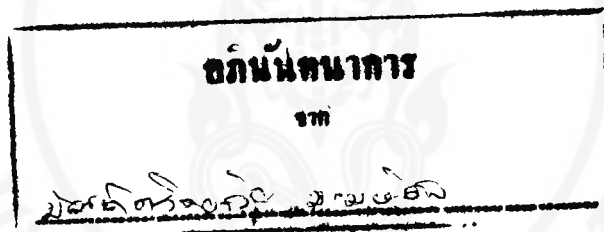




13 JAN 1991

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BROMOPEROXIDASE FROM  
THAI SEAWEEDS POLYCARVERNOSA SP.

TAMRONGVIT CHAIJAROONPORN



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

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

1990

16479

ชื่อวิทยานิพนธ์                      การทำที่บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของ เอนไซม์ โบรโมเบอร์-  
 ร็อกซิเดส จากสาหร่ายทะเล ชนิด โพลีคาร์เวอ์โนซา  
 ผู้วิจัย                                      ธีรกรวิทย์ ชัยจรรยาพร  
 ปริญญา                                      วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

พิณทิพ รุ่งนางษา, Ph.D.

ภิญญา พานิชพันธ์, Ph.D.

พิชิต โคลสุโขวงศ์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา              28 มิถุนายน พ.ศ. 2533

#### บทคัดย่อ

เอนไซม์ โบรโมเบอร์ร็อกซิเดส ได้ถูกทำที่บริสุทธิ์จาก สาหร่ายทะเล ชนิด โพลีคาร์เวอ์โนซา โดยวิธี ตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ตกตะกอนด้วยสารละลายต่าง โครมาโตกราฟฟิคอลัมน์ชนิด DEAE cellulose และ โครมาโตกราฟฟิคอลัมน์ชนิด Sephadex G-100 สามารถที่จะแยกเอนไซม์โบรโมเบอร์ร็อกซิเดสได้ 2 ชนิด, พิค I และ พิค II, ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติหลายอย่างที่แตกต่างกัน รวมทั้ง คุณสมบัติทางด้านจลศาสตร์ เอนไซม์โบรโมเบอร์ร็อกซิเดส ชนิด พิค I มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 71,000 ดาลตัน ขณะที่ชนิด พิค II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45,000 ดาลตัน ซึ่งหาโดยวิธีโครมาโตกราฟฟิคอลัมน์ชนิด Sephadex G-100 ค่าIsoelectric point ของเอนไซม์โบรโมเบอร์ร็อกซิเดสชนิด พิค I และ ชนิด พิค II มีค่าเท่ากับ 4.7 และ 6.8 ตามลำดับ pHที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิด พิค I และ พิค II มีค่าเท่ากับ 5.0 และ 5.8 ตามลำดับ เอนไซม์โบรโมเบอร์ร็อกซิเดสชนิด พิค I มีความคงทนใน pH กรด (5-9) ขณะที่ชนิด พิค II มีความคงทนใน pH ที่เป็นด่าง (7-12) อุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับเอนไซม์ชนิด พิค I และ ชนิด พิค II มีค่าเท่ากับ 50 องศา และ 55 องศา ตามลำดับ เอนไซม์โบรโมเบอร์ร็อกซิเดสชนิด พิค I และ ชนิด พิค II มีความทนทานทาง

ด้านอุณหภูมิล้ำยคลึงกัน กล่าวคือ เอนไซม์ทั้งสองชนิดเสียเอ็คทีวิตีที่ 50 % ขณะอุ่นที่อุณหภูมิ 55 องศา เป็นเวลา 30 นาที สเป็คตรัมของเอนไซม์โบรมเบอรัร็อกซิเดสชนิด พิค I มี Soret band ที่ 403 นาโนเมตรซึ่งเป็นคุณสมบัติของฮีโมโพรทีน อย่างไรก็ตาม สเป็คตรัมของเอนไซม์ชนิด พิค II ไม่มี Soret band แสดงว่า เอนไซม์ พิค II ฆ่าเชื้อชนิดฮีโมโพรทีน ทั้งเอนไซม์โบรมเบอรัร็อกซิเดสชนิด พิค I และ พิค II สามารถที่จะเร่งปฏิกิริยาโบรมิเนชันของ monochlorodimedone (MCD), phenol red และ xylene cyanole FF ค่า  $K_m$  สำหรับ MCD, phenol red และ xylene cyanole FF ของเอนไซม์ชนิด พิค I มีค่าเท่ากับ  $6.9 \times 10^{-6}$  M,  $4.4 \times 10^{-6}$  M และ  $3.1 \times 10^{-6}$  M ตามลำดับ ค่า  $K_m$  สำหรับ MCD, phenol red และ xylene cyanole FF ของเอนไซม์ชนิด พิค II มีค่าเท่ากับ  $6.4 \times 10^{-5}$  M,  $1.5 \times 10^{-5}$  M และ  $2.7 \times 10^{-5}$  M ตามลำดับ ค่า  $K_m$  สำหรับ  $H_2O_2$  ของ พิค II มีค่าอยู่ในช่วง  $10^{-5}$  M สำหรับ ออกซิเดชันสเตอรอยด์ และ ค่า  $K_m$  สำหรับ KBr ของเอนไซม์ พิค II มีค่าอยู่ในช่วง  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  M เอนไซม์เอ็คทีวิตีของทั้ง พิค I และ พิค II ถูกยับยั้งได้โดย azide, cyanide และ 3-aminotriazole อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ชนิด พิค I ถูกยับยั้งโดย azide ดีมากกว่า ชนิด พิค II ผลของ effector บางชนิดที่มีต่อ เอ็คทีวิตีเอนไซม์โบรมเบอรัร็อกซิเดสทั้งชนิด พิค I และ พิค II ได้ถูกศึกษาด้วยเหมือนกัน

Thesis Title            Purification    and    Characterization    of  
                                 Bromoperoxidase    from    Thai    seaweeds  
                                 Polycarvernosa sp.

Name                      Tamrongvit Chaijaroonporn

Degree                    Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee :

                                 Pintip Ruenwongsa  
                                 Bhinyo Panijpan  
                                 Pichit Tosukhowong

Date of Graduate        28 June B.E. 2533 (1990)

#### ABSTRACT

Bromoperoxidase was purified from Thai red seaweeds Polycarvernosa sp. by alcohol precipitation, alkaline precipitation, DEAE cellulose column chromatography and Sephadex G-100 column chromatography. Two types of bromoperoxidase, peak I and peak II, were obtained; they were different in several properties, including kinetic property. Peak I bromoperoxidase had a molecular weight of 71,000 daltons whereas peak II enzyme had a molecular weight of 45,000 daltons as determined by Sephadex G-100 column chromatography. The isoelectric point of peak I and peak II bromoperoxidase were 4.7 and 6.8 respectively. The optimum pH of peak I bromoperoxidase was 5.0 whereas that of peak II enzyme was 5.8. Peak I bromoperoxidase was stable in an acidic pH range from 5 to 9 whereas peak II enzyme was stable in an alkaline pH range from 7 to 12. The optimum temperature of

peak I and peak II bromoperoxidase were 50 °C and 55 °C respectively. Peak I and peak II enzyme had similar thermal stability; 50 % of the activity was lost after incubation at 55 °C for 30 min. The spectrum of peak I bromoperoxidase showed the Soret band at 403 nm, a characteristic of heme protein. However, the Soret band was not found in the spectrum of peak II enzyme indicating that peak II bromoperoxidase was not a heme protein. Both peak I and peak II enzyme catalyzed the bromination of monochlorodimedone (MCD), phenol red and xylene cyanole FF. The  $K_m$  values for MCD, phenol red and xylene cyanole FF of peak I were  $6.9 \times 10^{-6}$  M,  $4.4 \times 10^{-6}$  M and  $3.1 \times 10^{-6}$  M respectively. The  $K_m$  values for MCD, phenol red and xylene cyanole FF of peak II were  $6.4 \times 10^{-5}$  M,  $1.5 \times 10^{-5}$  M and  $2.7 \times 10^{-5}$  M respectively. The  $K_m$  values for  $H_2O_2$  of peak II were in the range of  $10^{-5}$  M for all three organic substrates and the  $K_m$  values for KBr of peak II enzyme were in the range of  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  M. Activities of both peak I and peak II bromoperoxidase were inhibited by azide and cyanide, however peak I was more susceptible to azide inhibition than peak II enzyme. Effect of some effectors on activities of both peak I and peak II bromoperoxidase were also studied.