LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

BROMOPEROXIDASE IN THAI SEAWEEDS

1 7 มี.ค. 2532

BANCHA VEOKEKI

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

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1988

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล

Copyright by Mahidol University

12060

ชื่อวิทยานิพนธ์ เอนไซม์โบรโมเปอร็อกซิเดสในสาหร่ายทะเลของไทย

ผู้วิจัย นายบัญชา แววเกถี

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

นาย ภัณโณ พานิชพันธ์

นางสาว พิณทิพ รื่นวงษา

นาย พิชิต โตสุโขวงศ์

นาย อมเรศ ภูมิรัตน์

วันที่สำเร็จการศึกษา 23 พฤษภาคม 2531

บทคัดย่อ

สาหร่ายทะเลตามชายฝั่งทะเลไทยถูกสำรวจเพื่อหาเอนไซม์เฮโลเปอ-ร็อกซิเดส โมโนคลอโรไดมิโดน, สีเบอร์ 421 และสีเบอร์ 143 ถูกใช้เป็นสับสเตรท. มีเพียงเอนไซม์โบรโมเปอร็อกซิเดสถูกพบในสาหร่ายทะเล. การแยกเอนไซม์จากสาหร่ายแดงและการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ถูกบรรยาย. 48% yield และ 12 fold purification ของเอนไซม์โบรโมเปอร็อกซิเดสถูกได้หลังจากผ่าน DEAE-cellulose column. เอนไซม์โบรโมเปอร็อกซิเดสสามารถใช้โบรไมด์อิออนและไอโอไดด์อิออน เมื่อมีไฮโดรเจนเปอร็อกไซด์และออร์กานิคสับสเตรท.

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โบรโมเปอร็อกซิเดส ประมาณ 54,000 ซึ่งถูกกำหนดโดย Sephadex G-100 column และอย่างน้อย 4 isoenzyme bands ถูกพบเมื่อใช้ isoelectric focusing. มันถูกพบว่าเอนไซม์โบรโมเปอร็อกซิเดสสามารถเก็บไว้ได้ดีที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อใช้โมโนคลอโรไดมิโดนเป็นสับสเตรทจะมีค่า Km เท่ากับ [illegible]$\times10^{-5}$ ของ H_2O_2 เท่ากับ 9.1×10^{-5} M, และ Km ของ KBr เท่ากับ [illegible] M สำหรับสีเบอร์ 421 , H_2O_2, KBr ถูกใช้เป็นสับสเตรทค่า Km จะเท่ากับ [illegible] M, [illegible] M และ 1.7x

Copyright by Mahidol University

10^{-2} M ตามลำดับ. ในกรณีที่ใช้สีเบอร์ 143 เป็นสับสเตรทค่า Km เท่ากับ $5.1x10^{-6}$ M ขณะที่ Km ของ H_2O_2 เท่ากับ $1.3x10^{-4}$ M และ Km ของ KBr เท่ากับ $1.5x10^{-2}$ เอนไซม์โบรโมเปอร็อกซิเดสจาก Polycarvernosa ถูกยับยั้ง activity โดย NaN_3, KCN และสับสเตรทที่ความเข้มข้นสูงด้วย. เอนไซม์มีเสถียรภาพในช่วงของ pH ตั้งแต่ 6 ถึง 11 และมี optimum pH ที่ 5.8 เอนไซม์สามารถทนต่อความร้อนได้สูงถึง 50 องศาเซลเซียสโดยไม่เสียสภาพธรรมชาติ การ stain activity ของโบรโมเปอร็อกซิเดสถูกกระทำโดยใช้สีเบอร์ 143

สำหรับการตรวจหา activity ของโบรโมเปอร็อกซิเดสโดยปราศจากเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์, agarose gel และ กระดาษกรองถูกพัฒนาให้ใช้เป็นวิธีใหม่สำหรับตรวจหา activity ของเอนไซม์.

Copyright by Mahidol University

Thesis Title: Bromoperoxidase from Thai Seaweeds

Name: Bancha Veokeki

Degree: Master of Science (Biochemistry)

Thesis Supervisory Committee:

Bhinyo Panijpan

Pintip Ruenwongsa

Pichit Tosukhowong

Amaret Bhumiratana

Date of Graduation: May 23, 1988

ABSTRACT

Thai seaweeds were surveyed for haloperoxidase activity. Monochlorodimedone, C.I. 421 and dye No.143 were used as substrates. Only bromoperoxidase activity was found. The isolation and purification of bromoperoxidase from the marine red algae, *Polycarvernosa*, is described. By using a DEAE-cellulose column, 48% yield and 12 fold purification of bromoperoxidase was obtained. The bromoperoxidase can utilize bromide ions and iodide ions in the presence of hydrogen peroxide and a halogen acceptor.

Based on gel filtration by Sephadex G-100 column the molecular weight of bromoperoxidase was 54,000 and at least 4 isoenzyme bands were seen when isoelectric focusing was performed. It was found that partially purified bromoperoxidase was better kept at 4^{0}C than at -20^{0}C and lyophilization. The apparent Km value for monochlorodimedone

Copyright by Mahidol University

was $2.2x10^{-5}$M, that for H_2O_2 was $9.1x10^{-5}$M and KBr was $1.1x10^{-2}$M. For C.I.421 as substrate, Km value was $1.2x10^{-5}$M whereas the apparent Km value for H_2O_2 was $7.2x10^{-5}$M and KBr was $1.7x10^{-2}$M. In case of dye No. 143 as substrate, its apparent Km value was $5.1x10^{-6}$M while Km for H_2O_2 was $1.3x10^{-4}$M and that for KBr was $1.5x10^{-2}$M. Bromoperoxidase from *Polycarvernosa* was inhibited by hemoprotein inhibitors NaN_3 and KCN. It was also inhibitable by high concentrations of substrates. Some properties of partially purified bromoperoxidase such as pH optimum , pH stability and heat stability are reported. The optimum pH of the enzyme was 5.8 ,and the enzyme was stable in a range from pH 6.0 to 11.0 . The enzyme was heat-stable . It resisted denaturation at 50°C. Staining the activity of bromoperoxidase was performed by using dye No. 143-74-8.

For detecting the bromoperoxidase activity without spectrophotometry, the agarose gel and the filter paper were developed as the new convenient methods. Dye No.143-74-8 with agarose gel and filter paper were used for detecting the bromoperoxidase activity from various marine algae.

Copyright by Mahidol University