ACKNOWLEDGEMENT

This 3-year project was financially supported by the Thailand Research Fund (RSA 3880022) and the Research Affairs Division of Chulalongkorn University from September 1995 to August 1998.

ABSTRACT

The present investigation was undertaken to unveil the mechanism of osmoregulation in a cyanobacterium. The halophilic cyanobacterium that we used was *Aphanothece halophytica* which possesses advantageous characteristics of being able to grow in a wide range of salinity ranging from 0.25 M to 3 M NaCl. One aspect of the osmoregulation process in a variety of living organisms involves the synthesis and accumulation of a certain class of compound commonly known as a compatible or an osmoprotectant solute.

In order to study the osmoregulation concerning the biosynthesis of a compatible solute, glycinebetaine in a systematic manner, we divided the project into 3 portions :

1. The conditions in which *A. halophytica* could accumulate glycinebetaine. The results indicated that the presence of high external salinity as well as an osmoticum namely sorbitol stimulated glycinebetaine accumulation. Chemical factor such as the presence of $NaNO_3$ in the growth medium or physical factor such as light could facilitate the increase of glycinebetaine only in salt-stressed cells.

2. The biosynthetic pathway of glycinebetaine. The results of radiotracer experiments showed the likely pathway to be choline → betaine aldehyde → glycinebetaine. The operation of this pathway was supported by the finding that the enzyme activities responsible for these 2 steps; choline and betaine aldehyde dehydrogenases were detected in membrane and cytoplasmic fractions respectively. Increased external salinity could enhance the activities of these 2 enzymes. As in the case of glycinebetaine accumulation, increased external salinity also increased the rate of glycinebetaine synthesis of the cells. The evidence was also provided showing that glycinebetaine could be synthesized from either ethanolamine or glycine. These 2 synthetic routes were also stimulated by high external salinity.

3. The purification and characterization of the enzyme responsible for the last step of glycinebetaine synthesis namely betaine aldehyde dehydrogenase. The results showed that the purified enzyme, after ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose and hydroxyapatite chromatography was a tetramer of 30 kDa subunits. Both NAD^+ and $NADP^+$ could serve as coenzyme. Sulfhydryl reactive agents could modify enzyme activity. The presence of K^+ and Na^+ at or lower than 0.1 M enhanced enzyme activity. At higher than 0.1 M the

magnitude of activation was decreased for K^+ and inhibition was observed for Na^+. Elevation of external salinity caused an increase in enzyme activity.

บทคัดย่อ

งานวิจัยชิ้นนี้มีจุดประสงค์ที่จะเรียนรู้ถึงกลไกในการควบคุมแรงดันออสโมติกในไซยาโนแบคทีเรียมชนิดชอบความเค็ม *อะฟาโนทีคี ฮาโลฟิทิคา* ซึ่งมีคุณลักษณะที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาเนื่องจากมันสามารถเจริญได้ในช่วงความเค็มตั้งแต่ 0.25 ถึง 3 โมลาร์ ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ กลไกอันหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ประเภทใช้ในการปรับแรงดันออสโมติก ได้แก่ การสร้างและสะสมสารประกอบที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งเราเรียกสารประกอบชนิดนี้เป็นคอมแพททิเบิล หรือออสโมโปรเทคแทนท์โซลูท

เพื่อที่จะทำงานวิจัยชิ้นนี้ให้เป็นระบบ จึงได้แบ่งรูปแบบของการศึกษาการสังเคราะห์คอมแพททิเบิลโซลูทที่มีชื่อว่า ไกลซีนบีเทน ออกเป็น 3 ส่วนดังนี้

1. สภาวะที่ทำให้เซลล์สะสมไกลซีนบีเทน ผลการทดลอง พบว่า ความเค็มสูง ๆ หรือใส่สารที่เพิ่มแรงดันภายนอกเซลล์ เช่น ซอร์บิทอล จะช่วยกระตุ้นให้เกิดการสะสมไกลซีนบีเทนขึ้นมากภายในเซลล์ นอกจากนี้การใส่โซเดียมไนเตรทลงในสารอาหาร หรือแม้กระทั่งการให้แสงสว่างขณะกำลังเลี้ยงเซลล์ก็จะทำให้เซลล์ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะความเครียดของเกลือเท่านั้นที่จะมีการสะสมไกลซีนบีเทนเพิ่มขึ้น

2. วิถีการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทน จากการทดลองโดยวิธี เรดิโอเทรเซอร์ พบว่าวิถีการสังเคราะห์น่าจะเป็นดังนี้; โคลีน → บีเทนอัลดีฮายด์ → ไกลซีนบีเทน ข้อมูลเพิ่มเติมที่สนับสนุนการทำงานของวิถีการสังเคราะห์อันนี้ได้จากผลการทดลองที่แสดงถึงการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนที่ 1 และที่ 2 กล่าวคือ สามารถตรวจพบ แอคติวิตีของเอนไซม์โคลีนและบีเทนอัลดีฮายด์ ดีไฮโดรจีเนสได้ในส่วนของเม็มเบรนและส่วนของไซโตปลาสมตามลำดับ และยังพบอีกว่า ความเค็มภายนอกที่สูงขึ้นจะทำให้เอนไซม์ทั้ง 2 ตัว ดังกล่าวมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลที่แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของความเค็มภายนอกเซลล์ช่วยกระตุ้นให้เซลล์สังเคราะห์ไกลซีนบีเทนได้ดีขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลเบื้องต้นบ่งชี้ว่าไม่เพียงแต่โคลีนเท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นไกลซีนบีเทน เซลล์สามารถที่จะใช้เอธานอลามีนหรือไกลซีนในการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนได้ด้วย และเช่นเดียวกันความเค็มภายนอกที่เพิ่มขึ้นสามารถเพิ่มการสังเคราะห์ไกลซีนบีเทนโดยใช้สาร 2 ตัวนี้ได้

3. การทำให้เอนไซม์บีเทนอัลดีฮายด์ดีไฮโดรจีเนสบริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ พบว่า สามารถทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยโครมาโทกราฟฟีโดย ดีอีเออีและไฮดรอกซีอะพาไทท์ ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยที่มีขนาดหน่วยย่อยละ 30 กิโลดาลตัน เอนไซม์สามารถใช้ทั้ง เอนเอดี และเอนเอดีพี เป็นโคเอนไซม์ได้ สารประเภทที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล สามารถ

เปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ โปแทสเซียมและโซเดียมอิออนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 โมลาร์ลงมาช่วยกระตุ้นแอคติวิตี แต่ถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 โมลาร์ พบว่าขนาดของการกระตุ้นโดย K^+ จะลดลง ในขณะที่จะเกิดการยับยั้งของแอคติวิตีโดย Na^+ การเลี้ยงเซลล์ภายใต้ความเค็มภายนอกสูง ทำให้เซลล์มีแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้น