การสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนและบทบาทต่อการทนเค็มในไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica*

นางสาว นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-999-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19403818

GLYCINE BETAINE SYNTHESIS AND ITS ROLE FOR SALT TOLERANCE IN A HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*

Miss Nuchanat Wutipraditkul

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 Year 1998

ISBN 974-639-999-3

Thesis Title	Glycine betaine synthesis and its role for salt tolerance in a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*
By	Miss Nuchanat Wutipraditkul
Department	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements 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

(Associate Professor Wanchai De-eknamkul, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Patchara Verakalasa, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

นุชนาถ วุฒิประดิษฐกุล : การสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนและบทบาทต่อการทนเค็ม ในไซยาโนแบคทีเรียทนเค็ม *Aphanothece halophytica* (Glycine Betaine Synthesis and its Role for Salt Tolerance in a Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica*) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อรัญ อินเจริญศักดิ์, 71 หน้า. ISBN 974-639-999-3.

สารประกอบไกลซีนบีเทนทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ *Aphanothece halophytica* เมื่ออยู่ในภาวะที่มีแรงดันออสโมติกภายนอกเซลล์สูง เซลล์นี้สามารถสะสมสารประกอบไกลซีนบีเทน โดยการสร้างขึ้นจากการดึงเอาสารประกอบบางชนิดจากอาหาร และจากการทดลองโดยอาศัยตัวติดตามทางรังสี พบว่า *A. halophytica* สามารถสร้างไกลซีนบีเทนโดยอาศัยสารประกอบโคลีนเป็นสารตั้งต้น ผ่านสารประกอบตัวกลางในปฏิกิริยาคือ บีเทนอัลดีไฮด์ นอกจากสารประกอบตั้งต้นโคลีนแล้ว เอทธาโนลามีนและไกลซีนก็สามารถเปลี่ยนเป็นไกลซีนบีเทนได้ โดยเฉพาะไกลซีนนั้น สามารถเปลี่ยนเป็นไกลซีนบีเทนได้ ในอัตราที่เร็วกว่าสารประกอบตั้งต้นตัวอื่น ณ ภายใต้ภาวะที่มีความเครียดอันเนื่องจากเกลือพบว่า *A. halophytica* สามารถสร้างไกลซีนบีเทนเพิ่มขึ้นโดยอาศัยโคลีน หรือเอทธาโนลามีน หรือ ไกลซีนเป็นสารตั้งต้น และระดับไกลซีนบีเทนภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะที่มีความเครียดอันเนื่องจากเกลือ หลังจากทำให้เซลล์แตกแอคติวิตีจำเพาะของโคลีนดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีโคลีน-ไกลซีนบีเทน อยู่ในส่วนของผนังเซลล์เป็นส่วนใหญ่ และแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือในอาหารสูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C826183 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: GLYCINE BETAINE / CHOLINE DEHYDROGENASE
NUCHANAT WUTIPRADITKUL : GLYCINE BETAINE SYNTHESIS AND ITS ROLE FOR SALT TOLERANCE IN A HALOTOLERANT CYANOBACTERIUM *Aphanothece halophytica*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. ARAN INCHAROENSAKDI, Ph.D. 71 pp. ISBN 974-639-999-3.

Glycine betaine functions as an efficient osmoprotectant for *Aphanotheca halophytica* in high-osmolarity environments. This cell can accumulate glycine betaine through *de novo* synthesis in defined medium. By radiotracer experiments, it was found that *A. halophytica* could synthesize glycine betaine, using choline as a precursor, via an intermediate betaine aldehyde. Other precursors, namely ethanolamine and glycine could also be converted to glycine betaine. Morever, the formation of glycine betaine from glycine occurred at a faster rate than that from choline or ethanolamine. Under salt stress, *A. halophytica* exhibited an increased glycine betaine biosynthesis using choline or ethanolamine or glycine as a precursor. The level of intracellular glycine betaine was also increased under salt stress. The activity of choline dehydrogenase, the first enzyme in choline-glycine betaine pathway, was found to localize mainly in the membrane fraction of the disrupted cells. The enzyme activity was enhanced by the hypersalinity of the growth medium.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Aran Incharoensakdi, for this 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 Limpaseni, Dr. Patchara Verakalasa, and Dr. Wanchai De-eknamkul for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

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

Sincere thanks are also expressed to all staff members and friends of Biochemistry and Biotechnology Department for their assistance in the laboratory and friendship.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents, my sisters and my brothers for their unlimited love, support and understanding.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	16
1. Separation of quaternary ammonium compounds.....	19
2. Efficiency of separation of quaternary ammonium compounds by ion-exchange column.....	20
3. Time courses of [methyl-^{14}C] choline oxidation.....	20
4. Formation of ^{14}C-glycine betaine from various precursors.....	22
5. ^{14}C-Glycine betaine synthesis and glycine betaine accumulation after various periods of stress.....	23
5.1 Determination of glycine betaine accumulation.....	23
5.2 Determination of ^{14}C-glycine betaine synthesis.....	24

6. Disruption and centrifugal fractionation of cells..... 24

7. Determination of protein..... 25

8. Choline dehydrogenase assay..... 26

9. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)..... 26

9.1 Non-denaturing PAGE..... 26

9.2 Detection of proteins in slab gel by coomassie blue staining..... 27

9.3 Choline dehydrogenase activity staining..... 27

CHAPTER III RESULTS..... 28

1. Separation of quaternary ammonium compounds..... 28

2. Efficiency of cation-exchange column..... 28

3. Time course and product of choline oxidation..... 31

4. Formation of [^{14}C] glycine betaine from various precursors..... 36

5. Effect of salt stress on [^{14}C] glycine betaine synthesis and glycine betaine accumulation..... 39

6. Effect of salinity on choline dehydrogenase activity in membrane and cytoplasmic fractions..... 42

CHAPTER IV DISCUSSION..... 48

CHAPTER V SUMMARY..... 52

REFERENCES..... 53

APPENDIX..... 63

BIOGRAPHY..... 71

LIST OF TABLES

Page

Table 1 Separation of standard quaternary ammonium compounds, before and after passing through Dowex50w, 50x4-200 column by thin layer chromatography for 1.5 h, using chloroform/ methanol/ 0.1 M HCl (65:30:4, v/v)..... 30

Table 2 Recovery of radioactive quaternary ammonium compounds after passing through cation-exchange column..... 31

Table 3 Conversion of [^{14}C] choline to [^{14}C] betaine aldehyde and [^{14}C] glycine betaine in *A. halophytica*..... 33

Table 4 Time course for the conversion of various [^{14}C] precursors to [^{14}C]- glycine betaine in *A. halophytica*..... 36

Table 5 Effect of salt stress on the accumulation of glycine betaine and [^{14}C] glycine betaine synthesis in *A. halophytica*..... 39

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1 Structure of glycine and glycine betaine..... 2

Figure 2 Pathways of choline synthesis in higher plants..... 9

Figure 3 Pathway of glycine betaine biosynthesis in water-stressed barley leaves..... 10

Figure 4 Biosynthetic pathway of glycine betaine from choline via betaine aldehyde 11

Figure 5 Microscopic picture of *Aphanothece halophytica* grown in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium at day 14 (x2250)..... 14

Figure 6 Culture of *Aphanothece halophytica* was grown in Turk Island Salt Solution + modified BG_{11} medium at day 14 in a 250 ml flask..... 21

Figure 7 Thin layer chromatography separation of commercial choline, betaine aldehyde, and glycine betaine on silica gel thin layer plate with chloroform/methanol/0.1 M HCl (65:30:4, v/v) for 1.5h..... 29

Figure 8 Uptake of [^{14}C] choline by *A. halophytica* grown under control (0.5 M NaCl) and salt-stress (2.0 M NaCl)..... 32

Figure 9 Formation of [^{14}C] betaine aldehyde from [^{14}C] choline..... 34

Figure 10 Formation of [^{14}C] glycine betaine from [^{14}C] choline..... 35

Figure 11 Formation of [^{14}C] glycine betaine from [^{14}C] ethanolamine..... 37

Figure 12 Formation of [^{14}C] glycine betaine from [^{14}C] glycine..... 38

Figure 13 Growth of *A. halophytica* under salt stress..... 40

Figure 14 Effect of salt stress on glycine betaine accumulation..... 41

Figure 15 Uptake of [^{14}C] choline by control and salt-stress *A. halophytica* grown for various times..... 43

Figure 16 Effect of duration of salt stress on [^{14}C] glycine betaine synthesis..... 44

Figure 17 CDH activity of *A. halophytica* extracted from cytoplasm and membrane in low and high salinities..... 45

Figure 18 Non-denaturing PAGE pattern of choline dehydrogenase in membrane fraction from *A. halophytica*..... 46

Figure 19 Non-denaturing PAGE pattern of choline dehydrogenase in cytoplasmic fraction from *A. halophytica*..... 47

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

BSA	bovine serum albumin
^{o}C	degree Celsius
cm	centimetre
CDH	choline dehydrogenase
DTT	dithiothreitol
g	relative centrifugal force = $1.12r\ (RPM/1000)^2$
h	hour
Hepes	*N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N*-ethanesulfonic acid
l	litre
lux	Photometric (light density)
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
µCi	microCurie
µM	micromolar
nm	nanometre
OD	Optical density
w	watt

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย