บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรียสามารถเมตาบอไลซ์กรดอะมิโนเพื่อเป็นแหล่งพลังงานโดยส่งผ่านวัฏจักรเครบส์ได้โดย 3 วิธีคือ ทรานสอะมิเนสที่ต้องการไพริดอกซอลฟอสเฟตเป็นโคเอนไซม์ (pyridoxal phosphate - dependent transaminases) โดยจะย้ายหมู่อะมิโนจากกรดอะมิโนตัวหนึ่งไปยังกรดแอลฟาคีโตอีกตัวหนึ่งเพื่อให้ได้กรดอะมิโนชนิดใหม่ นอกจากนี้ยังมีดีอะมิเนส (deaminase) ที่ทำหน้าที่ดึงหมู่อะมิโนจากกรดอะมิโนโดยตรงทำให้ได้แอมโมเนียอิสระ และวิธีที่ 3 คือใช้ อะมิโนแอซิดดีไฮโดรจิเนสซึ่งประโยชน์ของวิธีนี้นอกเหนือจากสามารถผลิตแอมโมเนียอิสระที่เซลล์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายๆทางแล้ว ยังผลิตไพรูเวทรวมทั้งผลิต NAD(P)H เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานอีกทางหนึ่งด้วย (Norbert, Brunhuber and Blanchard, 1994) ดังนั้นแบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่ใช้แอล-อะลานีนเป็นแหล่งต้นตอของคาร์บอนและไนโตรเจนจะมีบางไอโซเลทเท่านั้นที่มีแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส ส่วนแบคทีเรียไอโซเลทที่ไม่มีเอนไซม์ชนิดนี้คาดว่าจะมีเอนไซม์ทรานสอะมิเนสและ/หรือดีอะมิเนสเพื่อเมตาบอไลซ์แอล-อะลานีน จากการคัดเลือกพบว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่มีแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสและให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดคือ *Aeromonas hydrophila* เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเซลล์ตรง มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) ที่ปลายหัวท้ายจะมีลักษณะเป็น coccoid มีขนาด 1.0-4.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดย polar flagella ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนโดยใช้สารอินทรีย์เคมีเป็นแหล่งพลังงาน นอกจากนี้สามารถใช้แอล-อะลานีนเป็นสารต้นตอของคาร์บอนและไนโตรเจนได้ด้วย (Buchanan and Gibbons, 1974) ซึ่งบทบาทของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสในแบคทีเรียชนิดนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์นี้ในพวกบาซิลลัสพบว่ามีบทบาทในช่วง spore germination (Yoshida and Freese, 1964; O'Conner and Halvorson, 1961; McCormick and Halvorson, 1964; McCowen and Phibbs, 1974) โดยมีหน้าที่ผลิต NADH ที่เป็นแหล่งพลังงานโดยตรงและผลิตไพรูเวทเพื่อส่งผ่านวัฏจักรเครบส์และผลิต NADH ต่อไป (Siranosian, Ireton and Grossman, 1993) นอกจากนี้ยังพบแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสในออร์แกนิซึมอื่นที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ โดยหลังจากที่เปลี่ยนก๊าซไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียแล้วปกติแบคทีเรียจะอาศัยกระบวนการถัดไปโดย glutamine synthetase/glutamate synthase (GS/GOGAT) แต่ในภาวะที่มีแอมโมเนียสูงจะอาศัยกระบวนการอื่นคือใช้กลูตาเมตดีไฮโดรจิเนสหรือแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส (Murrell and Dalton, 1983) กระบวนการนี้เกิดในแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนในปมรากถั่ว เช่น *Bradyrhizobium japonicum* และพวกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Anabaena cylindrica* (Smith and Emerich, 1993a; Rowell and

Stewart,1976) แอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสยังพบได้ในออร์แกนิซึมอื่นอีกหลายชนิดแต่หน้าที่ยังไม่แน่ชัดทราบแต่เพียงว่าใช้ในการสร้างสลับไปมาระหว่างแอล-อะลานีนและไพรูเวทเช่น *Mycobacterium tuberculosis* มีปริมาณเอนไซม์นี้สูงมากในขณะที่ *M. bovis* BCG ไม่มีเลย (Goldman, 1959; Andersen, Andersen and Ljungquist, 1992) นอกจากนี้แอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสใน *M. tuberculosis* ยังทำหน้าที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ (Andersen *et al.*, 1992)

pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียในจีนัส *Aeromonas* อยู่ในช่วง pH 5.5-9.0 และอุณหภูมิประมาณ 20-30 องศาเซลเซียสตามลำดับ (Buchanan and Gibbons, 1974) และจากการศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสใน *Aeromonas hydrophila* เท่ากับ pH 4.5 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสตามลำดับเมื่อเลี้ยงในอาหารอุดม peptone 1 เปอร์เซนต์ ส่วนเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์นี้เท่ากับ 24 ชั่วโมง โดยเอนไซม์จะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเวลามากขึ้นและจะมากที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่เซลล์มีการเจริญเต็มที่ หลังจากนี้เซลล์จะเริ่มตายทำให้ปริมาณเอนไซม์ลดลงไปด้วย

การทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเข้มข้น 30-40 เปอร์เซนต์ มีเอนไซม์ส่วนหนึ่งสูญเสียไปในแฟรคชันข้างเคียงประมาณ 16 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้เทคนิคการตกตะกอนที่เร็วไปหรือช้าไป และ pH ที่ลดลงเมื่อเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอาจมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โดยอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ (denature) ไปบางส่วน (Cooper, 1977) หรืออาจเป็นผลจากโปรติเอสที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลายเอนไซม์ซึ่งไม่ทราบว่ามีโปรติเอสชนิดใดอยู่บ้าง ถึงแม้ว่าในการทดลองนี้ทำการยับยั้งอัลคาไลน์โปรติเอสและเมทัลโลโปรติเอสโดยเติม PMSF และ EDTA ตามลำดับแล้วก็ตาม แต่ยังมีโปรติเอสกลุ่มอื่นที่ไม่ได้ทำการยับยั้งอีกคือ แอซิดโปรติเอสและไธออลโปรติเอส อย่างไรก็ตามแอซิดโปรติเอสไม่น่ามีผลต่อเอนไซม์เนื่องจากโปรติเอสชนิดนี้จะทำปฏิกิริยาได้ดีที่ pH ต่ำๆ ซึ่งจะห่างจาก pH ที่ใช้ในการทดลองนี้มาก ในขณะที่ไธออลโปรติเอสน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสูญเสียแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส โปรติเอสชนิดนี้สามารถถูกยับยั้งการทำงานโดยพารา-คลอโรเมอร์คิวริเบนโซเอต แต่ที่ไม่ได้นำมาใช้ในการทดลองนี้เนื่องจากมีรายงานว่าสารเคมีชนิดนี้มีผลต่อแอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสเช่นกัน (Vancura *et al.*, 1989) และหลังจากผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลสแอคติวิตีรวมของเอนไซม์จะลดลงมาก เนื่องจากมีเอนไซม์ส่วนหนึ่งสูญเสียไปในแฟรคชันข้างเคียงประมาณ 25 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้โครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

อาจมีผลต่อประจุบนเอนไซม์ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เสียไปด้วย อย่างไรก็ตามทั้งวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียซัลเฟตและโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนก็สามารถทำให้แยกโปรตีนอื่นออกไปได้มาก การใช้ไฮดรอกซีอะพาไทต์ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นถึงแม้ว่าเอนไซม์จะถูกชะออกมาตอนชะด้วย elution buffer ก็ตามเมื่อพิจารณาดูรูปแบบของโปรตีนจากการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิสจะเห็นได้ว่าโปรตีนอื่นถูกกำจัดออกไปมากจึงไม่ตัดขั้นตอนนี้ออก การใช้คอลัมน์บลูเซฟาโรสซึ่งแยกโปรตีนโดยอาศัยหลักแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟฟีที่จำเพาะต่อเอนไซม์ที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์ โดยลิแกนด์จะมีลักษณะคล้ายกับไพริดีนนิวคลีโอไทด์ซึ่งการแยกด้วยวิธีนี้บริเวณจับโคเอนไซม์ของเอนไซม์จะจับกับลิแกนด์อาจเป็นสาเหตุให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงไปบางส่วน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความบริสุทธิ์พบว่ามีค่าสูงขึ้นมาก สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์นี้ส่วนหนึ่งจะเป็นเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วแต่อีกส่วนหนึ่งยังไม่บริสุทธิ์และเมื่อพิจารณาจากลักษณะกราฟโปรตีนเมื่อชะด้วย linear salt gradient พบว่ากราฟมีลักษณะแคบและมีเพียง peak เดียว ดังนั้นการแยกด้วยวิธีบลูเซฟาโรสเช่นเดิมโดยอาจลดความเข้มข้นเกลือในการทำ linear salt gradient อาจไม่สามารถแยกโปรตีนอื่นที่ปนอยู่ออกได้ประกอบกับพิจารณาถึงรูปแบบของสารละลายโปรตีนส่วนที่ยังไม่บริสุทธิ์จากการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส พบว่าแถบของโปรตีนอื่นที่ปนอยู่กับแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสอยู่ต่ำกว่าแถบของเอนไซม์พอสมควรและโปรตีนอื่นที่ปนเปื้อนมาน่าจะมีประจุใกล้เคียงกับแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสเนื่องจากปะปนอยู่ด้วยกันมาตลอด ดังนั้นจึงคาดว่าโปรตีนที่ปนอยู่นี้จะมีขนาดเล็กกว่าแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส ซึ่งการแยกโดยอาศัยความแตกต่างระหว่างขนาดโปรตีนโดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 น่าจะนำมาใช้ในกรณีนี้ได้ และจากการผ่านสารละลายเอนไซม์ส่วนที่ยังไม่บริสุทธิ์ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 จะสามารถแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้

แอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 230,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อยแต่ละหน่วยย่อยมีขนาดประมาณ 40,000 ดาลตัน เมื่อเทียบกับขนาดหน่วยย่อยของเอนไซม์จากออกานิซึมต่างๆ ในตารางที่ 2 พบว่ามีขนาดประมาณ 40,000 ดาลตันใกล้เคียงกัน แอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงมาก ซึ่งจะให้ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์โดยใช้แอล-แอลฟา-อะมิโน-เอ็น-บิวไทเรต และแอล-ซีรีนเป็นสับสเตรทเพียงแค่ประมาณ 1.43 และ 0.47 เปอร์เซนต์ตามลำดับ แอล-แอลฟา-อะมิโน-เอ็น-บิวไทเรตมีหมู่เมทิลเพิ่มจากแอล-อะลานีนตรงหมู่ R เพียง 1 หมู่ ส่วนแอล-ซีรีนมีหมู่ไฮดรอกซิลเพิ่มมาจะเห็นได้ว่าขนาดจะไม่ต่างจากแอล-อะลานีนเท่าใด และแอล-ซีรีนถึงแม้ว่าจะมีหมู่ไฮดรอกซิลซึ่งมีขั้วปานกลาง

ก็ยังสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เช่นกัน ส่วนสับสเตรทตัวอื่นมีความแตกต่างจากแอล-อะลานีนทั้งขนาดและ/หรือประจุไม่สามารถใช้เป็นสับสเตรทได้เลย มีรายงานว่าแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Bacillus subtilis* มีความจำเพาะต่อสับสเตรทน้อยกว่าคือสามารถใช้กรดอะมิโนชนิดอื่นเช่น แอล-วาลีน และแอลไอโซลูซีนเป็นสับสเตรทได้ด้วย (Colowick and Kaplan, 1970) ส่วนปฏิกิริยา reductive amination ความจำเพาะต่อไพรูเวทจะมีน้อยกว่าความจำเพาะต่อแอล-อะลานีนในปฏิกิริยา oxidative deamination โดยสับสเตรทอื่นนอกเหนือจากไพรูเวท เช่น แอลฟา-คีโตบิวไทเรตให้ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ประมาณ 39 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับแอคติวิตีเมื่อใช้ไพรูเวทเป็นสับสเตรท การศึกษาใน *Bacillus subtilis* พบว่านอกจากค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ของแอลฟา-คีโตบิวไทเรตจะเป็น 64 เปอร์เซนต์แล้วเอนไซม์นี้ยังสามารถใช้ไกลออกซาเลท ไฮดรอกซีไพรูเวท แอลฟา-คีโต-ไอโซวาเลเรท แอลฟา-คีโตไอโซคาโปรเอท และแอลฟา-คีโต-คาโปรเอทเป็นสับสเตรทได้อีกโดยให้ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 7.2, 1.3, 0.2, 0.2, และ 0.12 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (Colowick and Kaplan, 1970) จะเห็นได้ว่าความจำเพาะต่อแอล-อะลานีนในปฏิกิริยา oxidative deamination ของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* สูงมาก ดังนั้นจะมีประโยชน์ในการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปวิเคราะห์หาปริมาณแอล-อะลานีนในสารตัวอย่างได้

แอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* มีความจำเพาะต่อ NAD^+ สูงมาก โดยถ้าใช้ $NADP^+$ เป็นโคเอนไซม์จะได้ค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ประมาณ 0.07 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับใช้ NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ และจากตารางที่ 1 แสดงว่าแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสมีความจำเพาะต่อ NAD^+ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับความจำเพาะต่อโคเอนไซม์ของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสใน *Streptomyces fradiae* พบว่าเมื่อใช้ $NADP^+$ เป็นโคเอนไซม์จะให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 12 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับใช้ NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ ส่วน 1, N^6-etheno-NAD^+, 3-acetylpyridine-NAD^+, thionicotinamide-NAD^+, deamino-NAD^+, α-NAD^+, 3-pyridinealdehyde-NAD^+, NGD^+ และ deamido-NAD^+ ให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 59, 62, 0, 77, 0, 0, 71 และ 0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (Vancura *et al.*, 1989)

พารา-คลอโรเมอร์คิวริเบนโซเอต 5,5′-ไดไทโอ-บิส(2-ไนโตรเบนโซเอต) และไอโอโดอะเซตาไมด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีผลต่อหมู่ซัลไฟดิลของเอนไซม์ (Chambers and Rickwood, 1993) ทำให้แอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสลดลง จากผลการทดลองสรุปได้ว่าแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสนี้น่าจะมีหมู่ซัลไฟดิลในบริเวณที่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ ส่วน EDTA ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ นอกจากนี้ไอออนของโลหะต่างๆ เช่น แมกนีเซียมไอออนแอมโมเนียมไอออน แมงกานีสไอออน โคบอลต์

ไอออน และแคลเซียมไอออนก็ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เช่นเดียวกัน จึงพิจารณาได้ว่าการทำงานของเอนไซม์ไม่น่ามีไอออนของโลหะมาเกี่ยวข้องหรือเอนไซม์ไม่ได้ต้องการไอออนของโลหะเป็นโคแฟกเตอร์ ส่วนคอปเปอร์ไอออนและซิงค์ไอออนซึ่งมีสมบัติต่างจากไอออนข้างต้นสามารถทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงโดยอาจไปเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive inhibitor) ต่อปฏิกิริยา (Colowick and Kaplan, 1970) ส่วนแอล-กลูตาเมตไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ แต่ดี-ซิสเตอีนและซาโคซิน (N-methylaminoacetate) มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่กล่าวว่ากรดอะมิโนฟอร์มดีและ L-alanine analogs จะมีผลยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ต่อปฏิกิริยา (Colowick and Kaplan, 1970) ส่วน DTT ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

แอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสได้นาน 16 ชั่วโมง แต่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที เอนไซม์จะเริ่มเสียสภาพธรรมชาติ (denature) อุณหภูมิมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โดยที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะมีผลไปลดพลังงานกระตุ้นทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้นและจะสูงที่สุดที่อุณหภูมิหนึ่ง แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้จะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติแอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็ว สาเหตุที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยา reductive amination และ oxidative deamination นั้นต่างกันอาจเป็นเพราะสับสเตรทของปฏิกิริยาทั้งสองต่างกัน ทำให้มีผลต่อการจับระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทโดยตรงก็ได้

ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์อธิบายได้ว่าโดยปกติแล้วเมื่อเอนไซม์จับกับ NAD^+ จะได้สารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-NAD^+ ซึ่งจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปไอโซเมอร์อื่นแล้วจึงสามารถจับกับแอล-อะลานีนได้ แต่ที่ pH ต่ำสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-NAD^+ ที่ยังไม่ได้เปลี่ยนไอโซเมอร์จะสามารถจับกับแอล-อะลานีนได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ (Grimshow and Cleland, 1981; Grimshaw, Cook and Cleland, 1981) และที่ pH สูงกว่า 10.9 NAD^+ จะจับกับเอนไซม์แบบไม่เสถียร นอกจากนั้นที่ pH สูงกว่า 9.35 แอล-อะลานีนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอิมิโนไพรูเวทโดยปฏิกิริยาทางเคมี (Grimshaw and Cleland, 1981) และปฏิกิริยา reductive amination ที่ pH สูงแอมโมเนียจะจับกับเอนไซม์ตรงบริเวณที่ไม่ใช่บริเวณเร่งเป็นเหตุให้ค่าแอคติวิตีที่วัดได้ลดลง (Grimshaw and Cleland, 1981)

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่ากลไกของปฏิกิริยาเป็นแบบ sequential ordered bi-bi-ter mechanism โดยลำดับการจับของสับสเตรทคือ NAD^+ จับกับเอนไซม์ก่อนแล้วตามด้วยแอล-อะลานีน แล้วจะปล่อยไพรูเวทออกมาก่อนตามด้วย

แอมโมเนียและ NADH ตามลำดับ ซึ่งกลไกแบบนี้จะเหมือนกับกลไกของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก mesophilic *Bacillus sphaericus* (Ohshima and Soda,1979) แต่เมื่อศึกษาถึงการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา (product inhibition) พบว่าต่างจาก mesophilic *Bacillus sphaericus* คือ เอนไซม์จาก *Aeromonas hydrophila* เมื่อทำปฏิกิริยาศึกษาผลการยับยั้งโดยไพรูเวทต่อแอล-อะลานีนพบว่าเป็นแบบ uncompetitive inhibition ในขณะที่เอนไซม์จาก mesophilic *Bacillus sphaericus* จะมีผลการยับยั้งแบบ noncompetitive inhibition และผลการยับยั้งโดยแอมโมเนียต่อแอล-อะลานีนของเอนไซม์จาก *Aeromonas hydrophila* เป็นแบบ noncompetitive inhibition ในขณะที่เอนไซม์จาก mesophilic *Bacillus sphaericus* จะมีผลการยับยั้งแบบ uncompetitive inhibition (Ohshima and Soda, 1979) ส่วนกลไกของปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ในแบคทีเรียชนิดอื่นมีรูปแบบต่างจากเอนไซม์ใน *Aeromonas hydrophila* มากเช่นกลไกของ *Bacillus subtilis* จะเป็นแบบ NAD^+ จับกับเอนไซม์ก่อนแล้วตามด้วยแอล-อะลานีน จากนั้นจะปล่อยแอมโมเนียออกมาก่อนแล้วตามด้วยไพรูเวทและ NADH ตามลำดับ (Ohshima and Soda, 1990) ส่วนกลไกของ *Mycobacterium* จะเป็นแบบแอล-อะลานีนจับกับเอนไซม์ก่อนแล้วตามด้วย NAD^+ จากนั้นจะปล่อย NADH ตามด้วยไพรูเวทและแอมโมเนียตามลำดับ (Goldman, 1959) จะเห็นได้ว่ากลไกที่กล่าวมาข้างต้นจะเป็นแบบ sequential ordered binary-ternary mechanism ส่วนที่จะกล่าวต่อไปนี้จะเป็นแบบ sequential random binary-ternary mechanism ได้แก่ thermophilic *Bacillus sphaericus* จะมีกลไกคือ NAD^+ จะเข้าจับกับเอนไซม์ก่อนตามด้วยแอล-อะลานีน และจะปล่อยไพรูเวทและแอมโมเนียออกแบบสุ่ม (random) และตามด้วย NADH (Ohshima and Soda, 1990) ส่วนกลไกของ *Propionibacterium* จะเป็นแบบแอล-อะลานีนเข้าจับกับเอนไซม์ก่อนแล้วตามด้วย NAD^+ และจะปล่อยไพรูเวทและ NADH ออกแบบสุ่มและตามด้วยแอมโมเนีย (Crow, 1987)

เนื่องจากลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N มีความจำเพาะต่อแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสสูงโดยเมื่อนำไปเทียบความเหมือน (identity) กับโปรตีนใน GENBANK พบว่าแสดงค่าความเหมือนเฉพาะกับเอนไซม์ในกลุ่มแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสเท่านั้น ดังนั้นจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมตัวติดตาม (probe) สำหรับการโคลนยีนแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสได้

ผลงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการปรับปรุงปริมาณการผลิตและคุณภาพของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสในขั้นต่อไป เช่น นำไปใช้ในการโคลนยีนเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีน หรือจากโคลนสามารถนำไปตรวจหาลำดับเบสของดีเอ็นเอประกอบกับข้อมูลจากการศึกษาทางด้าน chemical modification จะสามารถทราบชนิดและลำดับของกรดอะมิโน

ในบริเวณเร่ง และจากข้อมูลดังกล่าวอาจเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตรงบริเวณเร่ง คือ อาจเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนที่ทำให้สามารถจับกับสับสเตรทได้ดีขึ้นแล้วผลิตผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น หรืออาจทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงโดยทำให้ทนต่ออุณหภูมิสูงมากขึ้นด้วย และนอกจากวิธีทางด้านพันธุวิศวกรรมแล้วยังจะสามารถเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ได้โดยวิธี point mutation โดยใช้สารเคมีหรือแสงอัลตราไวโอเลท เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์ได้และสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้คือ *Aeromonas hydrophila*

2. ภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสใน *Aeromonas hydrophila* ที่เลี้ยงในอาหารอุดม peptone 1 เปอร์เซนต์ในระดับขวดเขย่าคือ pH 4.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นานประมาณ 24 ชั่วโมง

3. ขั้นตอนการทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromanas hydrophila* ให้บริสุทธิ์ คือ ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-40 เปอร์เซนต์ จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซลลูโลส ไฮดรอกซีอะพาไทต์ บลูเซฟาโรส และเซฟาเด็กซ์จี-200 ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 100 เท่าและมีแอคติวิตีของเอนไซม์คงเหลือเท่ากับ 18.4 เปอร์เซนต์

4. น้ำหนักโมเลกุลของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* เท่ากับ 230,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 40,000 ดาลตัน

5. แอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* มีความจำเพาะต่อแอล-อะลานีนซึ่งเป็นสับสเตรทในปฏิกิริยา oxiditive deamination สูงมาก ในขณะที่ความจำเพาะต่อไพรูเวทซึ่งเป็นสับสเตรทในปฏิกิริยา reductive amination ต่ำกว่า นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะต่อ NAD^+ สูงด้วยเช่นกัน

6. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ แมกนีเซียมคลอไรด์ แอมโมเนียมคลอไรด์ แมงกานีสคลอไรด์ โคบอลต์คลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ แอล-กลูตาเมต EDTA และ DTT ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ ส่วนพารา-คลอโรเมอร์คิวริเบนโซเอต 5,5'-ไดไทโอ-บิส(2-ไนโตรเบนโซเอต) ไอโอโดอะเซตาไมด์ คอปเปอร์ซัลเฟต ซิงค์ซัลเฟต ดี-ซิสเตอิน และซาโคซินมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์

7. เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานกว่า 16 ชั่วโมง โดยแอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มลดลงและสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่เวลาประมาณ 52ชั่วโมง ถ้าบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที แอคติวิตีของเอนไซม์จะลด

ลงเหลือประมาณ 50 เปอร์เซนต์ และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์

8. ปฏิกิริยา reductive amination เกิดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ส่วนปฏิกิริยา oxidative deamination เกิดได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส

9. ปฏิกิริยา reductive amination เกิดได้ดีที่สุดที่ pH ประมาณ 8 ส่วนปฏิกิริยา oxidative deamination เกิดได้ดีที่สุดที่ pH ประมาณ 10.5

10. ค่า K_m ของแอล-อะลานีน NAD^+ ไพรูเวท แอมโมเนียมคลอไรด์ และ NADH เท่ากับ 20, 0.17, 1.33, 77 และ 0.25 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

11. กลไกปฏิกิริยาของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* เป็นแบบ sequencial ordered binary-ternary mechanism โดย NAD^+ จับกับเอนไซม์ก่อนแล้วตามด้วยแอล-อะลานีน จากนั้นปล่อยไพรูเวทออกมาก่อนตามด้วยแอมโมเนียและ NADH ตามลำดับ

12. ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* คือ MIIGVPTEIANHELRVGMSV