

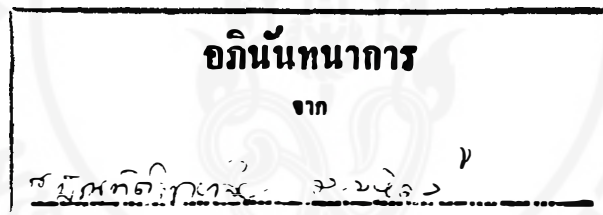


12 JUL 1994

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
NON HEME BROMOPEROXIDASES FROM *GRACILARIA SPECIES*

TUANGPORN SUTHIPHONGCHAI

๒



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
(BIOCHEMISTRY)

IN
Copyright by Mahidol University
FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1993

27135

วิทยานิพนธ์จะกล่าวถึงการทำให้บริสุทธิ์ และการศึกษาคุณสมบัติของโบรมิเปอร์ออกซิเดสจาก *G. fisheri*. จากการทำให้บริสุทธิ์เราได้เอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์ 3 ชนิด ได้แก่ B1, B3 และ B3L ซึ่งมี specific activity เท่ากับ 15.7, 311.4 และ 198 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับเอ็นไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้มี คุณสมบัติต่างกันหลายอย่าง B3 และ B3L เป็น monomer ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 68 กิโลดาลตัน ในขณะที่ B1 มีน้ำหนักโมเลกุล 560 กิโลดาลตัน เป็น oligomer ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) ที่มีขนาด 68 กิโลดาลตัน Isoelectric point ของ B1, B3 และ B3L เท่ากับ 7, 6.6 และ 3.2 B1 และ B3 มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งแตกต่างกับ B3L อย่างไรก็ตาม เอ็นไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ มีปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นกรด (Glx, Asx) มากกว่ากรดอะมิโนที่เป็นด่าง (Lys, Arg, His) จากการศึกษาทางจลนศาสตร์ใน pH ที่เหมาะสมคือ 5.8 พบว่า K_m สำหรับ MCD, H_2O_2 และ KBr ของ B1 เท่ากับ 0.7 μM , 0.03 mM และ 0.12 mM, ของ B3 เท่ากับ 0.7 μM , 0.1 mM และ 0.2 mM, และของ B3L เท่ากับ 0.2 mM, 0.3 mM และ 0.14 mM. เอ็นไซม์ทั้ง 3 นี้ทนต่อความร้อนได้ดี โดยเฉพาะ B3 และ B3L

ในการศึกษาหมู่โปรสเทติก พบว่าเอ็นไซม์ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีฮีม เนื่องจากไม่พบ Soret band ในสเปกตรัมของเอ็นไซม์ เอ็นไซม์จะสูญเสียแอกติวิตี เมื่อโคอะไลซ์กับ EDTA ที่ pH ต่ำ เอ็นไซม์ที่สูญเสียแอกติวิตีนี้ สามารถถูกกระตุ้นกลับมาได้ด้วยวานาเดียม อีออน ในขณะที่อีออนของโลหะอื่นๆ และฮีม ไม่สามารถกระตุ้นได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีวานาเดียมในเอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์ และปริมาณวานาเดียมในเอ็นไซม์นี้ มีความสัมพันธ์กับปริมาณแอกติวิตีของเอ็นไซม์ จากหลักฐานทั้งหมดนี้จึงสรุปได้ว่า เอ็นไซม์ทั้ง 3 นี้เป็น โบรมิเปอร์ออกซิเดสที่ไม่มีฮีม และมีวานาเดียมเป็นหมู่โปรสเทติก เอ็นไซม์บริสุทธิ์ของ B1 มีวานาเดียม 0.18 โมลต่อ 1 โมลของ B1 subunit B3 และ B3L 1 โมล มีวานาเดียม 0.6 โมล เอ็นไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยวานาเดียมเต็มที่จะมีวานาเดียม 1 โมลต่อเอ็นไซม์ 1 โมล หรือ 1 subunit ของ B1 แม้ว่าเอ็นไซม์ 3 ตัวนี้จะทนต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และไฮยาไนด์ได้น้อยกว่า วานาเดียมโบรมิเปอร์ออกซิเดสตัวอื่นๆ แต่ก็ยังมีข้อดีคือทนต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้

Thesis Title Molecular Characterization of Non Heme
Bromoperoxidases from *Gracilaria species*

Name Tuangporn Suthiphongchai

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee : Bhinyo Panijpan, Ph.D.
Pintip Ruenwongsa, Ph.D.
Worachart Sirawaraporn, Ph.D.
Amaret Bhumiratana, Ph.D.

Date of Graduation : 10 May B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

Haloperoxidase, the peroxidase enzyme that can catalyze peroxidative halogenation in the presence of hydrogen peroxide, should offer a wide range of possibility for commercial applications, especially in chemical synthesis and analytical diagnosis. In general peroxidases from many sources so far are hemoprotein. In last decade, many non-heme haloperoxidases are found mainly bromoperoxidases from marine algae. These enzymes are more resistant to azide, cyanide and hydrogen peroxide than the heme containing ones, pointing to some advantages with respect to commercial applications.

Red algae from the Gulf of Thailand were examined for haloperoxidatic activity. Seven species, viz., *Gracilaria changii*, *G. edulis*, *G. firma*, *G. fisheri*, *G. irregularis*, *G. salicornia*, and *G. tenuistipitata* showed bromoperoxidatic activity. The enzyme extracts showed both bromoperoxidatic activity and peroxidatic activity (in the presence of bromide ion). The isoenzyme patterns on NDPAGE were different from species to species, and there were peroxidatic and bromoperoxidatic activity bands which did not correspond.

Purification and characterization of bromoperoxidases from *G. fisheri* are described. Three BPO isoenzymes were purified namely B1, B3 and B3L with the specific activity of 15.7, 311.4 and 198 U/mg protein, respectively. These three purified enzymes were different in several properties. B3 and B3L were monomer with molecular weight of 68 kd whereas B1 was oligomer of 560 kd with the same subunit size as B3 and B3L. The isoelectric point of B1 B3 and B3L were 7, 6.6 and 3.2, respectively. The amino acid compositions of B1 and B3 were similar whereas that of B3L were significantly different. However, all three showed to contain higher acid amino acids (Glx, Asx) than basic amino acids (Lys, Arg, His). The kinetic studies performed under optimum pH at 5.8 showed that the K_m for MCD, H_2O_2 and KBr of B1 were 0.7 μ M, 0.03 mM and 0.1 mM, of B3 were 0.7 μ M, 0.1 mM and 0.2 mM and of B3L were 2 μ M, 0.3 mM and 0.14 mM. These enzyme are remarkably thermostable especially B3 and B3L.

In the studies of prosthetic group, these three enzymes were shown to be non-heme proteins by the absence of Soret band. The enzymes were deactivated by dialysis against EDTA at low pH and these deactivated enzymes were reactivated specifically only by vanadium not other metal ions nor heme. Furthermore, the purified enzymes showed to contain vanadium by atomic absorption spectrometer and the vanadium content in the enzyme samples were related to enzyme activity. Thus, these 3 BPOs were concluded to be non-heme bromoperoxidase containing vanadium as prosthetic group. The purified B1 contained 0.18 mole of vanadium per mole of enzyme subunit, B3 and B3L contained 0.6 mole of V per mole of enzyme. The fully vanadium activated purified enzymes, B1, B3 and B3L, contained about one mole of vanadium per mole of enzyme (subunit). Although these enzymes were less resistant to azide and cyanide compared to other vanadium BPOs, the enzymes were highly resistant to H_2O_2 , the advantage in application purposes.