

บทคัดย่อภาษาไทย

รหัสโครงการ : RSA4780013

ชื่อโครงการ : การศึกษาการแสดงออกของยีน alcohol dehydrogenase และการตอบสนองต่อเอทานอล และกรดอะซิติกความเข้มข้นสูงในแบคทีเรียกรดน้ำส้มหมัก

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร. กัญญา ชีระกุล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

E-mail Address : fscignt@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 31 สิงหาคม 2547 – 30 สิงหาคม 2550

ผู้วิจัยได้โคลนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน quinoprotein alcohol dehydrogenase (PQQ-ADH) คือ *adhA*, *adhB* และ *adhS* จาก *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 (สายพันธุ์ที่หมักกรดอะซิติก) และ *A. syzygii* SKU19 (สายพันธุ์ไวต่อกรดอะซิติก) ยีนทั้งสามกำหนดการสร้างหน่วยย่อยของเอนไซม์ PQQ-ADH คือ subunit I (dehydrogenase) subunit II (cytochrome c) และ subunit III (ไม่ทราบหน้าที่) ตามลำดับ ใน *A. pasteurianus* SKU1108 subunit I, II และ III ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 742, 472 และ 205 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนชนิดเดียวกันใน *A. syzygii* SKU19 เท่ากับร้อยละ 89, 86 และ 98.5 ตามลำดับ โดย subunit I ของ *A. syzygii* SKU19 มีการดัดแปลงเพิ่มขึ้น 1 กรดอะมิโน นอกจากนี้ยังพบว่าใน subunit III ของ *A. syzygii* SKU19 มีการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน 3 ตำแหน่งเมื่อเทียบกับ *A. pasteurianus* SKU1108 คือ 75Val เป็น 75Ala, 134Arg เป็น 134Gly และ 155Ile เป็น 155Thr นอกจากนั้น *adhS* disruptant (DPS) เจริญได้ดีกว่า wild type ในอาหารที่มีเอทานอล แม้ว่าจะไม่สามารถสร้างกรดอะซิติกและไวต่อกรดอะซิติกคล้ายกับสายพันธุ์กลาย CN6-2 จากการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ PQQ-ADH และ NAD-dependent ADH (NAD-ADH) ในสายพันธุ์กลายดังกล่าว พบว่ามีการเหนี่ยวนำให้กิจกรรมของเอนไซม์ NAD-ADH สูงขึ้นในสายพันธุ์ CN6-2 และ DPS แต่ไม่ใช้ในสายพันธุ์ *adhAB* gene disruptant (DP3) และยังพบว่าเฉพาะเอทานอลไม่รวมกรดอะซิติก เหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน *adhS* การเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีน *adhS* ไม่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตกรดอะซิติกทั้งในสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ *adhS* disruptant นอกจากนี้จากการทำ deletion analysis บริเวณ upstream ของยีน *adhS* แสดงให้เห็นว่าบริเวณที่คาดว่าเป็นโปรโมเตอร์ของยีนนี้อยู่ระหว่าง 118-268 คู่เบสทางด้าน upstream ของ initiation codon ผลจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งต่างๆ เช่น 18Leu เป็น 18Gln, 36Val เป็น 36Ile, 54Val เป็น 54Ile, 55Gly เป็น 55Asp, 70Val เป็น 70Ala, 107Val เป็น 107Ala และการที่กรดอะมิโนจำนวน 22 ตัวตรงปลายคาร์บอกซีหายไป ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ PQQ-ADH ในขณะที่การเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ตัวที่ 15 จาก C เป็น A ตรงบริเวณที่คาดว่าเป็น ribosome binding site มีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวต่ำลง และการที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 104 เปลี่ยนจาก Thr เป็น Lys และการขาดหายของกรดอะมิโนจำนวน 73 และ 140 ตัวตรงปลายคาร์บอกซี มีผลให้มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์

คำหลัก : แบคทีเรียกรดน้ำส้มหมัก alcohol dehydrogenase การตอบสนอง กรดอะซิติก เอทานอล

Abstract

Project code : RSA4780013

Project Title : Studies on Expression of Alcohol Dehydrogenase Gene and Adaptive Responses to High Concentrations of Ethanol and Acetic Acid in Thermotolerant Acetic Acid Bacteria

Investigator : Associate Professor Dr. Gunjana Theeragool, Kasetsart University

E-mail Address : fscignt@ku.ac.th

Project Period : 31 August 2004 – 30 August 2007

We successfully cloned and determined the nucleotide sequences of quinoprotein alcohol dehydrogenase (PQQ-ADH); *adhA*, *adhB* and *adhS* genes from *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 (acetic acid resistant strain) and *A. syzygii* SKU19 (acetic acid sensitive strain). These three genes encoding PQQ-ADH subunit I (dehydrogenase), subunit II (cytochrome c) and subunit III (unknown function), respectively. In *A. pasteurianus* SKU1108; subunit I, II and III consisted of 742, 472 and 205 amino acids with 89, 86 and 98.5% homology, respectively, with the same proteins from *A. syzygii* SKU19 and one additional amino acid was found in subunit I of *A. syzygii* SKU19. Three amino acid alterations, 75Val to 75Ala, 134Arg to 134Gly and 155Ile to 155Thr were observed in subunit III of *A. syzygii* SKU19. Moreover, *adhS* disruptant (DPS) grew even better than the wild type on the medium containing ethanol even though it completely lost the ability to produce acetic acid and became more sensitive to acetic acid similar to CN6-2. Comparison of PQQ-ADH and NAD-dependent ADH (NAD-ADH) activities in those mutants indicated an induction of NAD-ADH activity in CN6-2 and DPS but not in *adhAB* gene disruptant (DP3). It was also observed that only ethanol but not acetic acid induced *adhS* gene expression. Overexpressed *adhS* did not enhance acetic acid production in both wild type and *adhS* disruptant. In addition, deletion analysis of upstream region of *adhS* gene suggested that its tentative promoter(s) might be located at around 118-268 bp upstream from an initiation codon. The alterations of several amino acids of subunit III such as 18Leu to 18Gln, 36Val to 36Ile, 54Val to 54Ile, 55Gly to 55Asp, 70Val to 70Ala, 107Val to 107Ala and the mutant lacking 22 amino acid residues at C-terminal did not affect PQQ-ADH activity. However, the change of nucleotide C₁₅ to A₁₅ at a tentative ribosome binding site exhibited low PQQ-ADH activity and complete loss in its activity was obtained in the mutant carrying one amino acid change from 104Thr to 104Lys and the mutant lacking 73 and 140 amino acid residues at C-terminal.

Keywords : Thermotolerant acetic acid bacteria, alcohol dehydrogenase, adaptive response, acetic acid, ethanol