylalanine dehydrogenase from <i>Bacillus badius</i> BC1.....	106
4.3 Characterization of phenylalanine dehydrogenase from <i>Bacillus badius</i> BC1.....	111
4.4 Kinetic mechanism studies of phenylalanine dehydrogenase from <i>Bacillus badius</i> BC1 .....	122
CHAPTER V CONCLUSION.....	128
REFERENCES.....	131
APPENDICES.....	142
BIOGRAPHY.....	174

# LIST OF TABLES

	Page
<b>CHAPTER I</b>	
1.1 NAD(P)-dependent amino acid dehydrogenases.....	2
1.2 Comparison of properties of phenylalanine dehydrogenases from various microorganisms.....	6
1.3 Continuous production of L-phenylalanine with the aid of phenylalanine dehydrogenases and other dehydrogenases in an enzyme-membrane reactor.....	25
<b>CHAPTER III</b>	
3.1 Summary of optimal conditions for phenylalanine dehydrogenase production of thermotolerant bacterial strain BC1 and BC2.....	66
3.2 Purification of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1.....	72
3.3 Substrate specificity of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1.....	78
3.4 Coenzyme specificity of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1.....	80
3.5 Effect of metal ions and chemical reagents on phenylalanine dehydrogenase activity.....	86
3.6 Inhibitory effect of various amino acids and keto acids on phenylalanine dehydrogenase activity.....	89
3.7 Effect of various group-specific reagents on phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1.....	92
3.8 The apparent $K_m$ values of substrates of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1.....	98
3.9 Product inhibition patterns of oxidative deamination of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1.....	103

# LIST OF FIGURES

Page

## CHAPTER I

1.1	Reaction of phenylalanine dehydrogenase.....	5
1.2	Stereospecificity of hydrogen transfer of NADH catalyzed with dehydrogenases.....	11
1.3	Kinetic mechanisms of phenylalanine dehydrogenases.....	11
1.4	Sequence comparison of conserved residues in putative catalytic domains of several NAD(P) <sup>+</sup> -dependent amino acid dehydrogenase.....	14
1.5	Sequence comparison of pyridine nucleotide-binding regions of several NAD(P) <sup>+</sup> -dependent amino acid dehydrogenase.....	16
1.6	Scheme of the chimeric enzyme consisting of an amino terminal domain of phenylalanine dehydrogenase and a carboxy terminal domain of leucine dehydrogenase.....	18
1.7	Structure of the <i>Rhodococcus</i> sp. M4 phenylalanine dehydrogenase.....	18
1.8	Chemical mechanism for phenylalanine dehydrogenase derived from kinetic and structural analyses.....	21
1.9	Enzymatic routes for the preparation of L-phenylalanine.....	24
1.10	Coupling reactions of phenylalanine dehydrogenase and diaphorase for the determination of phenylalanine in plasma or serum.....	29
1.11	Recycling assay reactions for the determination of L-phenylalanine and phenylpyruvate in human blood.....	29
1.12	Schematic representation of an NADH-detecting biosensor.....	31
1.13	The synthesis of allysine ethylene acetal by phenylalanine dehydrogenase in pharmaceutical industry.....	31

## CHAPTER II

2.1	Flow chart of purification process of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1.....	42
-----	---	----

## CHAPTER III

3.1	Effect of various amino acids as enzyme inducers on phenylalanine dehydrogenase production of bacterial strain BC1 and BC2.....	58
3.2	Effect of the concentration of L-phenylalanine as enzyme inducer on phenylalanine dehydrogenase production and growth of bacterial strain BC1 and BC2.....	60
3.3	Effect of pH of medium on phenylalanine dehydrogenase production and growth of bacterial strain BC1 and BC2.....	61
3.4	Effect of cultivation temperature on phenylalanine dehydrogenase production and growth of bacterial strain BC1 and BC2.....	63
3.5	Effect of cultivation time on phenylalanine dehydrogenase production and growth of bacterial strain BC1 and BC2.....	64
3.6	Purification of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1 by DEAE-Toyopearl column.....	68
3.7	Purification of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1 by the first Butyl-Toyopearl column.....	69
3.8	Purification of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1 by second the Butyl-Toyopearl column.....	71
3.9	Non-denaturing PAGE of the <i>B. badius</i> BC1 phenylalanine dehydrogenase from each step of purification.....	73
3.10	Calibration curve for native molecular weight of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1 determined by gel filtration chromatography on Sephadex G-200 column.....	75
3.11	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of phenylalanine dehydrogenase from <i>B. badius</i> BC1 .....	76
3.12	Calibration curve for molecular weight of phenylalanine dehydrogenase subunit from <i>B. badius</i> BC1 on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.....	77
3.13	Effect of pH on phenylalanine dehydrogenase activity.....	81
3.14	Effect of temperature on phenylalanine dehydrogenase activity.....	82
3.15	Effect of pH on phenylalanine dehydrogenase stability.....	84
3.16	Effect of temperature on phenylalanine dehydrogenase stability.....	85

	<b>Page</b>
3.17 Initial velocity patterns for oxidative deamination.....	93
3.18 Initial velocity patterns for reductive amination ( phenylpyruvate vs NH <sub>4</sub> Cl ).....	95
3.19 Initial velocity patterns for reductive amination ( NH <sub>4</sub> Cl vs NADH ).....	96
3.20 Initial velocity patterns for reductive amination ( NADH vs phenylpyruvate ).....	97
3.21 Product inhibition patterns of oxidative deamination by NADH.....	100
3.22 Product inhibition patterns of oxidative deamination by phenylpyruvate...	101
3.23 Product inhibition patterns of oxidative deamination by NH <sub>4</sub> Cl.....	102

#### CHAPTER IV

4.1 Proposed kinetic mechanism of phenylalanine dehydrogenase from <i>B.adius</i> BC1 .....	124
--	-----

## LIST OF ABBREVIATIONS

$\mu\text{g}$	microgram
$\mu\text{l}$	microlitre
A	absorbance
AlaDH	alanine dehydrogenase
Bi-Ter	binary-ternary mechanism
BSA	bovine serum albumin
cm	centimeter
CT	chloramine T
Da	dalton
DEAE	diethylaminoethyl
DEPC	diethylpyrocarbonate
DTT	dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
g	gram
GluDH	glutamate dehydrogenase
h	hour
HCl	hydrochloric acid
$K_m$	Michaelis constant
KCl	potassium chloride
KOH	potassium hydroxide
KPB	potassium phosphate buffer
l	litre
LeuDH	leucine dehydrogenase
LysDH	lysine dehydrogenase
M	molar
mA	milliampere
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
mol	mole

MW	molecular weight
N	normal
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide
NADP <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAI	<i>N</i> -acetylimidazole
NaOH	sodium hydroxide
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ammonium sulfate
nm	nanometer
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PG	phenylglyoxal
PheDH	phenylalanine dehydrogenase
pI	isoelectric point
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
rpm	revolution per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethyl ethylene diamine
TNBS	2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid
V	Volt
ValDH	valine dehydrogenase
V/V	volume by volume
W/V	weight by volume