การสะสมไกลซีนบีเทนและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์บีเทนอัลดีฮายด์ดีไฮโดรจีเนสจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

นางสาวอุทัยวรรณ คำอาบ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-639-053-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17938654

ACCUMULATION OF GLYCINE BETAINE AND PARTIAL PURIFICATION OF BETAINE ALDEHYDE DEHYDROGENASE FROM A HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*

Miss Uthaiwon Kumarb

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 Year1997
ISBN 974-639-053-8

Thesis Title	Accumulation of Glycine Betaine and Partial Purification of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from a Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*
By	Miss Uthaiwon Kumarb
Program	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Master's Degree

.....Dean of Graduate School

(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Patchara Verakalasa, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อุทัยวรรณ คำอาบ : การสะสมไกลซีนบีเทนและการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์บีเทนอัลดีฮายด์ดีไฮโดรจีเนสจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ทนเค็ม *Aphanothece halophytica* (Accumulation of Glycine Betaine and Partial Purification of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from a Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์, 83 หน้า. ISBN 974-639-053-8

วิธี H^1-NMR มีความเหมาะสมสำหรับการวัดปริมาณสารประกอบไกลซีนบีเทนในไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ทนเค็ม *A. halophytica* และพบว่า ปริมาณสารไกลซีนบีเทนในเซลล์ *A. halophytica* ที่เลี้ยงในอาหารภาวะปกติ (0.5M NaCl) เท่ากับ 9.7 นาโนโมลต่อ 10^8 เซลล์ และเซลล์ตอบสนองต่อภาวะที่ความเข้มข้นของเกลือในอาหารเลี้ยงสูงขึ้น(2M NaCl) โดยการสะสมสารไกลซีนบีเทนเพิ่มขึ้น 8 เท่า การเตรียมเอนไซม์บีเทนอัลดีฮายด์ดีไฮโดรจีเนสจากไซยาโนแบคทีเรียสายพันธุ์ทนเค็ม *A. halophytica* ให้บริสุทธิ์โดยผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นอิ่มตัว 35-70 เปอร์เซนต์และโครมาโตกราฟฟีแบบ ดี อี เอ อี-เซลลูโลส ได้เอนไซม์ที่มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 290.8 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 18 เท่า pHและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีเทนอัลดีฮายด์ดีไฮโดรจีเนสจาก *A. halophytica* คือที่ pH 7.5 และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในการศึกษาทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อ สับสเตรท บีเทนอัลดีฮายด์ และโคเอนไซม์ NAD^+ โดยมีค่าคงที่มิเคลิส (K_m) เท่ากับ 91 และ 71.4 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ และมีค่าความเร็วสูงสุด เท่ากับ 175.4 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน อะเซตทาลดีฮายด์ และ เอทธาโนลามีน ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรทมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างมาก การศึกษาผลของเกลือต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl และ KCl เท่ากับหรือน้อยกว่า 0.1 โมลาร์ มีผลกระตุ้นให้การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้น เมื่อความเข้มข้นของ KCl สูงกว่า 0.1 โมลาร์ การทำงานของเอนไซม์จะลดน้อยลงและจะคืนสู่ระดับปรกติ สำหรับเกลือ NaCl เมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 โมลาร์ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เกลือ $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ ที่ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบจนถึง 0.5 โมลาร์ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DTT ซึ่งเป็นสารประกอบ reducing agent ช่วยป้องกันเอนไซม์จากการถูกยับยั้งโดย *p*-chloromercuriphenyl sulfonic acid ซึ่งเป็นสารประกอบ sulfhydryl-reactive จากการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์บีเทนอัลดีฮายด์ดีไฮโดรจีเนสจาก *A. halophytica* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 120,000 ดาลตัน ซึ่งประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละหน่วยย่อยเท่ากับ 30,000 ดาลตัน การศึกษาผลของความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเกลือภายนอกเซลล์และแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือภายนอกเซลล์สูงขึ้นแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเกลือจากภายนอกมีผลในการชักนำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์เพิ่มขึ้นซึ่งเป็น วิธีที่เซลล์ตอบสนองต่อภาวะกดดันโดยเกลือ

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต อุทัยวรรณ คำอาบ

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวแต่เพียงแผ่นเดียว

C726199 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: GLYCINE BETAINE/ BETAINE ALDEHYDE DEHYDROGENASE
UTHAIWON KUMARB:ACCUMULATION OF GLYCINE BETAINE AND PARTIAL PURIFICATION OF BETAINE ALDEHYDE DEHYDROGENASE FROM A HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica* THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. ARAN INCHAROENSAKDI, Ph.D., 83 pp. ISBN 974-639-053-8

The ^{1}H-NMR spectroscopy was a suitable method for the determination of glycine betaine in a halotolerant cyanobacterium, *A. halophytica*. The amount of glycine betaine from *A. halophytica* was 9.7 nmol/10^6 cells when the cells were grown in non-salt stressed condition (0.5M NaCl). Glycine betaine accumulation increased up to 8 folds when *A. halophytica* cells were cultivated in salt stressed condition (2M NaCl). Betaine aldehyde dehydrogenase was purified about 18-fold from *A. halophytica* with a specific activity of 290.8 μmol $min^{-1}mg^{-1}$. The procedure included fractional precipitation with 35-70% ammonium sulfate and DEAE-cellulose column chromatography. The optimum condition for betaine aldehyde dehydrogenase activity was pH 7.5 and 25 ℃. The *A.halophytica* betaine aldehyde dehydrogenase was specific for betaine aldehyde and NAD^+ with a K_m of 91 and 71.4 μM respectively. The V_{max} of betaine aldehyde dehydrogenase was 175.4 μmol $min^{-1}mg^{-1}$. The acetaldehyde and ethanolamine as substrate analogs showed strong inhibition towards betaine aldehyde dehydrogenase activity. NaCl and KCl at or below 0.1 M stimulated BADH activity. At higher than 0.1M KCl the enzyme activity declined and returned to the control level whereas for higher than 0.1 M NaCl the enzyme activity was inhibited. $CaCl_2$ and $MgCl_2$ at all concentrations tested up to 0.5M inhibited betaine aldehyde dehydrogenase activity. The *p*-chloromercuriphenyl sulfonic acid was a potent inhibitor of the enzyme. Preincubation of the enzyme with DTT could protect the enzyme activity against the inhibition by *p*-chloromercuriphenyl sulfonic acid. Gel filtration and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis suggested that the molecular weight of the enzyme was 120,000 dalton and it was likely that the enzyme was a tetramer of 30,000 dalton subunits. The relationship between salt stress and betaine aldehyde dehydrogenase activity revealed that the high external salinity increased specific activity of betaine aldehyde dehydrogenase. The data supported the idea that the synthesis of betaine aldehyde dehydrogenase could be induced by external salinization.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต อุทัยวงศ์ คำอาจ

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Aran Incharoensakdi

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม –

ACKNOWLEDGMENTS

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 thesis. Without his kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Dr. Tipaporn Limpasani and Dr. Patchara Verakalasa for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

I wish to acknowledge the contributions of the Graduate School, Chulalongkorn University..

Sincere thanks are also expressed to all staff members of the Biochemistry and Biotechnology Department for their assistance and friendship. Sincere thanks are also extended to Pee Toom, Pee Mong, Pee Baew, Pee Nok, Pee Bee, Pee Ju, Pee Oy, Jeab, Ole and Na for their kindness, willpower and suggestions.

Thankfulness would be given to Mr. Pradit Srichairattanakool for his love and care during my study at Chulalongkorn University.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my father, my mother and my brother for their unlimited love, support and understanding.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF TABLES..... xii

LIST OF FIGURES..... xiii

ABBREVIATIONS..... xv

CHAPTER I INTRODUCTION..... 1

CHAPTER II MATERIALS AND METHODS..... 13

1. Growth of *A. halophytica* in Turk Island Salt solution plus modified BG_{11} medium.....15
2. Determination of glycine betaine.....16
   - 2.1 Extraction of glycine betaine from cells 16
   - 2.2 ^{1}H-NMR measurements.....16
   - 2.3 Spectrophotometric measurements.....17
   - 2.4 The recovery of glycine betaine from extraction of cells and from and ion-exchange chromatography as determined by ^{1}H-NMR and Spectrophotometric assay.....17
     - 2.4.1 The recovery of glycine betaine extracted from the cells as determined by ^{1}H-NMR assay 17

Page

2.4.2 The recovery of commercial glycine betaine from ion-exchange chromatography as determined by spectrophotometric assay. 18
2.4.3 The recovery of glycine betaine extraction of cells and from ion-exchange chromatography as determined by spectrophotometric method 18
2.5 Effect of NaCl on glycine betaine accumulation in *A. halophytica* 19
3. Protein determination....19
4. The BADH activity assay 20
5. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)....20
5.1 Non-denaturing PAGE....20
5.2 SDS-PAGE....21
5.3 Detection of proteins in the slab gel by coomassie blue staining 21
5.4 BADH activity staining....22
6. The purification of BADH 22
6.1 Cells extraction....22
6.2 Ammonium sulfate precipitation....22
6.3 Column chromatography for BADH purification 23
6.3.1 DEAE-cellulose column chromatography...23
6.3.2 Hydroxyapatite column chromatography....24

Page

7. The properties of BADH 25
7.1 Effect of pH on BADH activity 25
7.2 Effect of incubation temperature on BADH activity 25
7.3 The kinetics of BADH 26
7.3.1 The Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) 26
7.3.2 Coenzyme requirements 26
7.4 The substrate analog inhibition 27
7.5 Effect of cation on BADH activity 27
7.6 Effect of DTT and *p*-chloromercuriphenyl sulfonic acid (PCMS) on BADH activity 28
7.7 The determination of molecular weight of partially purified BADH by Sephadex G-200 column chromatography 28
8. Effect of external salinity on BADH activity of *A. halophytica* 30
CHAPTER III RESULTS 31
1. Effect of salinity on growth of *A. halophytica* 31
2. Accumulation of glycine betaine in *A. halophytica* 31
2.1 Determination of glycine betaine by ^{1}H-NMR measurements 31
2.1.1 The ^{1}H-NMR spectra of glycine betaine in *A. halophytica* 31

Page

2.1.2 The recovery of glycine betaine extracted from the cells as analyzed by ^{1}H-NMR 34
2.2 Determination of glycine betaine by spectrophotometric measurements 34
2.2.1 The recovery of glycine betaine from column as analyzed by spectrophotometric method 34
2.2.2 The recovery of glycine betaine after extraction and ion-exchange column as analyzed by spectrophotometric method ...36
2.3 The comparision of ^{1}H-NMR and spectrophotometric assay for glycine betaine 36
2.4 Effect of NaCl on glycine betaine content in *A. halophytica* 38
3. Purification of BADH from *A. halophytica* 38
4. The properties of BADH 44
4.1 Effect of pH on BADH activity 44
4.2 Effect of temperature on BADH activity 44
4.3 The kinetics of BADH 46
4.4 The substrate analog inhibition.....50
4.5 Effect of cation on BADH activity 50
4.6 Effect of DTT and PCMS on BADH activity 50
5. The determination of molecular weight of BADH 53
6. Effect of external salinity on BADH activity 57

Page

CHAPTER IV DISCUSSION.....58
CHAPTER V SUMMARY.....64
REFERENCE.....66
APPENDIX.....72
BIOGRAPHY.....83

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table Page

1 Major organic osmoregulatory solutes of cyanobacteria 2

2 The characterization of purified BADH from various organisms. 10

3 The recovery of glycine betaine extracted from *A. halophytica* as analyzed by ^{1}H-NMR 37

4 The recovery of glycine betaine from ion-exchange column as analyzed by spectrophotometric method 37

5 The recovery of glycine betaine after extraction and ion-exchange column as analyzed by spectrophotometric method..... 39

6 Effects of salinity on intracellular content of glycine betaine and number of cells..... 39

7 The purification of BADH from *A. holophytica*..... 41

8 Inhibition of BADH by analogs of betaine aldehyde..... 51

9 Effect of DTT and PCMS on the activity of partially purified BADH..... 54

10 BADH activity from *A. halophytica* grown in different salinities 57

LIST OF FIGURES

Figure Page

1 Structure of glycine and glycine betaine 5

2 Choline-betaine pathway in the conversion of choline to glycine betaine 5

3 Microscopic picture of *A. halophytica* grown in Turk Island Salt solution + modified BG_{11} containing 0.5 M NaCl at day 14 (×2250) 32

4 Growth of *A. halophytica* under different salinities 33

5 ^{1}H-NMR spectrum of extract from *A. halophytica* grown in culture medium containing 0.5 M NaCl 35

6 Chromatographic profile of DEAE-cellulose column 40

7 Non-denaturing PAGE pattern of proteins obtained from different steps of purification 42

8 SDS-PAGE pattern of proteins obtained from different step of purification 43

9 Effect of pH on BADH activity 45

10 Effect of incubation temperature on BADH activity 47

11 Double reciprocal plot of activity of partially purified BADH as a function of the concentration of the substrate, betaine aldehyde . 48

12 Double reciprocal plot of activity of partially purified BADH as a function of the concentration of the coenzymes, NAD^+ and $NADP^+$ 49

13 Effect of salts on BADH activity 52

Figure Page

14 Molecular weight calibration curve of standard proteins on Sephadex G-200 column 55

15 Molecular weight calibration curve of standard proteins on 10% SDS-PAGE 56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

°C	degree Celsius
cm	centrimetre
DTT	dithiothreitol
g	relative centrifugal force = $1.12r(RPM/1000)^2$
HEPES	*N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-ethanesulphonic acid
kDa	kilodalton
l	litre
lb	pound
lux	Photometric (light density)
min	minute
hr	hour
ml	millilitre
mM	millimolar
nm	nanometre
µM	micromolar
OD	optical density
PCMS	*p*-chloromercuriphenyl sulfonic acid
RuBisCO	ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย