



ชีวเคมีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรีย Biochemistry of Bacterial Alcohol Dehydrogenases

วรวัฒน์ พรหมเด่น*

Worrawat Promden*

¹ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

* Correspondent author: p_worrawat@yahoo.com

บทคัดย่อ

เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันหรือรีดักชันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่างแอลกอฮอล์และแอลดีไฮด์หรือคีโตน สามารถจำแนกเอนไซม์กลุ่มนี้ตามชนิดของตัวรับอิเล็กตรอนได้เป็น 3 กลุ่ม คือ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่ขึ้นกับ NAD(P)^+ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่ไม่ขึ้นกับ NAD(P)^+ และแอลกอฮอล์ออกซิเดสชนิดที่ขึ้นกับ FAD มีการศึกษาพบว่าเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรียมีหลากหลายชนิดซึ่งมีความแตกต่างกันหลายประการ เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน โครงสร้างสามมิติของโปรตีน คุณสมบัติทางจลนศาสตร์การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ตำแหน่งที่พบเอนไซม์ในเซลล์ ตลอดจนกลไกการควบคุมการแสดงออกกระดบยีน ในบทความนี้กล่าวถึงองค์ความรู้ทางชีวเคมีพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการออกซิเดชันของแอลกอฮอล์

Abstract

Alcohol dehydrogenases (ADHs) catalyze the oxidative and reductive conversion of alcohols and aldehydes or ketones. They can be divided into three major categories; The NAD(P)^+ - dependent alcoholdehydrogenases, NAD(P)^+ - independent alcohol dehydrogenases and FAD-dependent alcohol oxidases. There are several varieties of alcohol dehydrogenases found in bacteria each of which may exist in several variants, e.g., molecular properties, catalytic properties, localization as well as gene expression and regulation. This article describes the basic knowledge of biochemistry that is related to bacterial alcohol dehydrogenases, especially in oxidation of alcohols.

คำสำคัญ: แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ออกซิเดชันของแอลกอฮอล์

Keywords: alcohol dehydrogenase, alcohol oxidation

1. บทนำ

แอลกอฮอล์เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ค่อยอยู่กับอะตอมของคาร์บอน โดยที่เมทานอล (methanol) เป็นแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอนน้อยที่สุดคือมีจำนวน 1 อะตอม (C1) แอลกอฮอล์โมเลกุลขนาดเล็กระหว่าง C1-C3 สามารถละลายน้ำได้ดีและคุณสมบัติการละลายน้ำจะลดลงเมื่อจำนวนอะตอมคาร์บอนมากขึ้น ในปฏิกิริยาเคมีทั่วไปการออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ปฐมภูมิ (primary alcohol) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลดีไฮด์ (aldehyde) ซึ่งจะสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปเป็นกรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ส่วนการออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ (secondary alcohol) จะได้คีโตน (ketone) ในขณะที่การออกซิเดชันของแอลกอฮอล์ตติยภูมิ (tertiary alcohol) จะเกิดขึ้นได้ยาก

ในระบบชีวภาพกระบวนการเมแทบอลิซึมของแอลกอฮอล์ผ่านกระบวนการออกซิเดชันมีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตหลายชนิดโดยอาจมีวัตถุประสงค์แตกต่างกันไป สำหรับในมนุษย์แอลกอฮอล์ชนิดเอทานอล (ethanol) ที่รับประทานเข้าไปจะถูกทำลายที่ตับโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase, ADH) เกิดเป็นอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และเปลี่ยนแปลงเป็นกรดแอซิติก (acetic acid) โดยเอนไซม์แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase, ALDH) แม้ว่าเมแทบอลิซึมของเอทานอลในท้ายที่สุดแล้วจะให้พลังงานแก่ร่างกายแต่ไม่จัดเป็นการบริโภคสารอาหารเพราะถือว่าเป็นกลไกกำจัดสารพิษของร่างกาย (detoxification)(1,2) ในขณะที่ระบบเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีความต้องการน้ำตาลกลูโคส ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารประกอบหลักในกระบวนการเมแทบอลิซึมที่มีวิธีการสลายสารประกอบเพื่อให้ได้พลังงาน แต่สำหรับจุลินทรีย์บางชนิดพบว่าในสภาวะที่ขาดแคลนอาหารจุลินทรีย์ได้แสดงความสามารถในการใช้แอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เป็นแหล่งอาหารเพื่อการสังเคราะห์พลังงานและการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดีได้แก่ *Methylobacterium extorquens*(3),

Comamonas testosteroni(4), *Pseudomonas aeruginosa*(5) และ *Pseudomonas putida*(6) เป็นต้น คุณสมบัติที่โดดเด่นของจุลินทรีย์เหล่านี้ทำให้สามารถนำมาศึกษาและประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้ทั้งในเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ รวมถึงการบำบัดสารมลพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมด้วยจุลินทรีย์ เช่น พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) และสารประกอบไฮโดรคาร์บอนต่างๆ(7, 8)

สารประกอบแอลกอฮอล์ในระบบเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์อาจได้มาจากกระบวนการหมักสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตหรืออาจมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ปัจจัยสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายสารอินทรีย์เหล่านี้คือเอนไซม์ชนิดต่างๆ ในแต่ละขั้นตอนของลำดับปฏิกิริยา ดังนั้นเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีรหัสพันธุกรรมสำหรับกำหนดรหัสให้เอนไซม์อย่างจำเพาะต่อซับสเตรต (substrate) ชนิดหนึ่งๆ เท่านั้นจึงจะมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบเหล่านี้ได้แม้ว่าจะเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาชนิดเดียวกันในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ก็ยังพบความแตกต่างกันในเชิงอนุชีววิทยาของเอนไซม์ เช่น ตำแหน่งที่พบในเซลล์ โครงสร้างสามมิติ คุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ลำดับกรดอะมิโน ลำดับนิวคลีโอไทด์และกลไกการควบคุมการแสดงออกระดับยีนการศึกษาในเชิงลึกระดับอนุชีววิทยาจะทำให้เกิดองค์ความรู้ในธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ อันจะเป็นพื้นฐานสำคัญในการประยุกต์สู่การใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด รวมถึงเพื่อการดัดแปลงพันธุกรรมให้สอดคล้องกับความต้องการใช้เฉพาะด้าน

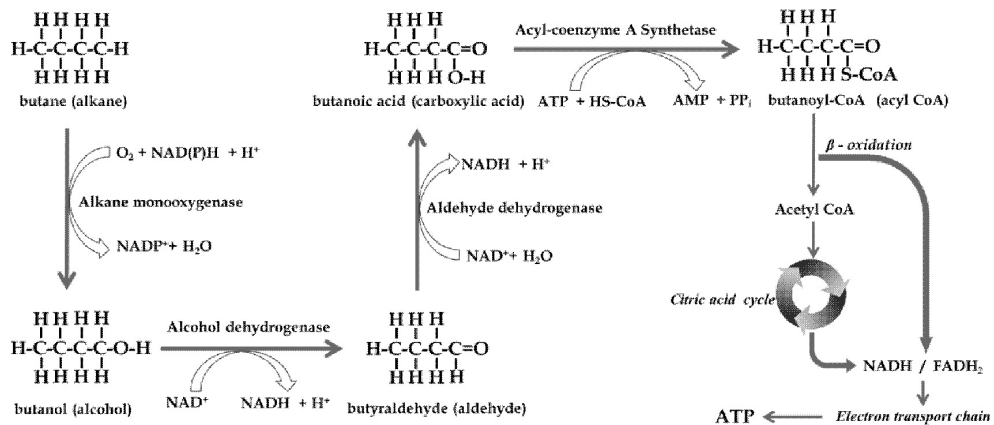
บทความนี้จะกล่าวถึงความรู้พื้นฐานและวิธีการศึกษาวิจัยเบื้องต้นทางชีวเคมีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรียเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยทางชีวเคมีขั้นสูงต่อไป

1. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการออกซิเดชันของแอลกอฮอล์และการรีดักชันของแอลดีไฮด์ในแบคทีเรีย

แหล่งที่มาของแอลกอฮอล์ในแบคทีเรียก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการออกซิเดชันอาจมีสารตั้งต้น

ชนิดอื่นที่ไม่ใช่แอลกอฮอล์แต่ถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ที่จำเพาะต่อซับสเตรตทำหน้าที่เติมหมู่ไฮดรอกซิลให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ซึ่งเรียกว่ากระบวนการไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) โดยเอนไซม์กลุ่มนี้มีชื่อเรียกทั่วไปคือเอนไซม์ไฮดรอกซิเลส (hydroxylase) หรือโมโนออกซิเจนเนส (monooxygenase) ในปฏิกิริยามีการรีดิวซ์โมเลกุลออกซิเจน (O_2) ให้แก่หมู่ไฮดรอกซิลและโมเลกุลของน้ำอย่างละ 1 อะตอม โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นร่วมกับการออกซิเดชันของโคเอนไซม์ (coenzyme) เช่น NAD(P)H (nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) เมื่อพิจารณาโครงสร้างโมเลกุลของแอลกอฮอล์ปฐมภูมิจะพบว่าโครงสร้างของโมเลกุลที่เป็นสารตั้งต้น (precursor) ก่อนที่จะเกิดเป็นแอลกอฮอล์

คือสารประกอบแอลเคน (alkane) ดังนั้นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เติมหมู่ไฮดรอกซิลให้แก่โมเลกุลแอลเคนจึงเรียกว่าเอนไซม์แอลเคนไฮดรอกซิเลสหรือแอลเคนโมโนออกซิเจนเนส ดังปฏิกิริยาในรูปที่ 1 นอกจากนั้นยังมีการเรียกชื่อเอนไซม์เหล่านี้ตามชนิดของซับสเตรตที่จำเพาะโดยเรียกชื่อของซับสเตรต เช่น มีเทน โพรเพนหรือ บิวเทน แล้วต่อด้วยคำว่าโมโนออกซิเจนเนส ในกรณีที่เอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเตรตอย่างกว้างขวางเป็นกลุ่มใหญ่อาจมีการเรียกชื่อเอนไซม์ด้วยกลุ่มของซับสเตรต เช่น แอลเคนไซส์ (short chain alkane) แอลเคนไซยาวปานกลาง (medium chain alkane) และแอลเคนไซยาว (long chain alkane) และต่อด้วยคำว่าโมโนออกซิเจนเนส



รูปที่ 1 กระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบแอลเคน (ตัวอย่างคือบิวเทน) ใน *Pseudomonas* spp. โดยเอนไซม์แอลเคนโมโนออกซิเจนเนสเกิดแอลกอฮอล์เป็นสารมัธยันตร์ (intermediate หรือ metabolite) แอลกอฮอล์เปลี่ยนเป็นแอลดีไฮด์โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส และเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อเนื่องจนได้พลังงานสำหรับเซลล์ (รูปดัดแปลงจาก Rojo F. (9))

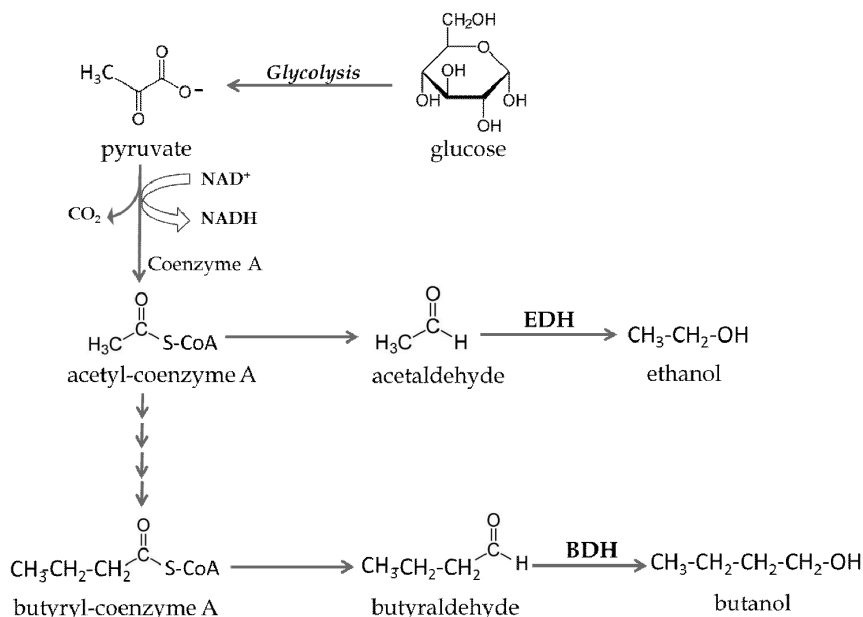
เอนไซม์ในลำดับต่อจากกระบวนการเติมหมู่ไฮดรอกซิลให้แก่โมเลกุลแอลเคนคือเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสซึ่งมีบทบาทชัดเจนในกระบวนการออกซิเดชันของแอลกอฮอล์เอนไซม์กลุ่มนี้มีแนวทางการเรียกชื่อในการทำงานคล้ายกับเอนไซม์แอลเคนโมโนออกซิเจนเนสคือขึ้นต้นด้วยชื่อกลุ่มหรือชื่อเฉพาะของซับสเตรตแต่ลงท้ายด้วยคำว่าดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ซึ่งมีความ

หมายถึงการออกซิไดซ์โมเลกุลซับสเตรตโดยปฏิกิริยารีดักชันซึ่งถ่ายทอดให้ออนประจุลบของไฮโดรเจน (hydride, H^-) ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนประเภทโคเอนไซม์ เช่น NAD^+ หรือไพโรควิโนลีนควิโนน (pyrroloquinoline quinone, PQQ) เป็นต้น ตัวอย่างของโมเลกุลแอลกอฮอล์ถูกออกซิไดซ์เป็นแอลดีไฮด์ในแบคทีเรีย ได้แก่ เมทานอลถูกออกซิไดซ์เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสที่เรียกว่าเมทานอลดีไฮโดรจีเนส (methanol dehydrogenase, MDH) ในขณะที่เอทานอลถูกออกซิไดซ์เป็นอะซีทัลดีไฮด์ โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสที่เรียกว่าเอทานอลดีไฮโดรจีเนส (ethanol dehydrogenase, EDH) เป็นต้น

เอนไซม์ที่สำคัญในลำดับต่อจากนี้คือเอนไซม์ แอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส ซึ่งจะออกซิไดซ์โมเลกุล แอลดีไฮด์ให้เป็นกรดคาร์บอกซิลิกซึ่งมีคุณสมบัติเป็น กรดอ่อน กรดคาร์บอกซิลิกที่เกิดขึ้นมีชื่อเรียกตาม จำนวนคาร์บอนได้แก่ กรดแอซติก (acetic acid, C2) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid, C3) เป็นต้น กรณีสี่ โซ่คาร์บอนของโมเลกุลกรดคาร์บอกซิลิกมีความยาวมากขึ้นจะมีคุณสมบัติการละลายน้ำลดลง ได้แก่ กรดบิวทิริก (butyric acid, C4) กรดออกทานิก (octanoic acid, C8) และเมื่อมีความยาวมากขึ้นกว่านี้จะจัดเป็นกรดไขมัน หมู่ คาร์บอกซิลของกรดอินทรีย์หรือกรดไขมันจะถูกเชื่อมต่อกับโมเลกุล โคเอนไซม์เอ (coenzyme A, CoA) ด้วยพันธะ ไทโอเอสเทอร์ (thioester) โดยเอนไซม์ในกลุ่มไลเกส (ligase) คือเอนไซม์แอซิลโคเอซินเทส (acyl CoA synthetase) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแฟตตีแอซิลโคเอนไซม์เอ (fatty acyl coenzyme A) ซึ่งพร้อมจะเข้าสู่การสลายกรด ไขมันด้วยกระบวนการเบตาออกซิเดชัน (β -oxidation) ซึ่งจะมีการตัดคาร์บอนออกครั้งละ 2 อะตอมจากโมเลกุล ของแฟตตีแอซิลโคเอนไซม์เอได้ผลิตภัณฑ์เป็นอะซิติล โคเอนไซม์เอ (acetyl coenzyme A) และเข้าสู่วัฏจักร

กรดซิตริก (citric acid cycle) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น คาร์บอนไดออกไซด์และ NADH ซึ่ง NADH จะเข้าสู่ห่วง โซ่การถ่ายทอดอิเล็กตรอน (electron transport chain) เพื่อผลิตสารประกอบพลังงานสูง คือ ATP (adenosine triphosphate)

อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์บางชนิดที่มีความเป็น เอกลักษณ์เฉพาะตัวอาจจะมีกระบวนการเมแทบอลิซึม ที่ตรงข้ามการย่อยสลาย ซึ่งหมายถึงการสังเคราะห์ แอลกอฮอล์จากสารอาหารดังรูปที่ 2 แบบที่เรารู้จักพบ วิถีเมแทบอลิซึมในลักษณะนี้ได้แก่ *Clostridium acetobutylicum* ที่สามารถผลิตบิวทานอลได้จากการ ย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสในกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไพรูเวต (pyruvate) และเกิดปฏิกิริยาต่อไปเป็นอะซิติลโคเอนไซม์เอ จนกระทั่ง เป็นบิวทิรัลดีไฮด์ (butyraldehyde) และถูกเอนไซม์บิว ทานอลดีไฮโดรจีเนส (butanol dehydrogenase, BDH) เปลี่ยนให้กลายเป็นบิวทานอลในที่สุด ในกรณีนี้จะเห็น ว่าปฏิกิริยาสุดท้ายที่เร่งโดยเอนไซม์บิวทานอลดีไฮโดร จีเนสเป็นการผันกลับจากสารประกอบแอลดีไฮด์กลายเป็นแอลกอฮอล์ซึ่งจัดเป็นปฏิกิริยารีดักชัน



รูปที่ 2 วิถีเมแทบอลิซึมใน *Clostridium acetobutylicum* ที่มีการสังเคราะห์แอลกอฮอล์จากสารอาหาร โดยเอนไซม์ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (EDH และ BDH) ทำหน้าที่เปลี่ยนแอลดีไฮด์ให้เป็นแอลกอฮอล์ (รูปดัดแปลง จาก Lutke-Eversloh T. และคณะ (10) และ Cooksley C. M. และคณะ (11))

2. การจำแนกประเภทของเอนไซม์ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสในแบคทีเรีย

การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสมีรายงานครั้งแรกในปีค.ศ. 1937 เริ่มจากการค้นพบและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และกล่าวได้นับตั้งแต่ปีค.ศ. 1950 เป็นต้นมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสอย่างแพร่หลายและเริ่มมีผลงานวิจัยออกมาอย่างต่อเนื่อง ในปี ค.ศ. 1961 มีรายงานเกี่ยวกับกลไกการเร่งปฏิกิริยาของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสที่สกัดจากตับม้า (horse liver alcohol dehydrogenase)(12) และในช่วงเวลาเดียวกันก็มีการศึกษาแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสในแมลงสกุลแมลงหวี่ หรือ *Drosophila*(13) ซึ่งเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสจากยีสต์ ม้า และแมลงหวี่นับได้ว่าเป็นต้นแบบการวิจัยและใช้อ้างอิงเปรียบเทียบของการศึกษาแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสในยุคต่อมา(14)

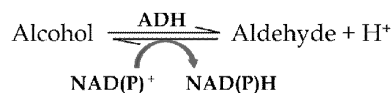
จากการที่องค์ความรู้ด้านชีวเคมีและข้อมูลชีวภาพมีมากขึ้นในการประชุมวิชาการชีวเคมีนานาชาติ (3rd International Congress of Biochemistry) ระหว่างวันที่ 1-6 สิงหาคมปีค.ศ. 1955 ณ เมืองบรัสเซลส์ (Brussels) ประเทศเบลเยียม มีการพิจารณาการจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์และกำหนดให้มีระบบเลขรหัสของเอนไซม์ (Enzyme Commission number, EC number) โดยประกาศใช้ครั้งแรกในปีค.ศ. 1961 จนกระทั่งในปีค.ศ. 1992 สมาคมชีวเคมีและอณูชีววิทยานานาชาติ (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) ได้มีการปรับปรุง EC number เป็นครั้งที่ 6 และใช้จนถึงปัจจุบัน ตัวเลขของ EC number จะมี 4 ชุด (EC x.x.x.x) ตัวเลขชุดแรกใช้ระบุชั้น (class) ของเอนไซม์ซึ่งมีเพียง 6 ชั้น ตัวเลขชุดที่ 2-4 ใช้ระบุ subclass-subclass และ serial number ตามลำดับตัวอย่างเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาชีวเคมีชนิดที่มีการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหนึ่งซึ่งเรียกว่าตัวให้อิเล็กตรอน (electron donor) ไปยังอีกโมเลกุลหนึ่งซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) มีการจัดหมวดหมู่เอนไซม์ที่มีปฏิกิริยาลักษณะนี้อยู่ในชั้น (class) ออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) กำหนดให้ตัวเลข class ของ EC number เป็น EC 1 หากเอนไซม์ทำปฏิกิริยา

บนหมู่ไฮดรอกซิลจะมีการกำหนดตัวเลข subclass ของ EC number เป็น EC 1.1 และหากเอนไซม์แต่ละชนิดอาจมีตัวรับอิเล็กตรอนที่จำเพาะ เช่น NAD(P)^+ ไซโตโครม (cytochrome) ควิโนน (quinone) หรือคอปเปอร์โปรตีน (copper protein) เป็นต้นจะกำหนดตัวเลข sub-subclass ของ EC number เป็น EC 1.1.1 EC 1.1.2 EC 1.1.5 หรือ EC 1.1.9 ตามลำดับเป็นต้น และในกรณีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงแบบผันกลับได้ระหว่างแอลกอฮอล์และแอลดีไฮด์โดยมี NAD^+/NADH เป็นตัวรับส่งอิเล็กตรอน จะกำหนดตัวเลข serial number ของ EC number เป็น EC 1.1.1.1

ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันแม้ว่าจะมีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาชนิดเดียวกันแต่พบว่ามีความแตกต่างกันตั้งแต่ลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ชนิดของตัวรับอิเล็กตรอน จนกระทั่งมีความแตกต่างกันในด้านความจำเพาะต่อซับสเตรตแม้ว่าจะมีการจัดหมวดหมู่และระบบเรียกชื่อเอนไซม์เพื่อให้สามารถศึกษาเข้าใจในภาพรวมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสจึงจัดจำแนกตามชนิดของตัวรับอิเล็กตรอนได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

2.1 แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสชนิดที่ขึ้นกับ NAD(P)^+ (NAD(P)^+ -dependent ADH)

แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนสชนิดที่ขึ้นกับ NAD^+ หรือ NADP^+ พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด เช่น สัตว์ พืช จุลินทรีย์ สามารถเขียนเป็นสมการของปฏิกิริยาได้ดังนี้



ในแบคทีเรียจะพบว่าเอนไซม์กลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ชนิดละลายน้ำ (soluble enzyme) พบในส่วนไซโทพลาซึมของเซลล์ (15) โครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์กลุ่มนี้พบว่ามีไทโรซีน (tyrosine residue) ในบริเวณเร่ง (active site) และลำดับกรดอะมิโนที่มีไกลซีนมาก (glycine-rich sequence) ซึ่งมีลำดับเป็น GGXXGXG(16) หรือ GXGXXG หรือ GXXGXG(17) สำหรับขึ้นรูปเป็นโครงสร้าง 3 มิติของโปรตีนแบบ β sheet-turn- α helix

เพื่อใช้เป็นบริเวณยึดจับ (binding site) โมเลกุล NAD^+ หรือ NADP^+ (18,19) นอกจากนี้ยังสามารถจำแนก NAD(P)^+ -dependent ADH ออกเป็น 3 กลุ่มย่อยได้ดังนี้

2.1.1 แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิด

ขึ้นกับสังกะสี (zinc-dependent ADH) หรืออาจเรียกว่ากลุ่มที่ 1 ซึ่งโมเลกุลของเอนไซม์จะมีอะตอมสังกะสีอยู่ในภายในทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในการเร่งปฏิกิริยาดังนั้นจึงมีลำดับกรดอะมิโนที่เป็นส่วนอนุรักษ์ (conserved region) สำหรับจับอะตอมสังกะสี (catalytic zinc binding motif) คือ GHEXXGXVXXXGXXV(20) ดังรูปที่ 3 ซึ่ง

แสดงถึงการมีวิวัฒนาการร่วมกันของสิ่งมีชีวิตตั้งแต่แบคทีเรียไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์กลุ่มนี้มีความยาวของกรดอะมิโนโดยเฉลี่ย 350 อะมิโนต่อหน่วยโปรตีนจึงมีชื่อเรียกว่าแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดสายยาว (long chain alcohol dehydrogenase) หรืออาจเรียกว่าแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดสายยาวปานกลาง (medium chain alcohol dehydrogenase) เนื่องจากมีความยาวของกรดอะมิโนโดยเฉลี่ยยาวกว่าแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดไม่ขึ้นกับสังกะสีแต่สั้นกว่าแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดไอรอนแอกทิเวตเพียงเล็กน้อย

```

P00330      --MSIPETQKGVI FYESHGKLEYKDIPVPKPKANELLINVKYSGVCHTDLHAWHGDWPL 57
AEN03783    -----MSGKMAAVVHEFGKPLTIEELDIPITKPTQILVKMIACGVCHTDLHAASGDWPK 55
ZP04296089  -----MKTKAIVSTPEKD-FNMQEVYLDEIKDDEVLVKIIASGICHTDATVLDTGTMPT 52
YP003617171 -----MEMEIKAAIVRQKNGPFLLEHVALNEPAEDQVLVRLVATGLCHTDVCRDQHPV 55
NP001075414 MSTAGKVIKCKAAVLWEQKKPFSIEEVEVAPPKAHEVRIMVAAGICRSDDHVVSGLTVA 60
P25984      -----MKGFAMLGINKLGWIEKERPVAGSYDAIVRPLAVSPCTSDIHTVFEGALG 50
               .       :       :       :       :       :       :       :
P00330      PVKLPVLVGGHEGAGVVVGMGENVKGWKIGDYAGIKWLNGSCMACEYCELGNESNCPHADL 117
AEN03783    KPHLPFIPGHEGVGTVVQVGSVDWVKEGDVVGVPWLYSACGHCEHCLAGWETLCAKQEE 115
ZP04296089 P--KPVVLGHEGSGIVEKVGSNVTLVKSGDHHVVLGFS--YCGHCENCLDGNAAACENMIE 108
YP003617171 P--LPMVFGHEGAGVVERVGSAAVKKVQPGDHVLTFF--TCGSCDACLSDGPTSCANSFG 111
NP001075414 P--LPVIAGHEAAGIVESIGEGVTVTRPGDKVIPLFIP-QCGKCSVCKHPEGNLCCLKNLS 117
P25984      D-RKNMILGHEAVGEVVEVGSVKDFKPGDRVIVPCTTPDWRSLVQAGFQHQHNGMLAG 109
               .:  ***.  *  *  :  *.  *  :  **  .

```

รูปที่ 3 การจัดวางแนวลำดับกรดอะมิโน (amino acid alignment) ของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่ขึ้นกับ NAD(P)^+ กลุ่มที่ 1 จากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* (P00330), *Acetobacter pasteurianus* (AEN03783), *Bacillus cereus* (ZP04296089), *Pseudomonas putida* (YP003617171), *Equus caballus* (NP001075414) และ *Clostridium beijerinckii* (P25984) ในกรอบสี่เหลี่ยมคือลำดับกรดอะมิโนส่วนอนุรักษ์ที่พบในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนและรหัส accession number สืบค้นจากฐานข้อมูล GenBank

2.1.2 แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิด

ไม่ขึ้นกับสังกะสี (zinc-independent ADH) หรือกลุ่มที่ 2 เมื่อพิจารณาตารางที่ 1 จะสังเกตได้ว่ามีความยาวของกรดอะมิโนสั้นกว่ากลุ่มที่ 1 โดยมีกรดอะมิโนประมาณ 250 อะมิโนต่อหน่วยโปรตีนและไม่มียะตอมสังกะสีภายในโมเลกุลเอนไซม์ ซึ่งจะพบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์สำหรับยึดจับโมเลกุล NAD(P)^+ แต่ไม่พบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์สำหรับยึดจับกับอะตอมสังกะสี ดังนั้นจึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดสายสั้นและไม่มีโลหะ (metal-free short-chain alcohol dehydrogenase) ในอดีตเอนไซม์กลุ่มนี้มีการ

ศึกษากันครั้งแรกในแมลงสาบ *Drosophila* และนิยมใช้แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของ *D. melanogaster* (แมลงหวี่) เป็นตัวแทนในการกล่าวถึงเอนไซม์กลุ่มนี้

2.1.3 แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิด

ไอรอนแอกทิเวต (iron activated ADH) หรือกลุ่มที่ 3 เอนไซม์กลุ่มนี้พบมากในแบคทีเรียและรา โมเลกุลเอนไซม์มีจำนวนกรดอะมิโนประมาณ 380 อะมิโนต่อหน่วยโปรตีน และบางชนิดอาจพบที่มีความยาวถึง 900 อะมิโนต่อหน่วยโปรตีน ภายในโมเลกุลของเอนไซม์มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ ซึ่งโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีนจะพบลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์สำหรับใช้ยึดจับอะตอมเหล็ก

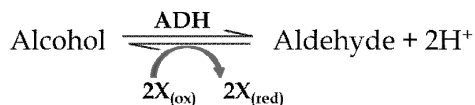
(iron-binding motif, GXXHXXAHXXGXXXXXPHG) *Zymomonas mobilis*(22) ดังนั้นจึงนิยมใช้เป็นตัวแทน (21) มีรายงานการค้นพบเอนไซม์นี้ครั้งแรกในแบคทีเรีย อ่างถึงเอนไซม์ในกลุ่มนี้

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะข้อมูลทางโครงสร้างของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่ขึ้นกับ NAD(P)⁺ ทั้ง 3 กลุ่ม ที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

กลุ่ม	สิ่งมีชีวิต	ชื่อเอนไซม์ (ตัวย่อ)/ Accession No.	จำนวน subunit (โครงสร้าง จตุรภูมิ)	จำนวนกรด อะมิโนต่อ subunit	อ้างอิง
Group I Zinc-dependent ADHs	<i>Equus caballus</i> (ม้า)	Horse liver alcohol dehydrogenase (HLADH) / NP001075414	2 (homodimer)	374	(23, 24)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ยีสต์)	alcohol dehydrogenase I (SADH I) / P00330	4 (homotetramer)	348	(25, 26)
	<i>Clostridium beijerinckii</i>	alcohol dehydrogenase (CBADH) / P25984	4 (homotetramer)	351	(27, 28)
	<i>Acetobacter pasteurianus</i> SKU1108	alcohol dehydrogenase (ADH I) / AEN03783	3 (homotrimer)	342	(29, 30)
Group II Zinc-independent ADHs	<i>Drosophila melanogaster</i> (แมลงหวี่)	alcohol dehydrogenase (DmADH) / P00334	2 (homodimer)	256	(14)
	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	alcohol dehydrogenase (Bt-ADH) / BAA94092	-	249	(16)
	<i>Thermus thermophilus</i>	alcohol dehydrogenase (ADH _{Tr}) / YP005594	4 (homotetramer)	256	(31, 32)
	<i>Lactobacillus brevis</i>	alcohol dehydrogenase (LB-RADH)/ YP794310	4 (homotetramer)	257	(33, 34)
Group III iron activated ADHs	<i>Zymomonas mobilis</i>	alcohol dehydrogenase (ZADH-2)/ 3OWOA	4 (homotetramer)	383	(22, 35)
	<i>Escherichia coli</i>	L-lactaldehyde and L-1,2- propanediol dehydrogenase (FucO) / P0A9S1	2 (homodimer)	383	(36)
	<i>Bacillus methanolicus</i>	Methanol dehydrogenase (MDH) / AAA22593	10 (homodecamer)	381	(37)
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Butanol dehydrogenase A (BDH I) / AAK81232	2 (homodimer)	389	(38-40)

2.2 แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่ไม่ขึ้นกับ NAD(P)⁺ (NAD(P)⁺-independent ADH)

เป็นเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่ไม่ขึ้นกับ NAD(P)⁺ พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น สัตว์ พืช จุลินทรีย์สามารถเขียนเป็นสมการของปฏิกิริยาได้ดังนี้



เมื่อ 2X_(ox) และ 2X_(red) คือ รูปแบบที่ถูกออกซิไดส์และถูกรีดิวซ์ของตัวรับอิเล็กตรอน (X) ตามลำดับ เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดนี้พบมากในแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative bacteria) โดยโมเลกุลเอนไซม์จะมีหมู่โปรสเทติก (prosthetic group) เป็นสารประกอบไพโรควิโนลิโนควิโนน (pyrroloquinoline quinone, PQQ) หรือเป็นโคเอนไซม์ F₄₂₀ (8-hydroxy-5-deazaflavin) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอน

เอนไซม์ที่มี PQQ เป็นหมู่โปรสเทติกจะมีชื่อเรียกโดยรวมว่า ควิโนโปรตีน (quinoprotein) หรืออาจเรียกว่าเอนไซม์ที่ขึ้นกับ PQQ (PQQ-dependent enzyme) ซึ่ง PQQ ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1964 โดย J.G. Hauge(41) โดยพบว่าเป็นหมู่โปรสเทติกของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (glucose dehydrogenase) ของแบคทีเรียและต่อมาในปี ค.ศ. 1967 มีรายงานว่า PQQ เป็นหมู่โปรสเทติกของเอนไซม์เมทานอลดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. M27 โดยเรียก PQQ ว่า methoxatin(42) ซึ่งนับว่าเป็นรายงานครั้งแรกของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่มีหมู่โปรสเทติกเป็น PQQ และภายหลังมีการศึกษาอย่างละเอียดถึงโครงสร้างระดับโมเลกุลในแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ควิโนโปรตีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (quinoprotein alcohol dehydrogenase, QADH) สามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภทตามคุณสมบัติทางอนุชีววิทยา การเร่งปฏิกิริยา และรวมไปถึงตำแหน่งในเซลล์ที่พบเอนไซม์ (43) ได้แก่ ADH-I ADH-II และ ADH-III ดังแสดงในตารางที่ 2

2.2.1 ADH-I เป็นเอนไซม์ชนิดที่ละลายน้ำพบอยู่ในส่วนของเพริพลาซึม (periplasm) ซึ่งอยู่

ระหว่างเยื่อเซลล์ชั้นนอกและชั้นใน ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วยที่เหมือนกัน (homodimeric enzyme) แต่ละหน่วยมีขนาดประมาณ 60-65 กิโลดาลตัน (kDa) และมี PQQ เป็นหมู่โปรสเทติกเพียงอย่างเดียว โดยมีรายงานว่าพบใน *P. aeruginosa* *P. butanovora* และ *P. putida* (6, 23) เป็นต้น ตัวอย่างได้แก่เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่มีความชอบ (affinity) ต่อเอทานอลสูงกว่าแอลกอฮอล์ชนิดอื่นๆ จะมีชื่อว่าควิโนโปรตีนเอทานอลดีไฮโดรจีเนส (QEDH) นักวิจัยบางกลุ่มได้รวมเอนไซม์ควิโนโปรตีนเมทานอลดีไฮโดรจีเนส (QMDH) ซึ่งมีความชอบต่อเมทานอลเท่านั้นไว้ในกลุ่ม ADH-I เนื่องจากโครงสร้างทางอนุชีววิทยาของเอนไซม์ทั้งสองมีความคล้ายคลึงมาก(44) อย่างไรก็ตามนักวิจัยบางกลุ่มเห็นว่า QMDH มีความจำเพาะต่อซับสเตรตที่เป็นเมทานอลเท่านั้นและสามารถเร่งปฏิกิริยาที่มีเมทานอลเป็นซับสเตรตได้ดีกว่า ADH-I ชนิดอื่นๆถึง 10⁴ เท่าจึงควรจัดกลุ่มแยกออกจาก ADH-I (43, 45, 46)

2.2.2 ADH-II เป็นเอนไซม์ชนิดที่ละลายน้ำพบอยู่ในส่วนของเพริพลาซึมของเซลล์ ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ประกอบด้วยหน่วยย่อย 1 หน่วย (monomeric enzyme) มีขนาดประมาณ 70-75 kDa มีหมู่โปรสเทติก 2 ชนิดคือ PQQ และ ฮีม (heme) จึงมีการเรียกชื่อโปรตีนชนิดนี้ว่าควิโนฮีโมโปรตีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (quinohemoprotein alcohol dehydrogenase, qhADH) มีรายงานการค้นพบได้แก่ควิโนฮีโมโปรตีนเอทานอลดีไฮโดรจีเนสใน *Comamonas testosteroni*(47) และควิโนฮีโมโปรตีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิด B และ G (ADH-IIB และ ADH-IIG) ใน *P. putida* HK5 โดยพบว่า ADH-IIB มีความจำเพาะต่อซับสเตรต ได้แก่ แอลกอฮอล์ปฐมภูมิสายยาวปานกลาง และแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ ในขณะที่ ADH-IIG มีความจำเพาะต่อซับสเตรตประเภทไดออล (diol) เท่านั้น(6)

2.2.3 ADH-III เป็นเอนไซม์ชนิดที่ตรึงอยู่บนเยื่อเซลล์ (membrane bound enzyme) พบบนเยื่อเซลล์ด้านไซโทพลาซึม เอนไซม์ ADH-III จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันแอลกอฮอล์ที่ไม่สามารถผันกับได้ โดยมี

ความจำเพาะต่อแอลกอฮอล์ปฐมภูมิยกเว้นเมทานอล มีขนาด 50 kDa เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยารีดักชัน โมเลกุลของเอนไซม์ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อยสำคัญ คือ ของยูบิควิโนน (ubiquinone) ซึ่ง อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์โดย หน่วยย่อยที่ 1 มีขนาด 80 kDa จะมีบริเวณเร่งปฏิกิริยา ยูบิควิโนนรับอิเล็กตรอนต่อจากฮีมซี และหน่วยย่อยที่ 3 (catalytic site) ที่เกี่ยวข้องกับ PQQ ซึ่งทำหน้าที่เป็น มีขนาด 20 kDa ซึ่งไม่มีโคแฟกเตอร์และยังไม่ทราบหน้าที่ โคแฟกเตอร์หลักและมีฮีมซี (heme c) 1 โมเลกุลทำหน้าที่รับ ชัดเจน มีรายงานว่าพบเอนไซม์ ADH-III ในแบคทีเรีย อิเล็กตรอนต่อจาก PQQ หน่วยย่อยที่ 2 หรือ หน่วย ชนิดที่ผลิตกรดแอซิดิก เช่น *Gluconobacter suboxydans* ไทรฮีมไซโตโครม ซี (triheme cytochrome c subunit) และ *Acetobacter pasteurianus* (48-50)

ตารางที่ 2 แสดงตำแหน่งในเซลล์ที่พบเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่ขึ้นกับ PQQ กลุ่มต่างๆ ในแบคทีเรีย

เอนไซม์	ตำแหน่งที่พบในเซลล์*	แบคทีเรียที่พบ
ควิโนโปรตีนที่สามารถออกซิไดซ์เมทานอล		
(หมู่พอสเทติก PQQ)		
Methanol dehydrogenase (MDH)	S	Methylotrophs
ควิโนโปรตีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส-I		
(ADH-I) (หมู่พอสเทติก PQQ)		
Ethanol dehydrogenase (QEDH)	S	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Alcohol dehydrogenase (ADH-I)	S	<i>Pseudomonas putida</i>
1-Butanol dehydrogenase (BOH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i>
ควิโนอีโมโปรตีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส- II		
(ADH-II) (หมู่พอสเทติก PQQ และ heme c)		
Ethanol dehydrogenase (qhEDH)	S	<i>Comamonas testosteroni</i>
Alcohol dehydrogenase (ADH IIB)	S	<i>Pseudomonas putida</i>
Alcohol dehydrogenase (ADH IIG)	S	<i>Pseudomonas putida</i>
1-Butanol dehydrogenase (BDH)	S	<i>Pseudomonas butanovora</i>
ควิโนอีโมโปรตีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส- III		
(ADH-III) (หมู่พอสเทติก PQQ และ heme c)		
Alcohol dehydrogenase	M	<i>Acetobacter aceti</i>
Alcohol dehydrogenase	M	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
Alcohol dehydrogenase	M	<i>Acidomonas methanolicus</i>
Alcohol dehydrogenase	M	<i>Gluconobacter suboxydans</i>

* S, soluble enzyme พบใน periplasm

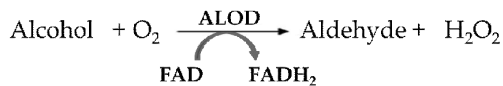
M, membrane bound enzyme พบบนเยื่อเซลล์ด้านไซโทพลาซึม

;ตารางดัดแปลงจาก Toyama H. และคณะ(45)

2.3 แอลกอฮอล์ออกซิเดสชนิดที่ขึ้นกับ

FAD (FAD-dependent alcohol oxidases, ALOD)

แอลกอฮอล์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในระบบออกซิเดชันของแอลกอฮอล์แต่มีความแตกต่างจากแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสคือการเร่งปฏิกิริยาที่ไม่สามารถผันกลับได้ ซึ่งเอนไซม์จะทำหน้าที่เปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นแอลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถเขียนเป็นสมการของปฏิกิริยาได้ดังนี้



แอลกอฮอล์ออกซิเดสซึ่งมี FAD (flavin adenine dinucleotide) เป็นโคแฟกเตอร์มีการค้นพบครั้งแรกในราเส้นใย (filamentous fungi) และยีสต์บางสายพันธุ์ที่มีระบบออกซิเดชันของเมทานอล (methylotrophic yeast) เช่น *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris* และ *Candida boidinii* เป็นต้น ซึ่งพบว่าเอนไซม์กลุ่มนี้จะมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 72-83 kDa (51, 54) ตัวอย่างเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสที่พบใน *H. polymorpha* จะมีลักษณะโครงสร้างเป็น 8 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน (homooctomeric enzyme) แต่ละหน่วยมีขนาด 83 kDa และมี FAD หน่วยละ 1 โมเลกุล คุณสมบัติของเอนไซม์พบว่ามีความชอบต่อเมทานอลสูง แต่ความชอบต่อซับสเตรตจะลดลงในกรณีที่คาร์บอนของแอลกอฮอล์ยาวมากขึ้น

3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีวเคมี

ในการศึกษาวิจัยทางด้านเอนไซม์ในแบคทีเรีย นอกจากจะต้องใช้ทักษะการวิจัยทางชีวเคมีแล้วยังต้องใช้ทักษะทางวิทยาศาสตร์แขนงอื่นๆ ที่สัมพันธ์กัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเทคนิคทางจุลชีววิทยา สำหรับกรณีการศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรียจะมีขั้นตอนพื้นฐานการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียที่คล้ายคลึงกัน ในขณะที่เป้าหมายการศึกษาวิจัยที่แตกต่างหลากหลายจะทำให้ต้องเลือกใช้เทคนิควิธีวิเคราะห์ที่แตกต่างกันไป ตัวอย่างขั้นตอนการศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรียมีดังนี้

3.1 การเตรียมแบคทีเรียเพื่อสกัดแยก

เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อสกัดเอนไซม์นิยมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (minimal medium หรือ basal medium) ที่ประกอบด้วยสารอาหารประเภทแร่ธาตุอาหารหลัก เช่น NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 และสารสกัดจากยีสต์ อีกทั้งมีการเติมแร่ธาตุอาหารรอง (trace element) เช่น H_3BO_3 , ZnSO_4 , NiSO_4 , $(\text{NH}_4)_6\text{MoO}_7$, CuSO_4 , MnSO_4 , CoCl_2 และ FeCl_3 ในขณะที่แหล่งคาร์บอนที่จะเติมลงในอาหารจะใช้แอลกอฮอล์ที่สนใจศึกษาที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเป็นการเหนี่ยวนำให้เชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เติมจะอยู่ในช่วง 0.2-1.0 % โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) ซึ่งจะทำให้การเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนโดยการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30-37°C ตามแต่ชนิดของสายพันธุ์แบคทีเรีย และจะทำการเก็บเชื้อเมื่อได้ระยะเวลาที่เหมาะสมเช่น 6-24 ชั่วโมงภายหลังการเติมแอลกอฮอล์หรือเมื่อวัดค่าความขุ่น (OD_{620}) ได้ค่าที่เหมาะสมโดยผู้วิจัยต้องทดลองเก็บเซลล์ที่ระยะต่างๆ เพื่อหาระยะเวลาที่มีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

ภายหลังจากที่เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตจนได้ค่าความขุ่นที่เหมาะสมจะทำการปั่นเก็บเซลล์ด้วยเทคนิคเซนทริฟูเกชัน (centrifugation) โดยใช้แรงเหวี่ยงสัมพัทธ์ (relative centrifugal force, RCF) ที่ 3,000 g-8,000 g และอุณหภูมิต่ำ (4°C) ประมาณ 15 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นและค่า pH เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสนิยมใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 10-50 mM เช่นบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate buffer) สำหรับช่วง pH 7.0-7.5 หรือบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl buffer) สำหรับช่วง pH 8.0-9.0 และกระจายเซลล์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์และสามารถรักษาสถียรภาพของเอนไซม์ได้ ซึ่งอาจเติม phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส (protease inhibitor) และเติมสารรีดิวซ์

(reducing agent) เช่น dithiothreitol (DTT) เพื่อป้องกันการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide) ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนที่อาจเกิดขึ้นได้จากกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine residue)

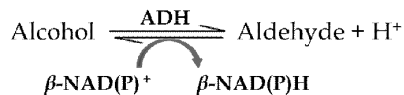
การทำให้เซลล์แตก (cell disruption) เพื่อศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสมีวิธีการที่นิยมใช้คือเทคนิคโฮโมจีไนเซชัน (homogenization) ซึ่งเป็นวิธีการใช้ความดันสูงทำให้เซลล์แตก (7,000-10,000 psi) โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า French pressure cell press (French press) การทำให้เซลล์แตกวิธีนี้จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ และเกิดเป็นถุงเล็กๆ ที่กลับด้าน (inside-out membrane vesicle) โดยเยื่อหุ้มเซลล์ด้านที่เยื่อหุ้มติดกับไซโทพลาซึมหันออกสู่สิ่งแวดล้อม ซึ่งจะเป็นลักษณะที่เหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ทางชีวเคมีในหลอดทดลอง (*in vitro*) ต่อไปในกรณีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสใน *P. putida* HK5 พบว่าสามารถใช้คลอโรฟอร์ม (chloroform) ในการทำให้เซลล์แตกได้ โดยการเติม คลอโรฟอร์มลงในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเซลล์แขวนลอยอยู่และทำการเขย่าอย่างแรง (vortex) แล้วจึงแยกเอาชั้นที่เป็นบัฟเฟอร์ออกมา โดยที่แอกทิวิตีของเอนไซม์ ADH-I ยังไม่เปลี่ยนแปลง

3.2 การวิเคราะห์แอกทิวิตีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ในการศึกษาด้านเอนไซม์สิ่งสำคัญอย่างยิ่งคือการวัดค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ เพราะจะทำให้ผู้วิจัยทราบได้ว่าเอนไซม์ที่กำลังศึกษาอยู่นั้นมีหน้าที่ตรงตามสมมติฐานที่ตั้งไว้หรือไม่ หรือเพื่อพิสูจน์ว่าการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์นั้นประสบผลสำเร็จหรือไม่ นอกจากนี้การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ยังใช้ในการอธิบายคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ (enzyme kinetics) เช่น ความเร็วของการเร่งปฏิกิริยา (velocity) ความจำเพาะต่อซับสเตรต (substrate specificity) การอธิบายกลไกการเร่งปฏิกิริยา (mechanism) และกลไกการยับยั้งเอนไซม์ (inhibition mechanism) แบบต่างๆ เป็นต้น หลักการวัดค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสมีดังนี้

3.2.1 การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่ขึ้นกับ NAD(P)⁺

การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ชนิดนี้สามารถใช้ได้กับเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่ขึ้นกับ NAD(P)⁺ ทั้ง 3 กลุ่มคือ Zn-dependent ADH Zn-independent ADH และ iron activated ADH ซึ่งอาศัยหลักการตรวจวัดปริมาณ β -NADH หรือ β -NADPH (reduced form) ที่เพิ่มขึ้นเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป(56) ดังนี้



β -NAD(P)⁺ มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 260 nm และมีค่า extinction coefficient (ϵ) เป็น $16,900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ในขณะที่ β -NAD(P)H มีค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 340 nm และมีค่า ϵ เป็น $62,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ความแตกต่างของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงสูงสุดของโมเลกุลนี้ในรูปถูกออกซิไดส์และรูปถูกรีดิวซ์สามารถนำมาใช้ตรวจวัดการดำเนินไปของปฏิกิริยาได้ด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 nm ที่เพิ่มขึ้นต่อหน่วยเวลา ซึ่งสามารถนำค่า ϵ ของ β -NAD(P)H มาใช้ในการคำนวณปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นและใช้คำนวณค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ได้

3.2.2 การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดที่ไม่ขึ้นกับ NAD(P)⁺

การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดนี้ใช้หลักการตรวจวัดทางอ้อม โดยการเติมสารตัวรับอิเล็กตรอน (artificial electron acceptor) ลงไปในปฏิกิริยาแล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารนั้นที่เกิดขึ้นในรูปถูกรีดิวซ์ซึ่งเรียกว่ารีดักเทสแอกทิวิตี (reductase activity)(57) ตัวอย่างเช่นเอนไซม์ ADH-I ใน *P. putida* HK5 ซึ่งในโมเลกุลมี PQQ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน สำหรับในปฏิกิริยาการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์จะเติมฟีนานซีนเมโทซัลเฟต (phenazine

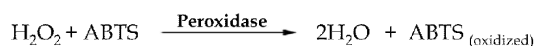
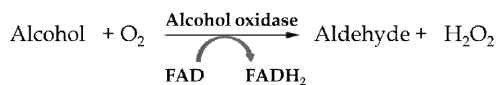
methosulfate, PMS) และ 2,6 dichlorophenol indophenol (DCPIP) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยาขึ้น PMS จะรับอิเล็กตรอนจาก PQQ หลังจากนั้นมีการส่งอิเล็กตรอนจาก PMS ไปยัง DCPIP ซึ่งมีสีน้ำเงิน เกิดเป็น DCPIP ในรูปออกซิไดซ์ซึ่งไม่มีสี ดังนั้นจึงสามารถติดตามปฏิกิริยาโดยการวัดสีน้ำเงินที่จางหายไปและอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 600 nm (ค่า ϵ ของ DCPIP คือ $21,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ที่ pH 9.0) อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีการวิเคราะห์ดังกล่าวไม่เหมาะสมในการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่ำกว่า 6.0 เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของสีและค่า ϵ ของ DCPIP ไปตามค่า pH ดังนั้นจึงต้องระมัดระวังการเลือกใช้ระบบบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ในกรณีของเอนไซม์ ADH-II ใน *P. putida* HK5 ซึ่งมีหมู่พอสเทติก 2 หมู่ คือ PQQ และ ฮีม จะใช้เทคนิคการวัดทางอ้อมเรียกว่าการวัดแอกทิวิตีของเฟอร์ริกไซยาไนด์รีดักเทส (ferricyanide reductase) ซึ่งในปฏิกิริยาจะมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก PQQ ไปยังหมู่ฮีมและจากนั้นเฟอร์ริกไซยาไนด์จะทำหน้าที่รับอิเล็กตรอนจากหมู่ฮีมเกิดเป็นเฟอร์ริกไซยาไนด์ที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์ซึ่งจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm ลดลง (ค่า ϵ ของเฟอร์ริกไซยาไนด์ คือ $1,040 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) การใช้เฟอร์ริกไซยาไนด์ในปฏิกิริยานี้สามารถใช้ระบบบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เป็นช่วงกว้างตั้งแต่ 3-9 ได้และในกรณีของเอนไซม์ ADH-III สามารถใช้วิธีการตรวจวัดแอกทิวิตีเช่นเดียวกับเอนไซม์ ADH-II แต่มีความแตกต่างกันในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเอนไซม์เนื่องจากเอนไซม์ ADH-III เป็นเอนไซม์ชนิดที่ตรึงอยู่บนเยื่อเซลล์ ดังนั้นภายหลังจากการทำให้เซลล์แตกด้วยเทคนิคโฮโมจีไนเซชันโดยใช้เครื่อง French press แล้ว จำเป็นต้องปั่นแยกเอาเศษเซลล์ออกด้วยความเร็วต่ำ จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงด้วยแรงเหวี่ยงสัมพัทธ์ประมาณ 68,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้ส่วนตะกอน (pellet) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane-bound protein fraction) ซึ่งสามารถทำการกระจายกลับคืน (resuspended) ด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมก่อนนำไปวัดค่าแอกทิวิตีและวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

3.2.3 การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์

แอลกอฮอล์ออกซิเดสชนิดที่ขึ้นกับ FAD

การวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ชนิดนี้อาศัยหลักการเกิดปฏิกิริยาคู่ควบกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase-coupled assay system) ซึ่งในขั้นแรกปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นแอลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และสารที่เกิดสี (chromogenic substrate) ทำให้สามารถติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยอ้อมผ่านการวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคสเปกโตรโฟโตเมตร



ตัวอย่างสารที่เกิดสีที่นิยมใช้ได้แก่

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) เมื่ออยู่ในรูปออกซิไดซ์จะกลายเป็นสารละลายสีเขียวที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 420 nm (ค่า ϵ ของ ABTS คือ $36,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

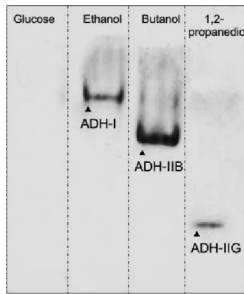
การคำนวณค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์จะได้ผลลัพธ์เป็นตัวเลขที่เรียกว่าหน่วยของเอนไซม์หรือยูนิต (Unit) ซึ่งจะมีการให้คำนิยามของค่ายูนิตดังนี้ 1 ยูนิตของเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงซับสเตรต (ในกรณีนี้คือ DCPIP หรือเฟอร์ริกไซยาไนด์ หรือ ABTS) ให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ (เช่น อยู่ในรูปออกซิไดซ์ หรือรูปออกซิไดซ์) ได้จำนวน 1 μmole ภายใน 1 หน่วยเวลา (เช่น 1 นาที) ภายใต้อุณหภูมิและ pH และอุณหภูมิที่กำหนด ดังนั้นยูนิตของเอนไซม์จึงมีหน่วยเป็นโมลต่อเวลา เช่น $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1}$ เอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์จะพบว่ามีปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ลดลงทุกๆ ขั้นตอน และเมื่อตรวจวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์อาจพบว่าได้ค่าแอกทิวิตีลดลงเนื่องจากการเสถียรภาพของเอนไซม์และการสูญเสียโมเลกุลเอนไซม์ระหว่างกระบวนการ อย่างไรก็ตามเมื่อนำค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ทั้งหมดหารด้วยน้ำหนักเป็น

มิลลิกรัมของโปรตีนทั้งหมดจะได้ค่าแอกทิวิตีจำเพาะ (specific activity) มีหน่วยเป็นไมโครโมลต่อนาทีต่อ มิลลิกรัมโปรตีน ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) ซึ่งจะเป็นค่าที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์สกัดหยาบและค่าแอกทิวิตีจำเพาะนี้สามารถใช้เปรียบเทียบความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นของกระบวนการสกัดแต่ละขั้นตอนได้ และยังสามารถใช้เปรียบเทียบผลการทดลองในแต่ละครั้งหรือแต่ละสภาวะการทดลองได้

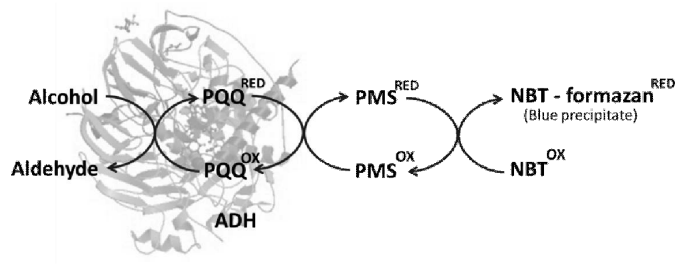
3.3 การใช้เทคนิค Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) เพื่อศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

การให้โปรตีนเคลื่อนที่ผ่านตัวกลาง เช่น เจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ภายใตสนามไฟฟ้าเรียกว่าเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ซึ่งนิยมใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่กำลังศึกษา โดยจะทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ด้วยการให้ความร้อนพร้อมกับการเติมสารลดแรงตึงผิวประจุลบ (anionic detergent) เช่น โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) และสารรีดิวซ์ (reducing agent) เช่น บีตา-เมอแคปโทเอทานอล (β -mercaptoethanol) เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide) ภายในสายโปรตีนโปรตีนที่ได้จะมีลักษณะเป็นสายยาวของพอลิเพปไทด์ที่ตลอดโมเลกุลอิมมูโนโกลบูลินและสามารถเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางบนสนามไฟฟ้าได้จากขั้วลบไปยังขั้วบวกโดยอัตราเร็วการเคลื่อนที่จะขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุลเท่านั้น เทคนิคดังกล่าวจึงเรียกว่า Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis หรือ SDS-PAGE และนิยมย้อมสีโปรตีนบนแผ่นเจลด้วยสี Coomassie brilliant blue R-250 ซึ่งเป็นสีที่จับกับโปรตีนได้ดี

นอกจากนี้ยังมีเทคนิคที่ให้โปรตีนคงสภาพธรรมชาติ (native) เคลื่อนที่ผ่านตัวกลางภายใต้สนามไฟฟ้าเรียกว่าเทคนิค native-PAGE (รูปที่ 4ก.) โดยที่โปรตีนหรือเอนไซม์ยังมีคุณสมบัติทางชีวภาพอยู่ภายในระบบอิเล็กโตรโฟรีซิสจะไม่มีการเติม SDS และมีการควบคุมอุณหภูมิให้ต่ำตลอดเวลาการเคลื่อนที่ของโปรตีนจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ขึ้นกับสัดส่วนประจุต่อมวลของโปรตีนนั้นๆ การศึกษาเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสด้วยเทคนิคนี้สามารถนำหลักการวัดรีดักเทสแอกทิวิตีมาใช้เพื่อระบุตำแหน่งของเอนไซม์บนแผ่นเจลได้เรียกว่าการย้อมแอกทิวิตี (activity staining) โดยได้ดัดแปลงวิธีการมาจากการย้อมแอกทิวิตีของเอนไซม์กลุ่มออกซิโดรีดักเทสที่ใช้สำหรับศึกษาห่วงโซ่การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย (mitochondrial electron transport chain complexes) ซึ่งเมื่อโมเลกุลของเอนไซม์เคลื่อนที่แยกออกจากโปรตีนชนิดอื่นๆ บนแผ่นเจลจะเสมือนว่าเอนไซม์ถูกทำให้บริสุทธิ์อยู่ในตำแหน่งหนึ่งบนแผ่นเจล หลังจากนั้นจึงนำแผ่นเจลมาทำปฏิกิริยาโดยการเติมซับสเตรต เช่น แอลกอฮอล์บัฟเฟอร์ โคแฟกเตอร์และมีการเติมตัวรับอิเล็กตรอน เช่น PMS และไนโตรบลูเตตราโซเลียม (nitro blue tetrazolium, NBT) บนแผ่นเจลที่เป็นตำแหน่งของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสที่เคลื่อนที่ไปถึงจะเกิดปฏิกิริยา จากนั้น PMS จะรับอิเล็กตรอนต่อจากโคแฟกเตอร์และเมื่อ NBT รับอิเล็กตรอนต่อจาก PMS แล้วจะทำให้ NBT อยู่ในรูปลูกรีดิวซ์ซึ่งเป็นสารประกอบที่ตกตะกอนมีสีน้ำเงิน-ม่วงเรียกว่าฟอร์มาซาน (formazan) (รูปที่ 4ข.) ซึ่งเป็นการยืนยันผลการศึกษาว่าเอนไซม์ที่สกัดได้มาเป็นเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจริง และอาจมีการยืนยันอีกครั้งด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต (Western blotting หรือ Immunoblotting) ซึ่งใช้หลักการติดฉลากบนโมเลกุลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนเป้าหมายในการตรวจสอบ



(ก)



(ข)

รูปที่ 4 (ก) การใช้เทคนิค Native-PAGE และการย้อมแอกทิวิตีของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสที่สกัดจาก *Pseudomonas putida* HK5 เมื่อเลี้ยงด้วยอาหาร basal medium และเติมแหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส เอทานอล บิวทานอล หรือ 1,2 โพรเพนไดออล ตามลำดับ ความเข้มข้นของอะครีลาไมด์ใน separating gel คือ 8.5% การย้อมแอกทิวิตีของเอนไซม์ใช้ซัพสเตรตผสมในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl pH 8.0 ที่ประกอบด้วย 1 mM ethanol, 1 mM butanol, 1 mM 1,2-propanediol, 0.2 mM PMS, 50 mM ethylamine และใส่ผลิตภัณฑ์ NBT 4-5 เกร็ด บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที (รูปโดย วรวัฒน์ พรหมเด่น) (ข) แสดงแผนผังการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสและการเกิดตะกอนน้ำเงิน-สีม่วงของฟอร์มazan

2. สรุป

จากความรู้ขั้นพื้นฐานตั้งแต่เรื่องโครงสร้างและสมบัติของสารชีวโมเลกุล เมแทบอลิซึมของสารอินทรีย์ และพื้นฐานจุลชีววิทยาเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้สามารถบูรณาการกับเทคนิควิธีการทางชีวเคมีเพื่อต่อยอดสู่งานวิจัยเชิงลึกของเอนไซม์ได้ ตัวอย่างของการใช้ความรู้และเทคนิคทางชีวเคมีในการศึกษาแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรียได้แก่ การศึกษาแบคทีเรีย *P. putida* HK5 โดยการเลี้ยงเซลล์ภายใต้สภาวะอาหารที่มีแอลกอฮอล์ต่างชนิดกัน จากนั้นจึงสกัดเอนไซม์และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนเอนไซม์ที่ได้ถูกนำไปผ่านกระบวนการอิเล็กโตรโฟเรซิสและย้อมแอกทิวิตี ผลลัพธ์ที่ได้จะพบแถบตะกอนสีม่วงของฟอร์มazan ซึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้คือ ในสภาวะอาหารที่มีกลูโคสเซลล์จะไม่มีการผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสลายแอลกอฮอล์จึงไม่พบแถบตะกอนบนแผ่นเจล ในขณะที่เมื่อใช้เอทานอล บิวทานอลและ 1,2 โพรเพนไดออลเป็นแหล่งอาหาร จะพบแถบตะกอนบนแผ่นเจลซึ่งแสดงถึงตำแหน่งของ

เอนไซม์ ADH-I ADH-IIB และADH-IIG ตามลำดับ เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ได้มีการศึกษาในระดับอนุชีววิทยาแล้วพบว่ามีความแตกต่างกันทั้งในด้านของลำดับชนิดกรดอะมิโนและจำนวนกรดอะมิโน (58-60) จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าได้ไม่เท่ากัน และจากผลการศึกษาทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ก่อนหน้านี้โดยใช้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ทำให้บริสุทธิ์แล้วจะพบว่ามี ความแตกต่างกันในส่วนของการจำเพาะต่อซับสเตรตที่เป็นแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ รวมทั้งค่า K_m และ V_{max} ต่อซับสเตรตชนิดต่างๆ (6) จากองค์ความรู้นี้สามารถนำเทคนิคต่างๆ ไปพัฒนาและประยุกต์เข้ากับงานวิจัยเพื่อศึกษาลักษณะการแสดงออกของโปรตีนในแบคทีเรียชนิดนี้ระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) และสายพันธุ์กลาย (mutant) (61,62) นอกจากนี้สาเหตุที่ทำให้ *P. putida* HK5 ผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสได้ต่างชนิดกันเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ต่างกันนั้น สามารถอธิบายได้ในระดับการควบคุมยีน (gene regulation) และการแสดงออกของยีน (gene expression) ซึ่งเป็นความรู้ทางชีวเคมีขั้นสูง โดยจะกล่าวถึงในโอกาสต่อไปในเรื่องเกี่ยวกับอนุชีววิทยาของเอนไซม์ชนิดนี้โดยเฉพาะ

3. เอกสารอ้างอิง

- (1) Lieber CS. Alcohol, liver, and nutrition. *J Am Coll Nutr.* 1991 Dec;10(6):602-32.
- (2) Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health.* 2003;27(3):220-31.
- (3) Chistoserdova L, Chen SW, Lapidus A, Lidstrom ME. Methylophily in *Methylobacterium extorquens* AM1 from a genomic point of view. *J Bacteriol.* 2003 May;185(10):2980-7.
- (4) Jongejan A, Jongejan JA, Duine JA. Homology model of the quinoxalene protein alcohol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *Protein Eng.* 1998 Mar;11(3):185-98.
- (5) Groen B, Frank J, Jr., Duine JA. Quinoprotein alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J.* 1984 Nov 1;223(3):921-4.
- (6) Toyama H, Fujii A, Matsushita K, Shinagawa E, Ameyama M, Adachi O. Three distinct quinoprotein alcohol dehydrogenases are expressed when *Pseudomonas putida* is grown on different alcohols. *J Bacteriol.* 1995 May;177(9):2442-50.
- (7) Kawai F, Hu X. Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009 Aug;84(2):227-37.
- (8) Lopes Ferreira N, Mathis H, Labbe D, Monot F, Greer CW, Fayolle-Guichard F. n-Alkane assimilation and tert-butyl alcohol (TBA) oxidation capacity in *Mycobacterium austroafricanum* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007 Jun;75(4):909-19.
- (9) Rojo F. Degradation of alkanes by bacteria. *Environ Microbiol.* 2009 Oct;11(10):2477-90.
- (10) Lutke-Eversloh T, Bahl H. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Curr Opin Biotechnol.* 2011 Oct;22(5):634-47.
- (11) Cooksley CM, Zhang Y, Wang H, Redl S, Winzer K, Minton NP. Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway. *Metab Eng.* 2012 Nov;14(6):630-41.
- (12) Theorell H, Mc KJ. Mechanism of action of liver alcohol dehydrogenase. *Nature.* 1961 Oct 7;192:47-50.
- (13) Sofer W, Martin PF. Analysis of alcohol dehydrogenase gene expression in *Drosophila*. *Annu Rev Genet.* 1987;21:203-25.
- (14) Benyajati C, Place AR, Powers DA, Sofer W. Alcohol dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*: relationship of intervening sequences to functional domains in the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 May;78(5):2717-21.
- (15) Anthony C. The structure of bacterial quinoprotein dehydrogenases. *Int J Biochem.* 1992;24(1):29-39.
- (16) Kato T, Miyana A, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S. Gene Cloning of an alcohol dehydrogenase from thermophilic alkane-degrading *Bacillus thermoleovorans* B23. *J Biosci Bioeng.* 2001;91(1):100-2.
- (17) Jornvall H, Persson B, Jeffery J. Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases. *Eur J Biochem.* 1987 Sep 1;167(2):195-201.
- (18) Scrutton NS, Berry A, Perham RN. Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature.* 1990 Jan 4;343(6253):38-43.
- (19) Lawton MP, Gasser R, Tynes RE, Hodgson E, Philpot RM. The flavin-containing monooxygenase enzymes expressed in rabbit liver and lung are products of related but distinctly different genes.

- J Biol Chem. 1990 Apr 5;265(10):5855-61.
- (20) Reid MF, Fewson CA. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. Crit Rev Microbiol. 1994;20(1):13-56.
 - (21) Bairoch A. PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. Nucleic Acids Res. 1991 Apr 25;19 Suppl:2241-5.
 - (22) Neale AD, Scopes RK, Kelly JM, Wettenhall RE. The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. Purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterisation and physiological roles. Eur J Biochem. 1986 Jan 2;154(1):119-24.
 - (23) Park DH, Plapp BV. Isoenzymes of horse liver alcohol dehydrogenase active on ethanol and steroids. cDNA cloning, expression, and comparison of active sites. J Biol Chem. 1991 Jul 15;266(20):13296-302.
 - (24) Ramaswamy S, Eklund H, Plapp BV. Structures of horse liver alcohol dehydrogenase complexed with NAD⁺ and substituted benzyl alcohols. Biochemistry. 1994 May 3;33(17):5230-7.
 - (25) Bennetzen JL, Hall BD. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehydrogenase. J Biol Chem. 1982 Mar 25;257(6):3018-25.
 - (26) Ramaswamy S, Kratzer DA, Hershey AD, Rogers PH, Arnone A, Eklund H, et al. Crystallization and preliminary crystallographic studies of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase I. J Mol Biol. 1994 Jan 14;235(2):777-9.
 - (27) Peretz M, Bogin O, Tel-Or S, Cohen A, Li G, Chen JS, et al. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and expression of genes encoding alcohol dehydrogenases from the thermophile *Thermoanaerobacter brockii* and the mesophile *Clostridium beijerinckii*. Anaerobe. 1997 Aug;3(4):259-70.
 - (28) Ismaiel AA, Zhu CX, Colby GD, Chen JS. Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. J Bacteriol. 1993 Aug;175(16):5097-105.
 - (29) Chinnawirotpisan P, Matsushita K, Toyama H, Adachi O, Limtong S, Theeragool G. Purification and characterization of two NAD-dependent alcohol dehydrogenases (ADHs) induced in the quinoprotein ADH-deficient mutant of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. Biosci Biotechnol Biochem. 2003 May;67(5):958-65.
 - (30) Masud U, Matsushita K, Theeragool G. Molecular cloning and characterization of two inducible NAD(+) -adh genes encoding NAD(+) -dependent alcohol dehydrogenases from *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. J Biosci Bioeng. 2011 Nov;112(5):422-31.
 - (31) Pennacchio A, Pucci B, Secundo F, La Cara F, Rossi M, Raia CA. Purification and characterization of a novel recombinant highly enantioselective short-chain NAD(H)-dependent alcohol dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. Appl Environ Microbiol. 2008 Jul;74(13):3949-58.
 - (32) Henne A, Bruggemann H, Raasch C, Wiezer A, Hartsch T, Liesegang H, et al. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. Nat Biotechnol. 2004 May;22(5):547-53.
 - (33) Niefind K, Muller J, Riebel B, Hummel W, Schomburg D. The crystal structure of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* suggests the structural basis of its metal dependency. J Mol Biol. 2003 Mar 21;327(2):317-28.
 - (34) Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, et al. Comparative genomics

- of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 17;103(42):15611-6.
- (35) Moon JH, Lee HJ, Park SY, Song JM, Park MY, Park HM, et al. Structures of iron-dependent alcohol dehydrogenase 2 from *Zymomonas mobilis* ZM4 with and without NAD⁺ cofactor. *J Mol Biol*. 2011 Apr 1;407(3):413-24.
- (36) Montella C, Bellolell L, Perez-Luque R, Badia J, Baldoma L, Coll M, et al. Crystal structure of an iron-dependent group III dehydrogenase that interconverts L-lactaldehyde and L-1,2-propanediol in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2005 Jul;187(14):4957-66.
- (37) de Vries GE, Arfman N, Terpstra P, Dijkhuizen L. Cloning, expression, and sequence analysis of the *Bacillus methanolicus* C1 methanol dehydrogenase gene. *J Bacteriol*. 1992 Aug;174(16):5346-53.
- (38) Nolling J, Breton G, Omelchenko MV, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, et al. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*. 2001 Aug;183(16):4823-38.
- (39) Petersen DJ, Welch RW, Rudolph FB, Bennett GN. Molecular cloning of an alcohol (butanol) dehydrogenase gene cluster from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol*. 1991 Mar;173(5):1831-4.
- (40) Walter KA, Bennett GN, Papoutsakis ET. Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isozyme genes. *J Bacteriol*. 1992 Nov;174(22):7149-58.
- (41) Hauge JG. Glucose Dehydrogenase of Bacterium *Anitratum*: an Enzyme with a Novel Prosthetic Group. *J Biol Chem*. 1964 Nov;239:3630-9.
- (42) Anthony C, Zatman LJ. The microbial oxidation of methanol. The prosthetic group of the alcohol dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. M27: a new oxidoreductase prosthetic group. *Biochem J*. 1967 Sep;104(3):960-9.
- (43) Goodwin PM, Anthony C. The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes. *Adv Microb Physiol*. 1998;40:1-80.
- (44) Diehl A, von Wintzingerode F, Gorisch H. Quinoprotein ethanol dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* is a homodimer--sequence of the gene and deduced structural properties of the enzyme. *Eur J Biochem*. 1998 Oct 15;257(2):409-19.
- (45) Kalyuzhnaya MG, Hristova KR, Lidstrom ME, Chistoserdova L. Characterization of a novel methanol dehydrogenase in representatives of *Burkholderiales*: implications for environmental detection of methylotrophy and evidence for convergent evolution. *J Bacteriol*. 2008 Jun;190(11):3817-23.
- (46) Toyama H, Mathews FS, Adachi O, Matsushita K. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Arch Biochem Biophys*. 2004 Aug 1;428(1):10-21.
- (47) Keitel T, Diehl A, Knaute T, Stezowski JJ, Hohne W, Gorisch H. X-ray structure of the quinoprotein ethanol dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: basis of substrate specificity. *J Mol Biol*. 2000 Apr 7;297(4):961-74.
- (48) de Jong GA, Caldeira J, Sun J, Jongejan JA, de Vries S, Loefer TM, et al. Characterization of the interaction between PQQ and heme c in the quinohemoprotein ethanol dehydrogenase from *Comamonas testosteroni*. *Biochemistry*. 1995 Jul 25;34(29):9451-8.

- (49) Yakushi T, Matsushita K. Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010 May;86(5):1257-65.
- (50) Matsushita K, Yakushi T, Toyama H, Adachi O, Miyoshi H, Tagami E, et al. The quinohemoprotein alcohol dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans* has ubiquinol oxidation activity at a site different from the ubiquinone reduction site. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Jan 5;1409(3):154-64.
- (51) Chinnawirotpisan P, Theeragool G, Limtong S, Toyama H, Adachi O, Matsushita K. Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. *J Biosci Bioeng*. 2003;96(6):564-71.
- (52) Hartner FS, Glieder A. Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact*. 2006;5:39.
- (53) Sakai Y, Tani Y. Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (AOD1) from the formaldehyde-producing asporogeneous methylotrophic yeast, *Candida boidinii* S2. *Gene*. 1992 May 1;114(1):67-73.
- (54) Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol*. 1989 Mar;9(3):1316-23.
- (55) Koutz P, Davis GR, Stillman C, Barringer K, Cregg J, Thill G. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast*. 1989 May-Jun;5(3):167-77.
- (56) Fassel TA, Buchholz LA, Collins ML, Remsen CC. Localization of methanol dehydrogenase in two strains of methylotrophic bacteria detected by immunogold labeling. *Appl Environ Microbiol*. 1992 Jul;58(7):2302-7.
- (57) Kagi JH, Vallee BL. The role of zinc in alcohol dehydrogenase. V. The effect of metal-binding agents on the structure of the yeast alcohol dehydrogenase molecule. *J Biol Chem*. 1960 Nov;235:3188-92.
- (58) Ameyama M, Nonobe M, Shinagawa E, Matsushita K, Adachi O. Method of enzymatic determination of pyrroloquinoline quinone. *Analytical Biochemistry*. 1985;151(2):263-7.
- (59) Toyama H, Fujii T, Aoki N, Matsushita K, Adachi O. Molecular cloning of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase, ADH IIB, from *Pseudomonas putida* HK5. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003 Jun;67(6):1397-400.
- (60) Toyama H, Chen ZW, Fukumoto M, Adachi O, Matsushita K, Mathews FS. Molecular cloning and structural analysis of quinohemoprotein alcohol dehydrogenase ADH-IIG from *Pseudomonas putida* HK5. *J Mol Biol*. 2005 Sep 9;352(1):91-104.
- (61) Promden W, Vangnai AS, Pongsawasdi P, Adachi O, Matsushita K, Toyama H. Disruption of quinoprotein ethanol dehydrogenase gene and adjacent genes in *Pseudomonas putida* HK5. *FEMS Microbiol Lett*. 2008 Mar;280(2):203-9.
- (62) Promden W, Vangnai AS, Toyama H, Matsushita K, Pongsawasdi P. Analysis of the promoter activities of the genes encoding three quinoprotein alcohol dehydrogenases in *Pseudomonas putida* HK5. *Microbiology*. 2009 Feb;155(Pt 2):594-603.