LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

A BETTER WAY FOR ASSAYING BROMOPEROXIDASE IN BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

RACHANEEPORN JENWITHISUK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

With compliments
of
.....

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1996

Copyright by Mahidol University

TH
R119b
1996

36135

ชื่อวิทยานิพนธ์ การหาวิธีที่เหมาะสมในการวัดความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดสเพื่อการประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้วิจัย รัชนีพร เจนวิถีสุข
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์
พิณทิพ รื่นวงษา , Ph.D.
ภิญโญ พานิชพันธ์ , Ph.D.
ตวงพร สุทธิพงษ์ชัย , ปร.ด.
วันที่สำเร็จการศึกษา 13 พฤษภาคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

โบรโมเปอร์ออกซิเดส เป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มเฮโลเปอร์ออกซิเดสที่สามารถเร่งปฏิกริยาเปอร์ออกซิเดทีฟโบรมิเนชั่นกับสับสเตรทได้หลายชนิด เมื่อมีไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ เอ็นไซม์นี้ก็มีปัญหาในการตรวจวัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตี คือ ขาดสับสเตรทที่มีคุณสมบัติที่ดีสำหรับใช้ตรวจวัดแอกติวิตี MCD เป็นสับสเตรทที่นิยมใช้กันมานานก็มีข้อเสีย คือ เป็นสารไม่มีสี และเมื่อทำปฏิกริยากับเอ็นไซม์ก็ให้ผลผลิตที่ไม่มีสีเช่นเดียวกัน ซึ่งทำให้เกิดความยุ่งยากในการตรวจวัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสแอกติวิตี ต่อมา phenol red ได้ถูกนำมาใช้เป็นสับสเตรท ซึ่งมีข้อดี คือ เป็นสารมีสี และเมื่อทำปฏิกริยากับเอ็นไซม์จะสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีระหว่างสับสเตรทกับผลิตผลได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดที่ง่ายและสะดวก แต่อย่างไรก็ตาม phenol red ก็มีข้อเสีย คือ ในการเกิดปฏิกริยาโบรมิเนชั่นของ phenol red นั้น

Copyright by Mahidol University

จะให้สารผลิตผลที่เป็นอนุพันธ์ของ phenol red 4 ชนิด ปะปนกัน ซึ่งทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาจลนศาสตร์ของเอ็นไซม์ได้ ดังนั้นสับสเตรทที่มีคลอรีนอะตอม 3 อะตอมบน phenol red น่าจะเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับโบรโมเปอร์ออกซิเดส เพราะว่ามีตำแหน่งสำหรับโบรมิเนชั่นเพียงตำแหน่งเดียว

ดังนั้นในรายงานนี้ Trichlorophenolred ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก dichloro-phenol red โดยใช้เอ็นไซม์คลอโรเปอร์ออกซิเดส ในการเกิดปฏิกริยาเมื่อใช้ คลอโร-เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกริยาจะมีการเปลี่ยนแปลงของสีจากสีเหลืองของ dichlorophenol red(λ_{max} 430 nm) เป็นสีน้ำตาลอ่อนของสารผลิตผล(λ_{max} 575 nm) จากการวิเคราะห์สารผลิตผลที่เกิดขึ้นโดย HPLC พบว่าผลิตผลที่ได้จากการสังเคราะห์มี 2 ตัว คือ Trichlorophenol red และ tetrachlorophenol red ที่ retention time 2.42 นาที (peak III) และ 1.87 นาที (peak I) และ สับสเตรท dichlorophenol red ที่ retention time 2.21 นาที (peak II) TLC สามารถแยกสารผลิตผลเหล่านี้ โดยใช้ amyl alcohol-ethanol-conc. NH_4OH (50:45:5) เป็น mobile phase ค่า R_f ของ di-, tri- และ tetrachlorophenol red เท่ากับ 0.35, 0.40 และ 0.42 ตามลำดับ สารเหล่านี้สามารถทำการแยกได้โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีคอลัมน์ชนิด DEAE-cellulose ซึ่งสามารถแยกออกได้ 3 ชนิด คือ dichloropheno red (สีเหลือง, λ_{max} 435 nm), trichlorophenol red (สีน้ำตาลอ่อน, λ_{max} 445 nm และ 580 nm) และ tetra-chlorophenol red (สีฟ้า, λ_{max} 590 nm) จากการหาค่า pKa โดยวิธีไตเตรท พบว่า ค่า pKa ของ di -, tri - และ tetrachlorophenol red เท่ากับ 5.7 - 6.0 , 4.4-4.6 และ

Copyright by Mahidol University

3.9-4.1 ตามลำดับ trichlorophenol red ได้ถูกนำมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับโบรโม-เปอร์ออกซิเดส โดยเปรียบเทียบกับ phenol red และ dichlorophenol red ในการเกิดปฏิกริยาโบรมิเนชั่นพบว่า trichlorophenol red ให้การเปลี่ยนแปลงของสีเกิดขึ้นเร็วที่สุด เร็วกว่า dichlorophenol red 3 เท่า และเร็วกว่า phenol red 5 เท่า และพบว่า trichlorophenol red มี lag time น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับ dichlorophenol red และ phenol red ค่า Km ของ trichlorophenol red สำหรับเอ็นไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส (2.23×10^{-5} M) สูงกว่าค่า Km ของ phenol red (8.02×10^{-6} M) 3 เท่า และสูงกว่าค่า Km ของdichlorophenol red (5.75×10^{-6} M) 4 เท่า นอกจากนี้ trichlorophenol red เป็นสับสเตรทที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ MCD เมื่อนำไปใช้ศึกษาจลนศาสตร์ของเอ็นไซม์ เนื่องจากการเกิดปฏิกริยาโบรมิเนชั่นของ trichloro-phenol red สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่าและสามารถวัดได้ง่ายในเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นในช่วงที่ตามองเห็นได้ และมี lag time น้อยกว่า MCD

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	A Better Way for Assaying Bromoperoxidase in Biotechnological Applications
Name	Rachaneeporn Jenwithisuk
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	
	Pintip Ruenwongsa , Ph.D
	Bhinyo Panijpan , Ph.D
	Tuangporn Suthiphongchai , Ph D.
Date of Graduation	13 May B E 2539 (1996)

ABSTRACT

Bromoperoxidase, the haloperoxidase enzyme that catalyzes the peroxidative bromination of many organic substrates in the presence of hydrogen peroxide. The problem with assay of bromoperoxidase activity is the lack of a good substrate The traditional haloperoxidase substrate, namely monochlorodimedone (MCD), has no color and produces colorless product which can be detected with difficulty Phenol red is a good substrate in terms of being easily detectable by observation the color change visually or measuring the increase in absorbance at 590 nm However, in bromination of phenol red, the product is actually a mixture containing some mono-, di-, tri- and tetrabrominated phenol red derivatives and the enzyme kinetics can not be determined correctly In this study, we therefore propose that a substrate with three chlorine atoms on phenol red may be an appropriate substrate for bromoperoxidase, since only a single site can be brominated

Copyright by Mahidol University

Dichlorophenol red was chlorinated to give tri- and tetrachlorinated phenol red by using chloroperoxidase (CPO) In the CPO- catalyzed reaction,

the yellow color of dichlorophenol red (λ_{max} 430 nm) changed to the light brown chlorinated product (λ_{max} 575 nm) When the reaction mixture was analyzed by HPLC, three peaks appeared, i e., peak I (RT 1 87 min), peak II (RT 2.21 min) and peak III (RT 2 42 min) which were tetra-, di- and trichlorophenol red, respectively. The chlorinated products of dichlorophenol red could be separated on TLC plates, using amyl alcohol-ethanol-conc NH_4OH (50:45:5) as mobile phase The R_f values of di-, tri- and tetrachlorophenol red were 0.35, 0.40 and 0.42, respectively Dichlorophenol red and its chlorinated products were separated by DEAE-cellulose column chromatography. Three peaks, peak A, peak B and peak C, were obtained Peak A (yellow color with λ_{max} 435 nm), peak B (light brown color with λ_{max} 445 nm and 580 nm) and peak C (blue color with λ_{max} 590 nm) were di-, tri- and tetrachlorophenol red, respectively The pKa values of di-, tri- and tetrachlorophenol red were determined by titration technigue to be 5 7 - 6 0, 4 4 - 4.6 and 3 9 - 4.1, respectively. Trichlorophenol red was used as substrate for assaying bromoperoxidase in comparison with phenol red and dichlorophenol red The color-changed after bromination of trichlorophenol red, dichlorophenol red and phenol red appeared at 2, 5 and 10 min after the reaction was started. Determination of Km values for bromoperoxidase of phenol red, dichlorophenol red and trichlorophenol red showed that Km of trichlorophenol red ($2\ 23 \times 10^{-5}$ M) was 3 times higher than that of phenol red ($8\ 02 \times 10^{-6}$ M) and 4 times higher than that of dichlorophenol red ($5\ 75 \times 10^{-6}$ M). In addition, the lag time observed in bromoperoxidase assay was almost insignificance when trichlorophenol red was used as substrate when compared to phenol red substrate; however, the lag time observed in dichlorophenol red is a little bit higher than that of trichlorophenol red The purple-colored trichlorophenol red gave blue-colored product upon bromination with BPO which have advantage over MCD which produced colorless product

Copyright by Mahidol University

Moreover, the lag time observed in bromoperoxidase assay with trichloro-phenol red substrate was less than that observed with MCD substrate

Copyright by Mahidol University