HALOPEROXIDASES
AND
THEIR ANALYTICAL DIAGNOSTIC APPLICATIONS

CHAMRAS PROMPTMAS

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

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1994

30551

ชื่อวิทยานิพนธ์ ฮาโลเปอร์ออกซิเดสและการประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์เพื่อการวินิจฉัย

ผู้วิจัย จำรัส พร้อมมาศ

ปริญญา ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ภิญโญ พานิชพันธ์, Ph.D.

พิณทิพ รื่นวงษา, Ph.D.

ทิมโมธี ฟลีเกล, Ph.D.

สมศักดิ์ รุจิรวัฒน์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา ๑๑ ตุลาคม พ.ศ. ๒๕๓๗

บทคัดย่อ

ฮาโลเปอร์ออกซิเดสเป็นกลุ่มเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาการเติมหมู่ฮาไลด์เข้าไปในสารตัวรับหมู่ฮาไลด์ที่เป็นสารอินทรีย์ โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมด้วย เอ็นไซม์ในกลุ่มนี้แบ่งออกได้เป็น ๓ กลุ่มใหญ่ๆ ตามความสามารถในการใช้หมู่ฮาไลด์ คือ คลอโรเปอร์ออกซิเดส สามารถใช้คลอไรด์ โบรไมด์และไอโอไดด์ ส่วนโบรโมเปอร์ออกซิเดส สามารถใช้โบรไมด์และไอโอไดด์ สำหรับไอโอโดเปอร์ออกซิเดส สามารถใช้ไอโอไดด์ได้เพียงอย่างเดียว

หลายทศวรรษที่ผ่านมา มีความพยายามนำเอาเอ็นไซม์ในกลุ่มนี้มาประยุกต์ใช้งาน แต่ส่วนใหญ่จำกัดอยู่ที่การใช้เอ็นไซม์ฮอสเรดิสเปลุร์ออกซิเดส เอ็นไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีการศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้งานคือคลอโรเปอร์ออกซิเดส ที่เตรียมได้จากเชื้อรา *Caldariomyces fumago* เนื่องจากมีการสำรวจพบเอ็นไซม์ในสาหร่ายทะเลสีแดงที่ขึ้นกระจายอยู่ตามชายฝั่งทะเลรอบอ่าวไทย ที่สามารถแสดงปฏิกริยาแบบเดียวกับโบรโมเปอร์ออกซิเดส โดยเฉพาะในสาหร่ายทะเลสีแดงชนิด *Gracilaria changii* จึงอาจนำมาประยุกต์ใช้งานในรูปแบบต่างๆ ได้

Copyright by Mahidol University

วิทยานิพนธ์นี้มีจุดประสงค์เพื่อ เตรียมเอ็นไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส และคลอโรเปอร์ออกซิเดสให้มีความบริสุทธิ์ขั้นต้น และนำมาศึกษาการประยุกต์ใช้ในเชิงการวิเคราะห์เพื่อการวินิจฉัย

โบรโมเปอร์ออกซิเดสจาก *G. changii* สามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ขั้นต้นด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วย ๕๐ % เอทธานอล และการใช้ DEAE cellulose chromatography ซึ่งจะได้ผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ๒๐.๑๑ เท่า และมี specific activity เท่ากับ ๑๒.๒๗ ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน สำหรับการเตรียมคลอโรเปอร์ออกซิเดสให้มีความบริสุทธิ์ขั้นต้น จาก *C. fumago* โดยใช้ DEAE cellulose chromatography จะได้ผลผลิตที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ๔.๑๗ เท่า และมี specific activity เท่ากับ ๑๐๗๙.๓ ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน

ในการศึกษาโบรโมเปอร์ออกซิเดส คลอโรเปอร์ออกซิเดส และแลคโตเปอร์ออกซิเดส เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์หาปริมาณโบรไมด์อิออนในสารละลายตัวอย่าง พบว่าเมื่อใช้สารฟีนอลเรดเป็นสับเสตรทที่ให้สีเมื่อเกิดการเติมหมู่โบรไมด์แล้ว โบรโมเปอร์ออกซิเดสสามารถวิเคราะห์ปริมาณโบรไมด์ได้ในระดับความเข้มข้นที่ ๒๕ - ๔๐๐ ไมโครโมล่าร์ ด้วยความถูกต้อง และแม่นยำระหว่าง ๙๖.๔ - ๑๐๑.๑ % recovery และ ๑.๔๘ - ๒.๕๖ % coefficient of variation สำหรับแลคโตเปอร์ออกซิเดส ให้ผลในการวิเคราะห์ที่มีความไวต่ำกว่าโบรโมเปอร์ออกซิเดส ส่วนคลอโรเปอร์ออกซิเดสสามารถใช้วัดปริมาณโบรไมด์ในระดับเป็นมิลลิโมล่าร์เท่านั้น

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Haloperoxidases and Their Analytical Diagnostic Applications.

Name Chamras Promptmas

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee

Bhinyo Panijpan, Ph.D.

Pintip Ruenwongsa, Ph.D.

Timothy W. Flegel, Ph.D.

Somsak Ruchirawat, Ph.D.

Date of Graduation 11 October B.E. 2537 (1994)

ABSTRACT

Haloperoxidases are group of enzyme that catalyze the peroxidative halogenation reaction in the presence of hydrogen peroxide, a halide ion and a halogen acceptor. These enzymes can be classified into 3 major groups according to the range of halide ions that they utilize, chloroperoxidase, bromoperoxidase and iodoperoxidase, respectively. Iodoperoxidase utilizes iodide ion while bromoperoxidase can additionally use bromide ion. Chloroperoxidase usually accepts chloride, bromide and iodide ions as substrates.

In this group, the most popular enzyme applied in coupled enzyme assays and enzyme immunoassays is horseradish peroxidase. Chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* has been extensively studied for several applications as a synthetic tool and as an analytical diagnostic reagent.

Copyright by Mahidol University

Thai seaweeds naturally grown along the seacoast of the Gulf of Thailand contain bromoperoxidase activity. Bromoperoxidase from the seaweed *Gracilaria changii* was partially purified using 50 % ethanol precipitation and DEAE cellulose chromatography. The product was purified 20.11 fold to yield a specific activity of 12.27 U/mg protein. Chloroperoxidase from *C. fumago* was also partially purified using DEAE cellulose chromatography. This product was purified 4.17 fold to yield a specific activity of 1079.3 U/mg protein.

In studies of analytical applications of haloperoxidases, a spectrophotometric method for measuring bromide ion concentration was developed. The assay reaction was based on the change of color from yellow to purplish blue through the bromination of phenol red to bromophenol blue catalyzed by bromoperoxidase, chloroperoxidase and lactoperoxidase in the presence of bromide ion and hydrogen peroxide. The assay method using bromoperoxidase as the brominating enzyme gave an assay range between 25 - 400 μM and with % recovery and % coefficient of variation ranges of 96.4 - 101.1 % and 1.48 - 2.65 %, respectively.

Copyright by Mahidol University