

บทที่ 1

บทนำ

1.1 เหตุผลและที่มาของงานวิจัย

จากการศึกษาการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสได้จากแหล่งต่างๆ จากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์ให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์น้อยกว่าสาหร่ายทะเล และสาหร่ายสีแดงเป็นแหล่งให้โบรโมเปอร์ออกซิเดสในปริมาณสูงและเนื่องจากในอ่าวไทยมีสาหร่ายสีแดงหลายชนิดปริมาณมาก อีกทั้งสามารถเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีแดงได้ โบรโมเปอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่มีศักยภาพต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ทางการแพทย์ การวิจัยทางวิทยาศาสตร์ การรักษาสภาพแวดล้อม และในงานวิจัยขั้นพื้นฐาน ดังนั้นจึงควรพัฒนาการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดงโดยเฉพาะสาหร่ายสีแดงที่อ่าวไทยเพื่อเป็นการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและ การนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ในการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ *Polycavernosa* sp. ซึ่งพบได้ในอ่าวไทยตามบริเวณชายฝั่งของจังหวัดตราด ตัง พังงา และสงขลา มาเป็นแหล่งของโบรโมเปอร์ออกซิเดสเพื่อพัฒนากรรมวิธีในการสกัดเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในโอกาสต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีที่เหมาะสมต่อการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดงสายพันธุ์ *Polycavernosa* sp.
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติต่างๆของ โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้
3. เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาโบรโมเปอร์ออกซิเดส

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. เพื่อพัฒนาการผลิตโบรโมเปอร์ออกไซด์ที่มีความสะอาดรวดเร็วขึ้น ได้เอนไซม์ปริมาณมากและมีกิจกรรมของเอนไซม์เพียงพอต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับงานด้านต่างๆ การสกัดโบรโมเปอร์ออกไซด์ประกอบด้วยหลายขั้นตอน แต่ละขั้นตอนสามารถดำเนินการได้หลายวิธีแตกต่างกัน ซึ่งย่อมมีผลต่อปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ การทดลองจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อรวบรวมผลกระทบจากการสกัดในแต่ละขั้นตอน มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการสกัดโบรโมเปอร์ออกไซด์จากสาหร่ายทะเลสีแดง ในอนาคต
2. ศึกษาคุณสมบัติต่างๆของโบรโมเปอร์ออกไซด์ที่สกัดได้เช่น ขนาด ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานและความคงทน ผลของความเป็นกรดแก่ต่างต่อการทำงานและความคงทน และผลของไอออนโลหะต่อการทำงานของโบรโมเปอร์ออกไซด์
3. ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อเก็บรักษาในระดับอุณหภูมิต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

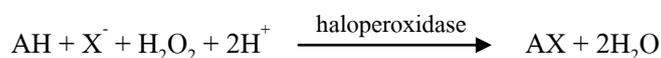
1. เพื่อพัฒนาระบบการสกัดโบรโมเปอร์ออกไซด์จากสาหร่ายทะเลสีแดง ซึ่งข้อมูลที่จะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตโบรโมเปอร์ออกไซด์จากสาหร่ายทะเล
2. เตรียมโบรโมเปอร์ออกไซด์เพื่อใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพและการใช้งานด้านอื่น ๆ

บทที่ 2

ทฤษฎี

2.1 โบรโมเปอร์ออกซิเดส (Bromoperoxidase)

โบรโมเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มฮาโลเปอร์ออกซิเดสชนิดหนึ่ง ซึ่งฮาโลเปอร์ออกซิเดสนั้นจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเปอร์ออกซิเดสชนิดหนึ่งที่สามารถเร่งปฏิกิริยา peroxidative halogenation ของสารประกอบอินทรีย์ เมื่อมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เฮไลด์ไอออน (Cl^- , Br^- และ I^-) และ halogen receptor ฮาโลเปอร์ออกซิเดสจึงจัดเป็น H_2O_2 -oxidoreductase group และได้ผลิตเป็น halogenated product (Itoh และคณะ, 1988) ดังแสดงในปฏิกิริยาต่อไปนี้



AH = สารประกอบอินทรีย์

X^- = Cl^- , Br^- และ I^-

AX = halogenated product

ฮาโลเปอร์ออกซิเดสแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความสามารถในการเติมเฮไลด์ไอออนเข้าสู่สารอินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.1 ชนิดของฮาโลเปอร์ออกซิเดส (Itoh และคณะ, 1988)

ชนิดของฮาโลเปอร์ออกซิเดส	เฮไลด์ไอออน
คลอโรเปอร์ออกซิเดส	Cl^- , Br^- , I^-
โบรโมเปอร์ออกซิเดส	Br^- , I^-
ไอโอดิเปอร์ออกซิเดส	I^-

คลอโรเปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ คลอไรด์ไอออน โบรไมด์ไอออน และไอโอดิได์ไอออนเข้าสู่สารประกอบอินทรีย์ คลอโรเปอร์ออกซิเดสสามารถสกัดได้จากจุลินทรีย์เช่น *Caldariomyces fumago* และ myeloperoxidase ซึ่งเป็นคลอโรเปอร์ออกซิเดสชนิดหนึ่งสกัดได้จาก human leukocytes (Morris และ Hager, 1986) ส่วนโบรโมเปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่โบรไมด์ไอออน และไอโอดิได์ไอออน ซึ่งสกัดได้จากไข่ของ sea urchin (Deits และคณะ,

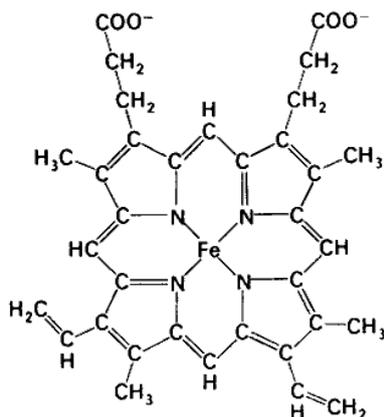
1984) นํ้านมในรูปของแลคโตเปอร์ออกซิเดส (Nichol และคณะ, 1987) สาหร่ายทะเล (Baden และ Manthey และ Hager, 1981; Itoh และคณะ, 1985) และจากจุลินทรีย์ เช่น *Streptomyces areofaciens*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Caldariomyces fumago* (Vanpee และ Lingen, 1985; Vanpee และ Lingen, 1987) และ Eosinophil peroxidase จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (Carlson และคณะ, 1985) และไอโอโดเปอร์ออกซิเดสซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ไอโอไดด์ไอออนเข้าสู่สารประกอบอินทรีย์ สกัดได้จากต่อมไทรอยด์ (Alexander, 1959) และรากของพืชในตระกูลมะรุม (horseradish) (Shannon และคณะ, 1966)

2.2 ชนิดของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

โบรโมเปอร์ออกซิเดสสามารถแบ่งตามลักษณะของ prosthetic group ออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

Heme-bromoperoxidase

Heme-bromoperoxidase มีโครงสร้างที่ประกอบด้วย prosthetic group และไกลโคโปรตีน heme-bromoperoxidase มีคุณสมบัติการดูดกลืนคลื่นแสงในช่วง 400-420 นาโนเมตร ปัจจุบันมีการศึกษาโครงสร้างของ heme ซึ่งเป็น prosthetic group อย่างแพร่หลาย โดยส่วนใหญ่แล้ว heme-bromoperoxidase มี prosthetic group เป็น ferriprotoporphyrin IX (รูปที่ 2.6) ยกเว้นโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากนํ้านม เช่น lactoperoxidase มี prosthetic group เป็น iron complex ของ 18-mercaptopmethyl-2, 7, 12, trimethyl-3, 8-divinylporphyrin-13, 17-diporponic acid โครงสร้างของ heme และไกลโคโปรตีน มีบทบาทต่อคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยา (catalytic properties) โดย heme prosthetic group จะแสดงบทบาท 2 อย่างในการทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา (catalytic function) คือ Fe (III) จะกระตุ้นการเกิดการแตกตัว (heterolytic cleavage) ของ H_2O_2 ทำให้เกิด one oxidizing equivalent และส่วนของ porphyrin จะช่วยควบคุมศักย์ไฟฟ้าในการเกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (oxidation-reduction potential) (Manthey และ Hager, 1989)

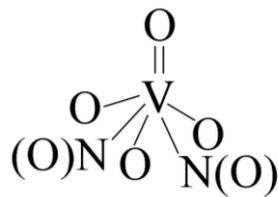


รูปที่ 2.1 Heme component ของ ferriprotophyrin IX

Non-heme bromoperoxidase ที่พบในยูคาริโอท

โดยปกติ non-heme bromoperoxidase ไม่แสดง absorption band ในช่วง 400-420 นาโนเมตร non-heme bromoperoxidase ที่พบครั้งแรกคือ lactoperoxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สกัดจากน้ำนม (Domontet และ Rousset, 1983) ซึ่งมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไอโอไดด์ในระดับต่ำ ต่อมา Vilter (1984) พบว่า non-heme bromoperoxidase ใน *Ascophyllum nodosum* เป็นโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ไม่ถูกยับยั้งโดยไซยาไนด์แต่ถูก inactivate เมื่ออยู่ในสารละลายวานาเดียม (V^{+5}) แต่เมื่อ incubate ในสารละลายของไอออนโลหะอื่น ๆ พบว่าไม่สามารถ activate โบรโมเปอร์ออกซิเดสได้ Deboer และคณะ (1986, 1988) รายงานผลการทดลองที่สอดคล้องกัน โดยตรวจสอบหาวานาเดียมในโบรโมเปอร์ออกซิเดส โดยวิธี atomic absorption spectrometry และ electron paramagnetic resonance

โครงสร้างของ complex ระหว่างกรดอะมิโนกับวานาเดียมยังไม่มีที่พิสูจน์แน่ชัด อย่างไรก็ตาม Deboer และคณะ (1988) เสนอว่าโบรโมเปอร์ออกซิเดสอาจประกอบด้วยวานาเดียมที่มี oxidation state เท่ากับ +5 และมี ligand ที่มี electronegative group เช่น ออกซิเจนหรือไนโตรเจนอยู่ล้อมรอบ (co-ordinate) วานาเดียมไอออน นอกจากนี้ข้อมูลจาก X-ray absorption spectroscopy พบว่ามีพันธะระหว่างวานาเดียมกับออกซิเจน 1 อะตอม โดยมีระยะระหว่างพันธะประมาณ 1.61 อังสตรอม และอีก 2 พันธะระหว่างวานาเดียมกับออกซิเจน หรือวานาเดียมกับไนโตรเจน ทำให้เกิดรูปร่างเป็น distorted octahedral ภายในโมเลกุลของโบรโมเปอร์ออกซิเดส แสดงดังรูป 2.7 ออกซิเจนที่มาสร้างพันธะอาจเป็นออกซิเจนที่อยู่ในกรดอะมิโน เช่น กรดแอสพาทิก หรือไซโรซีน และไนโตรเจนอาจมาจากฮิสติดีน (Albert และคณะ, 1989)



รูปที่ 2.2 พันธะระหว่างวานาเดียมกับออกซิเจน และวานาเดียมกับไนโตรเจน (หรือออกซิเจน)

Non-heme bromoperoxidase ที่พบในแบคทีเรีย

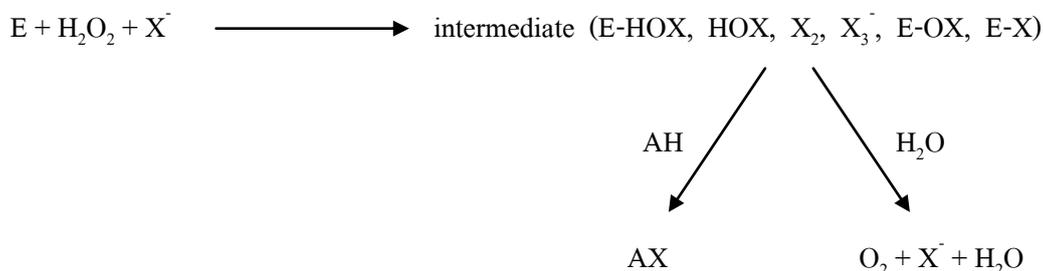
Non-heme bromoperoxidase ที่ได้จากแบคทีเรีย เช่น *Streptomyces griseus* (Zeiner และคณะ, 1988) และ *Streptomyces aureofaciens* (Krenn และคณะ, 1988) เป็นโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ไม่มี heme group หรือ วานาเดียมเป็นองค์ประกอบใน active site ของโมเลกุลของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามปัจจุบันตรวจพบสังกะสีและเหล็กเป็นส่วนประกอบแต่ไม่มีหลักฐานยืนยันว่าโลหะดังกล่าวมีผลต่อ catalytic activity หรือไม่ เนื่องจากสังกะสีและเหล็กเป็นโลหะ transition ที่พบทั่วไปในเซลล์ Krenn และคณะ (1988) เสนอว่าโลหะ 2 ชนิดดังกล่าวอาจทำหน้าที่ stabilize โมเลกุลของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

2.3 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

Everett และคณะ (1990) เสนอว่ากลไกการเร่งปฏิกิริยาของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจะเกี่ยวข้องกับ native enzyme และ intermediate from 2 ชนิด คือ เอนไซม์-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ เอนไซม์-เฮไลด์ โดยในขั้นตอนแรกจะเกิดการจับระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับเอนไซม์ในโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่มี heme Fe(III) ภายในโมเลกุลของ heme จะถูกออกซิไดส์เป็น ferryl state (IV) ทำให้ความสามารถในการเป็น oxidizing agent เพิ่มขึ้น และอยู่บน heme group หรืออยู่บน amino acid residue ในระหว่างนี้จะมีการทำลายพันธะระหว่างออกซิเจนกับออกซิเจนในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในกรณีของ vanadium-bromoperoxidase ที่มี V^{+5} อาจจับกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็น ligand ในลำดับต่อมาเฮไลด์ไอออนจะจับและถูกออกซิไดส์โดยตัว intermediate (เอนไซม์-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) (Lambeir และ Dunford, 1983)

Deboer และ Wever (1988) เสนอว่าสารอินทรีย์ตั้งต้น (AH) จะถูกเติมฮาโลเจนโดยอาศัย enzyme-HOX ที่เป็น intermediate และพบว่า HOX ในสารละลายจะอยู่ในลักษณะ equilibrium กับ

molecular halogen (X_2) และ trihalide ions (X_3^-) ในกรณีที่ไม่มีสารอินทรีย์ตั้งต้น complex ของ EOX สามารถที่จะเกิดปฏิกิริยากับน้ำเป็นออกซิเจน และพบว่า complex ระหว่าง enzyme halogenating intermediate (EX) ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาโบรมิเนชันที่เกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2.8



AH = สารประกอบอินทรีย์
 AX = halogenated product
 X = Br^- และ I^-
 E = โบรโมเปอร์ออกซิเดส

รูปที่ 2.3 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของโบรโมเปอร์ออกซิเดส (Ligtenbarg และคณะ, 2003)

2.4 หน้าทีของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในสิ่งมีชีวิต

เนื่องจากน้ำทะเลมีคลอรีด์ประมาณ 0.5 โมลาร์ และโบรมไนด์ประมาณ 10^{-5} โมลาร์ ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการเกิดปฏิกิริยา halometabolite และ halogenation ได้ จึงค้นพบปฏิกิริยา enzyme-catalyzed halogenation ที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตได้ทั้งทะเล ภายหลังจากการค้นพบโบรโมเปอร์ออกซิเดสชนิดต่าง ๆ จากสิ่งมีชีวิตในท้องทะเล ได้มีความพยายามในการศึกษาวิจัยเพื่อให้ทราบถึงหน้าที่ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส ซึ่งปัจจุบันพบหน้าที่ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในสิ่งมีชีวิตหลายประการ ได้แก่

1. เร่งการสร้างผลิตภัณฑ์ให้แก่เซลล์ (Neidleman และ Geigert, 1986) สาหร่ายทะเล *Odonthalia dentate* ผลิต brominated product ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ *Serratia marinolubra*, *Sarcina pelagia* โบรโมเปอร์ออกซิเดสจาก sea urchin สามารถเร่งปฏิกิริยา polymerization และเร่งการสร้าง bilyrosine ซึ่งเป็นสารที่ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในสัตว์ทะเล Burkholder และคณะ (1966) พบว่าแบคทีเรียในทะเล *Pseudomonas bromoutilis* ใช้โบรโมเปอร์ออกซิเดสในการผลิต brominated antibiotic หนอนทะเล *Balanoglossus biminiensis*

ผลิต 2,6-dibromophenol ปริมาณสูงซึ่งเป็นสารที่เป็นอันตรายต่อผู้ล่า (predators) Fenical (1974) รายงานว่าสาหร่ายทะเลสีแดง *Asparagoris taxiformis* ผลิต haloketones (1,1,3,3-tetrabromoacetone และ tribromo-3-butene-2-one) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ Fenical (1975) พบว่าสาหร่ายสีแดงหลายชนิดมี halometabolites เช่น brominated phenols, terpene ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายปรสิติต Sheikh และ Djerassi (1975) พบว่า bromophenol มีบทบาทในการป้องกัน marine tube worm ชนิด *Phoronopsis viridis* จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ McConnel และ Fenical (1980) พบว่าสาหร่ายสีแดง *Bonnemaisonia* sp. ผลิต brominated product (1,3-dibromo-2-heptanone) เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* Hager (1982) พบว่า *Asparagopsis taxiformis* ผลิตอนุพันธ์ของ halogenated methane (CHBr_3 เป็น major component) ซึ่งเป็นกลุ่มสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ใกล้เคียง (potent biocides) Fenical (1982) พบว่าสาหร่ายสีเขียว *Avrainvillea longicaulis* ผลิต brominated diphenylamine avrainvilleol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัว antifeedant

2. เร่งการสร้าง intermediate ให้แก่กระบวนการ metabolism และการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลของสารประกอบพวก non-halogenated product หรือ halogenated product ที่ซับซ้อนภายในเซลล์ เช่น ในกระบวนการ cyclization ของ isoprenoids เกิดเป็น terpenes และปฏิกิริยา re-arrangement ของ linear ketones (Fenical, 1982)

3. เร่งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน (Oxidative agents) ในกรณีที่มีโบรมเปอร์ออกซิเดส ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และไฮไลต์ไอออน หรือ thiocyanate ion กระบวนการ halogenation, thiocyanation หรือ oxidation สามารถเกิดขึ้นได้โดยโบรมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น lactoperoxidase ซึ่งมีบทบาทในการเกิดปฏิกิริยา oxidation ที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายได้ (Hara และ Sakurai, 1998) เนื่องจากโบรมเปอร์ออกซิเดสสามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิด hypobromous acid (HOBr) และ hypothiocyanous acid (HOSCN) ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Neidleman และ Geigert, 1986) Marshall และ Reiter (1980) พบว่าปฏิกิริยา glycolytic pathway และปฏิกิริยาจาก glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ในจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Streptococci* spp. เช่น *Streptococcus lactis* และ *Escherichia coli* จะถูกรบกวนโดย lactoperoxidase inhibition effect จาก lactoperoxidase เช่นเดียวกับ Mickelson (1979) พบว่า *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus cereus* และ *Streptococcus sanquis* ถูกยับยั้งการเจริญโดย lactoperoxidase inhibition effect จาก lactoperoxidase ได้เช่นเดียวกัน

2.5 แหล่งของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

โบรโมเปอร์ออกซิเดสถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1978 ในสาหร่ายสีแดงชนิด *Bonnemaisonia hamifera* (Theiler และคณะ, 1978) หลังจากนั้นจึงมีการค้นพบแหล่งของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. จุลินทรีย์ สามารถสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Streptomyces phaeochromogenes* (Van Pée และ Lingen, 1985), *Pseudomonas aureofaciens* และ *Pseudomonas pyrrocinia* (Vanpee และ Lingen, 1987) ในกรณีของจุลินทรีย์จะผลิต halogenated product เพื่อเป็นส่วนประกอบในการผลิต antibiotic substance อย่างไรก็ตามการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากแบคทีเรียมักได้ปริมาณน้อย

2. สัตว์ทะเล เนื่องจากสามารถตรวจพบ halogenated product ในสิ่งมีชีวิตจากท้องทะเลเสมอ จึงสามารถแยกโบรโมเปอร์ออกซิเดสได้จากสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น หอยทะเล (marine snail) (Jannum และ Coe, 1987), *Murex trunculus* และ marine worm (Deits และคณะ, 1984)

3. ไลเคนบางชนิด เช่น *Xanthoria parietina* (Plat และคณะ, 1987)

4. สาหร่ายทะเล จากสาหร่ายสีเขียว (marine green algae) เช่น *Penicillus capitatus*, *Penicillus lamourouxii* และ *Rhipocephalus phoenix* (Baden และ Corbett, 1980) จากสาหร่ายสีแดง (marine red algae) เช่น *Rhodomela larix* (Ahern และคณะ, 1980) และ *Corallina pilulifera* (Itoh และคณะ, 1986) จากสาหร่ายสีน้ำตาล (marine brown algae) เช่น *Ascophyllum nodosum* (Vilter, 1984) และ *Laminaria saccharina* (Deboer และคณะ, 1986)

ดังนั้นจึงสามารถพบโบรโมเปอร์ออกซิเดสได้ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกกลุ่มทั้งในสัตว์ทะเล จุลินทรีย์ ไลเคน และสาหร่าย แสดงดังในตารางที่ 2.5 อย่างไรก็ตามโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลมีปริมาณมากกว่าแหล่งอื่น ในปี ค.ศ. 1980 Hewson ได้สำรวจสาหร่ายทะเล 72 ชนิด ในทะเลแคริบเบียนและชายฝั่งอเมริกากลาง พบโบรโมเปอร์ออกซิเดสในสาหร่ายทะเลถึง 55 ชนิด

ตารางที่ 2.2 แหล่งของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส (Dembitsky, 2003)

แหล่งของเอนไซม์	สายพันธุ์	เอกสารอ้างอิง
สาหร่ายสีเขียว (Chlorophyta)	<i>Bryopsis pennata</i>	Hewson (1980)
	<i>Caldophoropsis membranacea</i>	Hewson (1980)
	<i>Chaetomorpha linum</i>	Hewson (1980)
	<i>Cictyosphaeria cavernosa</i>	Hewson (1980)
	<i>Codium repens</i>	Hewson (1980)
	<i>Halimeda</i> sp.	Soedjak (1994)
	<i>Penicillus capitatus</i>	Baden และ Corbett (1979) Manthey และคณะ (1984) Beissner และคณะ (1981)
	<i>Penicillus lamourouxii</i>	Baden และ Corbett (1980)
	<i>Rhipocephalus phoenix</i>	Baden และ Corbett (1980)
	<i>Ulvella lens</i>	Ohshiro และคณะ (1999)
สาหร่ายสีแดง (Rhodophyta)	<i>Aphiora hancockii</i>	Hewson (1980)
	<i>Asparagopsis toxiformis</i>	Hewson (1980)
	<i>Bonnemaisonia hamifera</i>	Hewson (1980)
	<i>Ceramium rubrum</i>	Krenn และคณะ (1987)
	<i>Chondria atropurpurea</i>	Hewson (1980)
	<i>Corallina pilulifera</i>	Itoh และคณะ (1986) Shimonishi และคณะ (1998) Krenn และคณะ (1989) Yu และ Whittaker (1989)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

แหล่งของเอ็นไซม์	สายพันธุ์	เอกสารอ้างอิง
	<i>Corallina officinalis</i>	Sheffield และคณะ (1992) Isupov และคณะ (2000) Littlechild และ Garcia-Rodriguez (2003) Carter และคณะ (2002)
	<i>Corallina vancouveriensis</i>	Everett และคณะ (1990)
	<i>Cystoclonium purpureum</i>	Pederson (1973)
	<i>Dasya species</i>	Hewson (1980)
	<i>Galaxaura comanas</i>	Hewson (1980)
	<i>Gracillaria species</i>	Hewson (1980)
	<i>Haloplegma duperreyi</i>	Hewson (1980)
	<i>Laurencia chondroides</i>	Hewson (1980)
	<i>Laurencia lata</i>	Hewson (1980)
	<i>Liagora species</i>	Hewson (1980)
	<i>Ochtodes secundiramea</i>	Rorrer และคณะ (2001)
	<i>Rhodomela larix</i>	Ahern และคณะ (1980)
สาหร่ายสีน้ำตาล (Phaeophyta)	<i>Alaria esculenta</i>	Wever และ Tromp (1991)
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Weyand และคณะ (1999)
	<i>Chorda filum</i>	De Boer และคณะ (1986)
	<i>Dictyota divaricata</i>	Hewson (1980)
	<i>Ecklonia stolonifera</i>	Hara และ Sakurai (1998)
	<i>Fucus distichus</i>	Soedjak และ Butler (1991)
	<i>Labophora saccharina</i>	Hewson (1980)
	<i>Laminaria digitata</i>	Jordan และ Vilter (1991)
	<i>Laminaria hyperborean</i>	Almeida และคณะ (2001)
	<i>Laminaria ochroleuca</i>	Almeida และคณะ (2001)
	<i>Laminaria saccharina</i>	Jordan และ Vilter (1991) Almeida และคณะ (2001)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

แหล่งของเอนไซม์	สายพันธุ์	เอกสารอ้างอิง
	<i>Macrocyctis pyrifera</i>	Soedjak และ Butler (1991)
	<i>Pelvetia canaliculata</i>	Hewson (1980)
สัตว์ทะเล	<i>Notomatus lobatus</i>	Chen และคณะ (1991)
	<i>Thelepus setosus</i>	Ahern และคณะ (1980)
	<i>Ptychodera flava laysanica</i>	Ahern และคณะ (1980)
ไลเคน	<i>Xanthoria parietina</i>	Plat และคณะ (1987)
จุลินทรีย์	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Van Pee และคณะ (1987)
	<i>Streptomyces griseus</i>	Zeiner และคณะ (1988)
	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	Van Pée และ Lingen (1985)
	<i>Shigella flexneri</i>	Tanaka และคณะ (2002)
	<i>Salmonella enterica ser. typhimurium</i>	Tanaka และคณะ (2002)
	<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Van Pée และ Lingen (1985)
	<i>Pseudomonas putida IF-3</i>	Kawanami และคณะ (2002)
	<i>Pseudomonas pyrocinia</i>	Van Pee และ Lingen (1987)

ในประเทศไทยมีการสำรวจโบรโมเปอร์ออกซิเดสในสาหร่ายทะเลในชายฝั่งทะเลของจังหวัดตราด ตริง สงขลา และพังงา พบว่าสามารถสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสได้จากสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) เช่น สาหร่ายเขากวางและสาหร่ายผมนาง (Veokeki, 1988)

2.6 คุณลักษณะของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล

Itoh และคณะ (1985) ได้แบ่งโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พวกที่มี heme เป็น prosthetic group (heme type) และพวกที่ไม่มี heme เป็น prosthetic group (non-heme type) โดยโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากสาหร่ายทะเล มักเป็นเอนไซม์ที่มี heme เป็น prosthetic group (Manthey และ Hager, 1981; Itoh และคณะ, 1985) และพบโบรโม

เปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากสาหร่ายทะเลหลายชนิดเป็นพวกที่ไม่มี heme เป็น prosthetic group เช่น โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจาก *Corallina pilulifera* มี Fe^{3+} เป็น prosthetic group มีมวลโมเลกุลประมาณ 790,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 64,000 ดาลตัน กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6.0 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในเวลา 30 นาที (Itoh และคณะ, 1985), *Ascophyllum nodosum* มี vanadium (V^{+5}) เป็น prosthetic group มวลโมเลกุลประมาณ 90,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 40,000 ดาลตัน กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 5.5 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในเวลา 1 ชั่วโมง (Deboer และคณะ, 1986), *Laminaria digitata* มี vanadium (V^{+5}) เป็น prosthetic group มีมวลโมเลกุลประมาณ 260,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 60,000 ดาลตัน กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6.5 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในเวลา 30 นาที (Jordan และ Vilter, 1991) และ *Ceramium rubrum* มี vanadium (V^{+5}) เป็น prosthetic group มีมวลโมเลกุลประมาณ 240,000 ดาลตัน ประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 50,000 ดาลตัน กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 7.5 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในเวลา 1 ชั่วโมง (Klenn และคณะ, 1987)

2.7 ปฏิกริยาของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

สารอินทรีย์หลายชนิดเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา peroxidative bromination เช่น monochlorodimedone, 3-ketooctanoic acid (Manthey และ Hager, 1989), cyclic \square -diketone, phenol และ *o*-hydroxybenzyl alcohol (Yamada และคณะ, 1985; Klenn และคณะ, 1988), nitrogen containing heterocycles, barbituric derivatives (Itoh และคณะ, 1987), phenol red (Deboer และคณะ, 1987) และ anisole (Deboer และคณะ, 1987; Itoh และคณะ, 1988) เป็นต้น

2.8 ประโยชน์ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

จากคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา halogenation และ peroxidation ทำให้สามารถนำโบรโมเปอร์ออกซิเดสมาใช้ประโยชน์ได้หลายประการดังต่อไปนี้

1. ใช้เป็นตัวเร่งในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์เคมี

ใช้เป็นตัวเร่งในการสังเคราะห์ halogenated chemical ซึ่งเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในการผลิต เช่น การผลิต propylene oxide จาก propylene โดยใช้โบรโมเปอร์ออกซิเดสช่วยเร่งการเปลี่ยน propylene เป็น intermediate propylene halohydrin แล้วใช้ halohydrin epoxidase ช่วยเร่ง

การเปลี่ยน intermediate เป็น propylene oxide หรือใช้เป็นตัวเร่งในการสังเคราะห์ halogenated chemical ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการโดยตรง เช่น การผลิตยาฆ่าแมลง dibromochloropropane (Neidleman, 1980)

2. ใช้ประโยชน์ทาง immuno assay

Fonong และ Rechitz (1984) ใช้โบรมเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งการเติม bromine (Br^{77}) เข้าสู่โมเลกุลของ potentiometric enzyme แล้วนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี enzyme immuno assay เพื่อตรวจหา human IgG

Manthey และคณะ (1984) ใช้โบรมเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งการเติมอะตอมสารกำมันตรังสีของไอโอดีน (I^{125}) และโบรมด์ (Br^{77}) เข้าสู่โมเลกุลโปรตีน โดยปฏิกิริยาดังกล่าวเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่รุนแรง (mild condition) จึงไม่ทำลายโมเลกุลของโปรตีน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเสถียรและให้ specific radioactivity ที่สูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์โดยวิธี Enzyme immuno assay และสามารถประยุกต์ใช้ในการติดตามปฏิกิริยาทางชีวเคมีได้

3. ใช้ในการควบคุมมลพิษ

โบรมเปอร์ออกซิเดสช่วยในการกำจัดสารประกอบฟีนอลจากน้ำเสียที่เกิดจากโรงงานที่ประกอบการผลิตไหม้ถ่านหิน (Klifbanov และคณะ, 1983) และสามารถใช้โบรมเปอร์ออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาระหว่าง halide ion และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดเป็น hypohalous acid ที่ช่วยในการกำจัดเมือกในท่อน้ำทิ้งขอบโรงงานอุตสาหกรรม และช่วยในการกำจัด carcinogenic aromatic amine จากท่อน้ำทิ้ง (Klifbanov และ Morris, 1981) และสามารถใช้โบรมเปอร์ออกซิเดสช่วยในการกำจัด low molecular weight color bodies ในระบบน้ำเสียที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรมการฟอกสี (Paice และ Jurasek, 1984)

4. ใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม

สามารถใช้โบรมเปอร์ออกซิเดสร่วมกับไอโอดีนไอออน เพื่อช่วยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของยาอันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้โบรมเปอร์ออกซิเดส (ทำหน้าที่ของเปอร์ออกซิเดส) โดยการผสมลงในยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก และหมากฝรั่ง เพื่อช่วยกำจัดแบคทีเรียในช่องปาก (Neidleman และ Geigert, 1986)

5. ใช้ประโยชน์ทางการแพทย์

บุญเกียรติ แซ่ตั้ง (2535) ทดลองผลิตชุดตรวจสอบสำเร็จรูปเพื่อใช้ตรวจหาจุลินทรีย์ โดยการตรึงโบรโมเพอร์ออกซิเดส กลูโคออกซิเดส และสับสเตรทลงในวุ้น (agarose agar) พบว่าสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำหล่อเลี้ยงไขสันหลัง (cerebrospinal fluid) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

6. ใช้ประโยชน์ทางเคมีวิเคราะห์

Mottola และคณะ (1970) ใช้คุณสมบัติในการเป็นเปอร์ออกซิเดสของโบรโมเพอร์ออกซิเดสในการตรวจหาปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาณโบรโมไคโอออน และไอโอไดน์ไอออน โดยตรวจวัดการเกิดออกซิเดชันของไอออนทั้งสองเมื่อมีโบรโมเพอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

2.9 สาหร่ายทะเล (Seaweeds)

สาหร่ายทะเลแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ตามโครงสร้างและสีของสารสังเคราะห์แสง ได้เป็น 4 กลุ่มคือ

1. สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae)
2. สาหร่ายสีเขียว (green algae)
3. สาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae)
4. สาหร่ายสีแดง (red algae)

1 สาหร่ายทะเลที่พบในประเทศไทย

ในประเทศไทยมีสายพันธุ์ของสาหร่ายทะเลอยู่หลากหลายชนิด เนื่องจากมีพื้นที่ที่ติดกับทะเลซึ่งตัวอย่างของสายพันธุ์สาหร่ายทะเลที่สามารถพบได้ในประเทศไทยแสดงดังในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างสายพันธุ์และคุณลักษณะของสาหร่ายทะเลที่พบในประเทศไทย

สายพันธุ์ของสาหร่าย	คุณลักษณะ
สาหร่ายหนาม (Acanthophora) 	วงศ์ : RHODOMELACEAE ลักษณะ : อวบน้ำ เปรอะหักง่ายมีแขนงสั้น ๆ เกิดอยู่ทั่วไป ปลายแขนงเป็นแฉกรูปดาว บริเวณที่พบ : ขึ้นบนก้อนหินหรือซากปะการัง ที่พื้นทรายปนโคลนในระดับน้ำขึ้นน้ำลง จนถึงน้ำลงต่ำสุด
สาหร่ายวุ้น (Gracilaria) 	วงศ์ : GRACILARIACEAE ลักษณะ : เป็นพุ่มอ่อนนุ่มเหมือนเส้นผม หรือเป็นพุ่มแข็งลักษณะเป็นข้อเรียงต่อกัน บริเวณที่พบ : ขึ้นได้ทั่วไป ทั้งบนก้อนกรวด เปลือกหอย และกระชังเลี้ยงปลา

2 สาหร่ายทะเลสีแดง *Gracilaria* spp.

สาหร่ายสกุล *Gracilaria* เป็นสาหร่ายทะเลสีแดง มีลักษณะเป็นเส้นกลม อวบน้ำแตกแขนงได้มากจนเป็นพุ่ม มีชื่อเรียกแตกต่างกันตามท้องถิ่นและลักษณะของสาหร่าย เช่น บางชนิดเป็นข้อสั้น ๆ เรียกว่า สาหร่ายข้อ ที่แตกแขนงคล้ายเขากวาง เรียก สาหร่ายเขากวาง (กาญจนภานันท์ ลิ้มโนมนต์, 2527; วิวรรณ สิงห์ทวีศักดิ์, 2537) นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกอีกหลายชื่อ ได้แก่ สาหร่ายฝอย สายสายจิ้ม สายหางม้า สายพมนาง และสายไหม ชื่อสาหร่ายวุ้นเป็นชื่อสามัญที่ใช้เรียกสาหร่ายชนิดนี้ เนื่องจากนำมาสกัดวุ้น (Agar) ซึ่งเป็นสารไฟโคคอลลอยด์ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ หลายประเภท อาทิเช่น อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง สิ่งทอ ยา รักษาโรค สี ภาพถ่าย และการทำไม้อัด รวมทั้งในวงการแพทย์และการเกษตรที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และเนื้อเยื่อ เป็นต้น ในประเทศไทยมีสาหร่ายสกุลนี้ด้วยกัน 15 ชนิด ในบริเวณชายฝั่งอ่าวไทยตะวันออก รวมทั้งฝั่งทะเลอันดามัน (วิวรรณ สิงห์ทวีศักดิ์ และทรงสิทธิ์ ลิ้มสกุล, 2543) วงจรชีวิตของสาหร่ายพมนางสกุล *Gracilaria* มี 3 ระยะ คือ ระยะแกมีโตไฟที่มีเพศแยกอยู่ต่างกัน มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียมาผสมกันบน

ต้นแกมีโตไฟท์เพศเมีย ได้ไซโกตและพัฒนาอยู่ใต้เพอริคาร์ป (pericarb) มีลักษณะเป็นปุ่มอยู่บนต้นแกมีโตไฟท์เพศเมีย ปุ่มที่นูนขึ้นมาเรียกว่า ซิสโต-คาร์ป (cystocarb) ระยะนี้เรียกว่า ระยะคาร์โปสปอโรไฟท์ ระยะนี้จะสร้างคาร์โปสปอร์ภายในซิสโต-คาร์ป ซึ่งคาร์โปสปอร์นี้จะงอกเป็นต้นสาหร่ายที่แตกเตตราสปอร์ (tetraspore) ระยะนี้จึงเรียก ระยะเตตราสปอโรไฟท์ และเตตราสปอร์นี้จะงอกเป็นต้นสาหร่ายระยะแกมีโตไฟท์ เป็นการเจริญครบวงจรชีวิต (วิวรรธน์ สิงห์ทวีศักดิ์, 2539)

ลำดับทางอนุกรมวิธานของ *Gracilaria* spp. ได้แก่

Division	<i>Rhodophyta</i>
Class	<i>Rhodophyceae</i>
Subclass	<i>Florideophycidae</i>
Order	<i>Gigartinales</i>
Family	<i>Gracilariaceae</i>
Genus	<i>Gracilaria</i>

สาหร่ายสกุล *Gracilaria* ชนิดต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทยมีดังนี้ (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2547)

1. *Gracilaria bangmeiana* พบที่จังหวัดระยองและตรัง
2. *Gracilaria changii* พบมากที่จังหวัดตราดและบางพื้นที่ของจังหวัดระยองและจันทบุรี ส่วนที่จังหวัดสงขลา สตูล ตรัง กระบี่ และพังงา พบขึ้นบนกระชังเลี้ยงปลาและเนื่องจากสาหร่ายชนิดนี้มีลักษณะ คล้ายเขากวาง จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า สาหร่ายเขากวาง
3. *Gracilaria edulis* พบที่จังหวัดตราด ประจวบคีรีขันธ์ สุราษฎร์ธานี สตูล ตรัง ภูเก็ต และ ระนอง
4. *Gracilaria eucheumoides* พบที่จังหวัดภูเก็ต
5. *Gracilaria firma* พบที่จังหวัดตราด
6. *Gracilaria fisheri* พบมากที่ทะเลสาบสงขลาบริเวณเกาะยอ ฟังแก และหัวเขาแดง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา มักพบขึ้นบนเปลือกหอยขึ้นหรือบนกระชังเลี้ยงปลา
7. *Gracilaria irregularis* พบเฉพาะที่จังหวัดตราด ขึ้นบนก้อนกรวดหรือเปลือกหอยบริเวณชายทะเล เขตน้ำขึ้นน้ำลง
8. *Gracilaria lemaneiformis* พบขึ้นบนกระชังเลี้ยงปลาที่จังหวัดตรัง
9. *Gracilaria minuta* พบขึ้นบนก้อนกรวดบริเวณหาดน้ำตื้น ๆ ที่จังหวัดตราด
10. *Gracilaria percurrans* พบที่จังหวัดสงขลา ระยอง และตราด

11. *Gracilaria salicomia* พบเกือบทุกจังหวัดบริเวณชายทะเลและมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า สาหร่ายข้าว

12. *Gracilaria tenuistipitata* พบมากที่อ่าวปัตตานีและที่ทะเลสาบสงขลา จังหวัดสงขลา ชุมพร และกระบี่ สาหร่ายรุ่นชนิดนี้มีชื่อพื้นเมืองว่า สาหร่ายผมนางและแซแซ

13. *Gracilaria textotii* พบที่จังหวัดตรัง

2.10 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

โดยทั่วไปการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์มีขั้นตอนดังนี้ (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2530)

2.11.1 การสกัดเอนไซม์ เนื่องจากแหล่งของโบริโมเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ศึกษา ได้แก่สาหร่ายทะเลประเภท macro algae และเอนไซม์ที่ต้องการอยู่ในเซลล์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำให้เซลล์แตก (cell breaking) โดยอาจใช้วิธีการทางกายภาพ เช่น การบด (grinding) การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultra sonication) freeze and thaw หรือใช้วิธีทางเคมีที่ทำให้เซลล์ปล่อยเอนไซม์ออกมาในสถานะที่ไม่รุนแรงเท่ากับเทคนิคทางกายภาพ เช่น การใช้ดีเทอร์เจน ทำลายเยื่อเซลล์และเมมเบรน การใช้ lytic enzyme หรือค่างทำลายผนังเซลล์

2.11.2 การแยกเอนไซม์ หลังจากทำให้เซลล์แตก เศษเซลล์ สารชีวโมเลกุล ขนาดใหญ่และขนาดเล็ก สารอาหาร จะปนอยู่กับสารที่ใช้ในการสกัด การแยกเอนไซม์ออกจากของผสมเหล่านี้ จะเริ่มจากการแยกของผสมที่เป็นของแข็งออกมาก่อนซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น การปั่นด้วยแรงเหวี่ยง (centrifuge) การกรอง (filtration) หรือการเติมสารเคมีพวก flocculant ลงไป เพื่อให้ particle ยึดติดกัน และจับตัวตกตะกอนลงมา

2.11.3 การทำให้เอนไซม์เข้มข้น ทำได้หลายวิธีได้แก่

ก. การตกตะกอน สารที่ใช้ในการตกตะกอนมีหลายชนิด เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต เอธานอล อะซิโตน และโพลีเอทิลีนไกลคอล เป็นต้น

ข. วิธี ultrafiltration มีหลักการคือ สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ารูพรุนของเมมเบรนจะถูกแรงดันให้เคลื่อนผ่านเมมเบรน ส่วนสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะถูกกักไว้และเข้มข้นขึ้นเมมเบรนมีหลายชนิด แต่ละชนิดจะมีขนาดรูต่าง ๆ จึงสามารถเลือกใช้ได้ตามขนาดโมเลกุลที่ต้องการ

ค. วิธีทำให้แห้งด้วยความเย็น (freeze drying) เป็นการระเหยของน้ำแข็งที่อุณหภูมิต่ำ นิยมใช้ในการเตรียมเอนไซม์ในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ไม่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพราะต้องลงทุนสูง

2.11.4 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ทำได้หลายวิธี แต่ที่นิยมที่สุดในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่ วิธี column chromatography ซึ่งมีอยู่หลายประการ ได้แก่

ก. Ion-exchange chromatography มีหลักการคือ แยกเอนไซม์ออกจากสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ โดยอาศัยความแตกต่างของประจุ โดยเลือกชนิดของ ion-exchanger ที่มีประจุเหมาะสมกับเอนไซม์ที่ต้องการ ซึ่งจะดูดซับเอนไซม์นั้นไว้ด้วยพันธะไอออนิก และสามารถชะออกได้โดยการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลาย หรือเพิ่มความเข้มข้นของตัวชะ

ข. Gel filtration chromatography มีหลักการคือ แยกเอนไซม์ออกจากสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล เนื่องจากความสามารถในการเคลื่อนผ่านเจลของชีวโมเลกุลขนาดต่าง ๆ มีอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกเอนไซม์ออกจากชีวโมเลกุลอื่น ๆ ได้

ค. Hydrophobic chromatography มีหลักการคือ แยกเอนไซม์ออกจากสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ โดยอาศัยความแตกต่างทาง hydrophobicity ของชีวโมเลกุลแต่ละชนิดที่มีค่าไม่เท่ากันทำให้สามารถแยกเอนไซม์ออกจากชีวโมเลกุลอื่น ๆ ได้

เทคนิคที่ใช้ในขั้นตอนสุดท้าย ของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ได้แก่ การตรวจเช็คความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยอาศัยสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นขั้นตอนที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์ และการเตรียมเอนไซม์ในระดับมิลลิกรัมหรือกรัมเช่นวิธี isoelectric focusing ซึ่งแยกเอนไซม์โดยอาศัยความแตกต่างของค่า pI ของโมเลกุลแต่ละชนิด วิธี electrophoresis แยกเอนไซม์โดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของสารที่มีขนาดต่างกันในสนามไฟฟ้า

เทคนิคในการแยกและเตรียมเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นมักถูกเลือกใช้ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ เช่น ต้องการได้เอนไซม์ในปริมาณมากหรือต้องการเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มาก อีกทั้งขึ้นอยู่กับเครื่องมือ, ความชำนาญ และเวลาที่ใช้ของแต่ละเทคนิค

การเตรียมเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมมักต้องการเอนไซม์ปริมาณมาก แต่ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ไม่สำคัญนัก ขณะที่งานวิเคราะห์วิจัยต้องการความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เป็นพิเศษ ในการติดตามความสำเร็จของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์มีหลายวิธี เช่น การใช้ electrophoresis หรือการคำนวณค่า specific activity เพื่อตรวจสอบว่าการเตรียมเอนไซม์สามารถกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ออกไปได้มากน้อยเพียงใด ในการแสดงผลการสกัดเอนไซม์ นิยมเปรียบเทียบค่า specific activity ในแต่ละขั้นตอนในรูปของค่า purification fold ซึ่งจะบ่งชี้ว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์กว่า crude enzyme กี่เท่า และนิยมบอกถึงปริมาณเอนไซม์ที่เหลืออยู่ในแต่ละขั้นตอนในรูปของ total activity ซึ่งจะแสดงผลเป็น % yield

Triton X-100 และ sodium deoxycholate (Cartor, 1982)

Triton X-100 เป็นดีเทอร์เจนที่มีคุณสมบัติของโมเลกุลส่วนหัวเป็น non-ionic และส่วนหางเป็น *p-tertiary-Octylphenyl* ในกรณีของ sodium deoxycholate เป็นดีเทอร์เจนที่มีคุณสมบัติของโมเลกุลส่วนหัวเป็น an-ionic และส่วนหางเป็น steroid skeleton Triton X-100

และ sodium deoxycholate นิยมใช้ในการสกัด membrane-bound enzymes ออกจากเซลล์เมมเบรน หลักการทำงานของดีเทอร์เจนต์คือ การละลายเมมเบรน (dissolving membrane) และดึงเอนไซม์ออกจากเมมเบรน เนื่องจากการจับตัวระหว่างเอนไซม์กับดีเทอร์เจนต์โดย hydrophobic interaction ระหว่าง tail group ของดีเทอร์เจนต์กับบริเวณ hydrophobic surface ของเอนไซม์ จึงช่วยสกัดเอนไซม์ออกจากเมมเบรนได้ปริมาณมากขึ้น

2.11 ผลของไอออนโลหะต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์ (Palmer, 1995)

ปัจจุบันมีการค้นพบเอนไซม์เป็นจำนวนมากที่มีไอออนโลหะเป็นส่วนประกอบในโมเลกุลโดยมีคุณสมบัติเป็นคาตาลิสต์ของเอนไซม์ อะตอมของโลหะที่อยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์มักอยู่ในสถานะที่เป็นไอออนบวก (cation) ที่สามารถปรับระดับความสามารถในการเป็นตัวออกซิไดส์ (oxidation state) ได้มากกว่า 1 ระดับ เช่น ไอออนเหล็กในรูปของเฟอร์รัส (Fe^{+2}) และเฟอริก (Fe^{+3}) โดยปกติโมเลกุลของเอนไซม์จะเกิดแรง electrostatic interaction ระหว่างหมู่ประจุบวกของโลหะและ negative charge group ในโมเลกุลของเอนไซม์ ซึ่งมักมีผลต่อ catalytic site และกลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไอออนโลหะมีผลต่อคุณสมบัติการเป็นคาตาลิสต์ของเอนไซม์ เช่น การเป็น electrophile ของไอออนโลหะ เพื่อช่วยยับยั้งปฏิกิริยา (side reaction) ที่ไม่ต้องการ ไอออนโลหะอาจมีส่วนร่วมในการเกิด enzyme-substrate complex และอาจมีส่วนช่วยเพิ่มความคงตัวของการเกิด catalytical active conformation ภายในโมเลกุลเอนไซม์

เอนไซม์ที่มีไอออนโลหะเป็นส่วนประกอบอาจแบ่งเป็น 2 ชนิดตามความแข็งแรงของพันธะระหว่างไอออนโลหะ และ negative charge group ในโมเลกุลของเอนไซม์ ได้แก่ metalloenzyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีไอออนโลหะจับตัวกับอะตอมอื่น ๆ ภายในโมเลกุลเอนไซม์อย่างแน่นหนา ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคต่าง ๆ ไม่ส่งผลให้ไอออนโลหะหลุดออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ และ metal-activated enzyme เป็นเอนไซม์ที่ไอออนโลหะจับตัวกับอะตอมอื่น ๆ ภายในโมเลกุลเอนไซม์ด้วยพันธะที่มีความแข็งแรงน้อยกว่า ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์อาจทำให้ไอออนโลหะหลุดออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ได้ โดยทั่วไปจึงสามารถ re-activation เอนไซม์ที่สกัดได้ โดยการเติมไอออนโลหะกลับคืนสู่โมเลกุลของเอนไซม์

2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากข้อมูลข้างต้นแหล่งของโบรโมเปอร้ออกซิเดส ได้แก่ สัตว์ทะเล, จุลินทรีย์, สาหร่ายทะเล และไลเคน ปัจจุบันมีผู้ทดลองสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากแหล่งต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

Weng และคณะ (1991) สกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากแบคทีเรีย *Streptomyces aireofaciens* เริ่มจากการทำให้เซลล์แตกโดยการใส่ sonicator ทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นใช้ DEAE-Sephacel ทำให้แยกโบรโมเปอร้ออกซิเดสได้ 2 ชนิดคือ BPO1 และ BPO2 เมื่อนำ active fraction ของ BPO1 มาผ่าน heat treatment เพื่อตกตะกอนโปรตีนอื่น ๆ ออก แล้วใช้ Sephacryl S-300, Phenyl superpose และ chelating sepharose chromatography BPO1 ที่ได้มี specific activity 4.52 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และได้ yield 56.70% BPO2 เมื่อนำมาผ่าน heat treatment เพื่อตกตะกอนโปรตีนอื่น ๆ ออก จากนั้นใช้ phenyl superpose และ immuno affinity chromatography พบว่า BPO2 ที่ได้มี specific activity 1.54 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และได้ yield 16.95%

Vanpeel และคณะ (1987) สกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากแบคทีเรีย *Streptomyces aireofaciens* เริ่มจากการทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonicator และทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 30-80% saturation จากนั้นใช้ DE-52 (ion-exchange chromatography) และ Sephadex G-200 ได้โบรโมเปอร้ออกซิเดสที่มีค่า specific activity 2.07 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และได้ yield 37%

Baden และ Corbett (1979) สกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากสาหร่ายสีเขียว *Penicillium lamourouxii*, *Penicillium capitatus* และ *Ripoccephalus phoenix* ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย TEAE-cellulose พบว่าโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่สกัดได้มีค่า specific activity 5.20, 3.11 และ 2.91 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และได้ yield เท่ากับ 43.00, 15.50, 24.00% ตามลำดับ (ใช้ monochlorodimedone เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส)

Sheffield และคณะ (1992) สกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดง *Coralliza officinallis* ทำให้เข้มข้นโดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 30-60% saturation ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย DEAE-Sephadex A-25 ที่ชะด้วย 20 มิลลิโมลาร์ $\text{Tris-H}_2\text{SO}_4$ ที่ pH 8.3 และ Biogel A-5 M ที่ชะด้วย 50 มิลลิโมลาร์ $\text{Tris-H}_2\text{SO}_4$ pH 8.3 และใช้เทคนิค fast protein liquid chromatography (FPLC) โบรโมเปอร้ออกซิเดสที่ได้สามารถเร่งการ brominates โมเลกุลของ monochlorodimedone ได้ 4.70 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และได้ yield 22.00%

Shang และคณะ (1994) สกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดง *Corallina vancouveriensis* โดยการ homogenate สาหร่ายพร้อมทั้งน้ำแข็งแห้งและอะซีโตน จากนั้นกรองเอาสารละลายออก (homogenate 6 รอบ) นำสารละลายมาระเหยอะซีโตนเพื่อแปรสภาพให้เป็น *Corallina vancouveriensis* acetone powder เมื่อเก็บที่ -4 องศาเซลเซียส พบว่า *Corallina vancouveriensis* acetone powder ยังคงมี activity อยู่ได้ภายในเวลา 1 ปี

Yu และ Whittaker (1989) สกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดง *Corallina officinallis* แล้วตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80% saturation ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE-cellulose แล้วนำมาผ่าน phenyl sepharose column เมื่อผ่านขั้นตอนการสกัดทั้งหมดจะได้โบรโมเปอร้ออกซิเดสที่มี specific activity เท่ากับ 3.52 ยูนิต/มิลลิกรัม โดยใช้ monochlorodimedone เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส

Almeida และคณะ (1998) สกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Saccorhiza polyschides* จากชายฝั่งทะเลของโปรตุเกส หลังจากทำให้เซลล์แตก ทำการ extract โดยวิธี two-phase aqueous ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยผ่าน hydrophobic interaction chromatography และตรวจเช็คความบริสุทธิ์ด้วย chromatofocusing พบว่าโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่สกัดได้มีค่า specific activity 2.55 ยูนิต/มิลลิกรัม เมื่อศึกษาคุณสมบัติของโบรโมเปอร้ออกซิเดส พบว่ามีมวลโมเลกุล 125,000 ดาลตัน โมเลกุลประกอบด้วย 2 หน่วยย่อยที่มีขนาด 64,000 ดาลตัน เมื่อศึกษาผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส พบว่าวานาเดียมไอออน (V^{+5}) สามารถเพิ่มกิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่ถูก dialyze ด้วยสารละลาย EDTA และโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่สกัดได้มีความคงทนต่อระดับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Barnett และคณะ (1998) สกัดคลอโรเปอร้ออกซิเดสจากราในกลุ่ม hyphomycete fungus สายพันธุ์ *Embellisia didymospora* แหล่งของเอนไซม์ได้จากการเพาะเลี้ยง *E. didymospora* ใน liquid culture medium ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยผ่าน DEAE-Sephadex และ phenyl sepharose column และ Mono-Q HR 5/5 column เมื่อศึกษาคุณสมบัติของคลอโรเปอร้ออกซิเดส พบว่ามีมวลโมเลกุล 67,000 ดาลตัน โดยคลอโรเปอร้ออกซิเดสที่สกัดได้มีความคงทนต่อระดับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 5 และถูกยับยั้งการทำงานโดยไอโอไดน์ไอออน

ปัจจุบันมีการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของโบรโมเปอร้ออกซิเดส เช่น Sheffield และคณะ (1992) ทำการตรึงโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดง *Corallina officinallis* โดยใช้ agarose และ sepharose พบว่าการตรึงเอนไซม์สามารถเพิ่ม thermal stability ของโบรโมเปอร้ออกซิเดสได้อย่างมีประสิทธิภาพ Deboer และ Wever (1988) ศึกษากลไกการเติมโบรโม

เข้าไปในโมเลกุลของสารอินทรีย์ในกลุ่มฟินอล ศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยา กลไกการทำงานของ เอนไซม์ และปัจจัยต่าง ๆ ที่เป็นตัวกำหนดอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยโบรโมเปอร์ออกซิเดส จากสาหร่ายทะเลสีแดง Vanpee (1988) ทำการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจาก *Streptomyces aireofaciens* เข้าสู่ *Streptomyces lividans* Shimonishi และคณะ (1998) ทำการโคลนยีนของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลสีแดง *Corallina pilulifera* เข้าสู่เซลล์ของ *Escherichia coli* เป็นผลสำเร็จ มีการศึกษาถึงโครงสร้างของเอนไซม์ ในกลุ่มฮาโลเปอร์ออกซิเดส เช่น Messerschmidt และ Wever (1996) ศึกษา X-ray structure และ metal center ของคลอโรเปอร์ออกซิเดสที่มีวานาเดียมเป็น prosthetic group ที่สกัดได้จากรา สายพันธุ์ *Curvularia inaequalis* เป็นต้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้

3.1.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้

1. เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (Shimadzu Model UV-160, ประเทศญี่ปุ่น)
2. Freeze dryer (FD4.0, Heto lab equipment Ltd., ประเทศญี่ปุ่น)
3. Vortex mixer (Vortex-genie 2, Scientific Industries Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
4. Sonicator (Sonifier cell disruptor B-30, Smithkline Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
5. Magnetic stirrer (PCM stirrer series 502, Barnstead Thermoline Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
6. เครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง (RC-5C plus, Sorvall Dupont Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
7. Peristaltic pump, system controller และ fraction collector (Automated Econo System EP-1, Bio-Rad, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
8. ตู้เย็นสำหรับควบคุมอุณหภูมิของชุดทำงาน column chromatography ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)
9. Grinding mill bruiser (Poskert-150, Porkert as. Ltd., ประเทศเซอร์เบีย)
10. อ่างน้ำร้อนพร้อมอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ
11. ตู้เย็นสำหรับเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส
12. อุปกรณ์ และเครื่องมือพื้นฐานต่าง ๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางเทคโนโลยีชีวภาพและเทคโนโลยีชีวเคมี เช่น ขวดน้ำกลั่น บีกเกอร์ ปิเปต ลูกยาง dropper หลอดทดลอง tube rack เครื่องชั่งสาร ซ้อนตักบาตร กระจกตวง ไมโครปิเปต ผ้าขาวบั้ง flash กรวย pH meter และนาฬิกาจับเวลา

3.1.2 สารเคมีที่จำเป็นในการทดลอง

1. แอมโมเนียมซัลเฟต (Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
2. เอทานอล (Merck, ประเทศเยอรมัน)
3. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Merck, ประเทศเยอรมัน)
4. โซเดียมคาร์บอเนต (Fluka, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
5. ฟีนอลเรด (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
7. คอปเปอร์ซัลเฟต (Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
8. โปตัสเซียมโบรไมด์ (Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
9. เมทานอล (Merck, ประเทศเยอรมัน)
10. อะซีโตน (Merck, ประเทศเยอรมัน)
11. กรดไฮโดรครอริก (Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
12. ไฮโรซีน (Merck, ประเทศเยอรมัน)
13. เคซีน (Fluka, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
14. Sodium deoxycholate (Fluka, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
15. Sephadex G-75 (Pharmacia, ประเทศสวีเดน)
16. Biogel A-0.5 M (Bio-Rad laboratory, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
17. Bovine serum albumin (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
18. DEAE-Sephadex (Pharmacia, ประเทศสวีเดน)
19. DEAE-Toyopearl (Tosoh, ประเทศญี่ปุ่น)
20. Ethylene diamine tetraacetic acid (Fluka, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
21. Potassium sodium tartrate (Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
22. Triton X-100 (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
23. Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Merck, ประเทศเยอรมัน)
24. richloroacetic acid (Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
25. Sodium chloride (Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย

3.2.1 การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยการบดด้วยเครื่องบดร่วมกับการใช้ดีเทอร์เจนท์

3.2.1.1 Triton X-100

แช่สาหร่ายใน Tris-CHI บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 นาน 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บดสาหร่ายด้วยเครื่องบด (grinding mill bruiser) นำกากเซลล์ที่ปั่นอยู่กับ crude enzyme มาเติม Triton X-100 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กวนนาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรอง crude enzyme ออกมาทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส (ดังแสดงในหัวข้อ 3.3) และตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (แสดงในภาคผนวก)

3.2.1.2 Sodium deoxycholate

วิธีการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.1.1 แต่ใช้ sodium deoxycholate เป็นดีเทอร์เจนท์

3.2.2 การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยวิธี freeze and thaw

แช่สาหร่ายใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 นาน 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แช่แข็งสาหร่ายที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อสาหร่ายแข็งตัว นำมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ทำ freeze and thaw 12 รอบ) จากนั้นเก็บตัวอย่าง crude enzyme ออกมาเพื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส และตรวจวัดปริมาณโปรตีน

3.2.3 การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยการบดร่วมกับวิธี freeze and thaw

3.2.3.1 ใช้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในการแช่แข็ง

แช่สาหร่ายใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 นาน 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บดสาหร่ายด้วยเครื่องบด นำกากเซลล์ที่ปั่นอยู่กับ crud enzyme มาแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายหลังจากที่สารตัวอย่างแข็งตัว นำออกมาละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ทำ freeze and thaw 8 รอบ) เก็บตัวอย่าง crude enzyme เพื่อทดสอบกิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส และตรวจวัดปริมาณโปรตีน

3.2.3.2 ใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็ง

วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 แต่ใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็ง

3.2.4 การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยการบดร่วมกับวิธี sonication

แช่สาหร่ายใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 นาน 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บดสาหร่ายด้วยเครื่องบด นำกากเซลล์ที่ปนอยู่กับ crude enzyme มาทำการ sonicate โดยใช้ น้ำแข็งช่วยในการรักษาอุณหภูมิ เก็บตัวอย่าง crude enzyme ทุก ๆ 10 นาที เพื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส และตรวจวัดปริมาณโปรตีน

3.2.5 ศึกษาผลของการกวนต่อการแพร่ของโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนหลังการบดเซลล์

ศึกษาการแพร่ของโบรโมเปอร้ออกซิเดสออกจากเซลล์เมมเบรน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับกรณีที่ใช้การกวนช่วยเร่งการแพร่ โดยแช่สาหร่ายใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 นาน 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บดสาหร่ายด้วยเครื่องบด แล้วแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน

3.2.5.1 ส่วนที่ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการแพร่ของเอนไซม์ โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง เพื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส และตรวจวัดปริมาณโปรตีน

3.2.5.2 ส่วนที่ 2 มาทำการกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง เพื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส และตรวจวัดปริมาณโปรตีน

3.2.6 การทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยการตกตะกอน

3.2.6.1 แอมโมเนียมซัลเฟต

นำ crude enzyme จากการทำให้เซลล์แตกมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 30% saturation นำไปปั่นแยกตะกอนออกที่แรงเหวี่ยง 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำ supernatant มาตกตะกอนอีกครั้งด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 70% saturation นำไปปั่นแยกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 12,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ละลายตะกอนของโปรตีนด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 โดยใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อยที่สุด dialyse กับ Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน (เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง) นำสารละลายเอนไซม์ไปตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส

3.2.6.2 เมธานอล และเอทานอล

นำ crude enzyme ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกมาตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (เมธานอล และเอทานอล) 60% นำไปปั่นแยกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 12,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ละลายตะกอนของโปรตีนด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 โดยใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อยที่สุด แล้ว dialyse กับ Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน (เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง) นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดส

3.2.6.3 อะซีโตน

นำ crude enzyme ที่ได้จากการทำให้เซลล์แตกมาตกตะกอนด้วยอะซีโตน 30% นำไปปั่นแยกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 12,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำ supernatant มาตกตะกอนโปรตีนอีกครั้งด้วยอะซีโตน 70% แล้วปั่นแยกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 12,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ละลายตะกอนของโปรตีนด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 โดยใช้ตัวทำละลายปริมาณน้อยที่สุด dialyse กับ Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน (เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง) นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดส

3.2.7 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย ion-exchange chromatography

3.2.7.1 DEAE-Sephadex

บรรจุ DEAE-Sephadex ลงในคอลัมน์ที่มีขนาด 2.5 × 4 เซนติเมตร แล้ว equilibrate โดยการชะด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 flow rate 40 มิลลิลิตร/ชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์จากการตกตะกอนในขั้นตอนที่ 3.2.6.3 มา apply ลงคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-1.0 โมลาร์ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 เก็บ fraction ละ 4 มิลลิลิตร นำ fraction ต่าง ๆ มาทดสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดส และตรวจวัดปริมาณโปรตีน รวบรวม fraction ที่มีโบรมิเปอร์ออกซิเดสในปริมาณสูงเข้าด้วยกัน (รวบรวมเฉพาะ fraction ที่มีปริมาณของเอนไซม์มากกว่า 20% ของ fraction ที่มีปริมาณโบรมิเปอร์ออกซิเดสสูงสุด) นำ pool fraction มา dialyse กับ Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 2,000 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน (เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง) แล้ว dry สารละลาย pool fraction โดย freeze dryer เพื่อนำไปผ่านขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป

3.2.7.2 DEAE-Toyopearl

วิธีการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.2.7.1 แต่ใช้ DEAE-Toyopearl เป็น anion exchanger

3.2.8 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย gel filtration chromatography

3.2.8.1 Sephadex G-75 (fractionation range 3,000 – 70,000 ดาลตัน)

บรรจุ Sephadex G-75 ลงในคอลัมน์ขนาด 1.1×40 เซนติเมตร แล้ว equilibrate คอลัมน์ด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 flow rate 40 มิลลิลิตร/ชั่วโมง นาน 12 ชั่วโมง apply สารละลายเอนไซม์บางส่วนจากการทดลอง 3.2.7.2 ลงในคอลัมน์ ะด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 flow rate 40 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายเอนไซม์ fraction ละ 2 มิลลิลิตร นำมาตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดส

3.2.8.2 Biogel A-0.5 M (fractionation range 10,000 – 500,000 ดาลตัน)

วิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.8.1 แต่ใช้ Biogel A-0.5 M

3.2.9 การตรวจวัดโปรตีนใน crude และ partial purified enzymes

นำ crude enzyme และ partial purified enzyme มาตรวจวัดปริมาณโปรตีน (แสดงในภาคผนวก ข.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณของโปรตีน

3.2.10 การประมาณขนาดโมเลกุลโบรมิเปอร์ออกซิเดสโดยวิธี gel filtration chromatography

บรรจุ Sephadex G-75 ลงในคอลัมน์ขนาด 1.1×40 เซนติเมตร แล้ว equilibrate คอลัมน์ด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 flow rate 40 มิลลิลิตร/ชั่วโมง นาน 12 ชั่วโมง apply สารละลายโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย thyroglobulin (670,000), gamma globulin (158,000), ovalbumin (44,000), myoglobin (17,000) และ vitamin B-12 (1,350) ลงในคอลัมน์ ะด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 flow rate 40 มิลลิลิตร/ชั่วโมง เก็บสารละลายตัวอย่าง fraction ละ 2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\log(MW)$ และ distribution coefficient ของโปรตีนมาตรฐาน (แสดงในภาคผนวก ข.) เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับขนาดโมเลกุลของโบรมิเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้ โดยใช้คอลัมน์เดียวกับที่หาโปรตีนมาตรฐาน

3.2.11 ศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส

นำ partial purified enzyme มา dialyze ด้วยสารละลาย EDTA 1 มิลลิโมลาร์ ที่ 4 องศาเซลเซียส เติม metal ion solution ของ K^+ , Mg^{2+} , V^{5+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} ที่ปรับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ ทดสอบหา กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส

3.2.12 ศึกษาผลของปริมาณวานาเดียมไอออนต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่สกัดได้

นำ partial purified enzyme มาเติมสารละลายวานาเดียมไอออนที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ แล้วทดสอบหา กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส

3.2.13 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของโบรโมเปอร้ออกซิเดส

แบ่ง crude และ partial purified enzyme ที่สกัดได้เป็น 6 ส่วน ปรับอุณหภูมิของสารละลายเอนไซม์แต่ละส่วนเป็น 30, 40, 50, 55, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับที่ pH 6.0 นาน 30 นาที ทดสอบหา กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส

3.2.14 ศึกษาผลของความเป็นกรดและด่างต่อความคงทนของโบรโมเปอร้ออกซิเดส

แบ่ง crude และ partial purified enzymes ที่สกัดได้เป็น 6 ส่วน ปรับระดับความเป็นกรดและด่างของสารละลายเอนไซม์แต่ละส่วนเป็น pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ (บัฟเฟอร์ที่ใช้ คือ อะซิเตทบัฟเฟอร์, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ Tris-HCl บัฟเฟอร์) ทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทดสอบหา กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส

3.2.15 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโบรโมเปอร้ออกซิเดส

แบ่ง crude และ partial purified enzyme ที่สกัดได้เป็น 6 ส่วน ทดสอบหา กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่ระดับอุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับที่ pH 6.0

3.2.16 ศึกษาระดับความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

แบ่ง crude และ partial purified enzymes ที่สกัดได้เป็น 6 ส่วน ทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (บัฟเฟอร์ที่ใช้ใน reaction mixture ได้แก่ อะซีเตทบัฟเฟอร์, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ Tris-HCl บัฟเฟอร์)

3.2.17 การศึกษาความคงทนในการเก็บรักษา

แบ่ง crude และ partial purified enzymes ที่สกัดได้ออกเป็น 2 กลุ่ม เก็บเอนไซม์ที่ 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสทุก 4 วัน

3.3 การทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

ตรวจสอบกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส โดยอาศัยความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา peroxidative halogenation ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส ที่เร่งการเติมหมู่โบรไมด์เข้าสู่ฟีนอลเรด โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้าร่วมในปฏิกิริยา เกิดผลิตภัณฑ์ halogenated product (bromophenol blue) ซึ่งดูดกลืนคลื่นแสงที่ 590 นาโนเมตร

3.3.1 สารเคมี

3.3.1.1 โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0

3.3.1.2 โปตัสเซียมโบรไมด์

3.3.1.3 ฟีนอลเรด

3.3.1.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.3.2 ขั้นตอนการทดสอบ

3.3.2.1 สารละลายเอนไซม์ 50 ไมโครลิตร

3.3.2.2 เติมสารละลายฟีนอลเรด 20 มิลลิโมลาร์ โปตัสเซียมโบรไมด์ 30 มิลลิโมลาร์ ในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 6.0 ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร

3.3.2.3 เริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 12 มิลลิโมลาร์ 50 ไมโครลิตร ลงใน assay mixture เขย่าให้เข้ากัน

3.3.2.4 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.3.2.5 แช่ว assay mixture ในอ่างน้ำแข็งเพื่อชะลอการเกิดปฏิกิริยา

3.3.2.6 รีบน้ำ assay mixture ไปตรวจวัดการดูดกลืนคลื่นแสงของ bromophenol blue ที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

3.3.2.7 เปรียบเทียบปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้ bromophenol blue เป็นกราฟมาตรฐาน

- 1 หน่วย (U) ของโบรโมเปอร้ออกซิเดส หมายถึง ปริมาณโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่ผลิต bromophenol blue 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

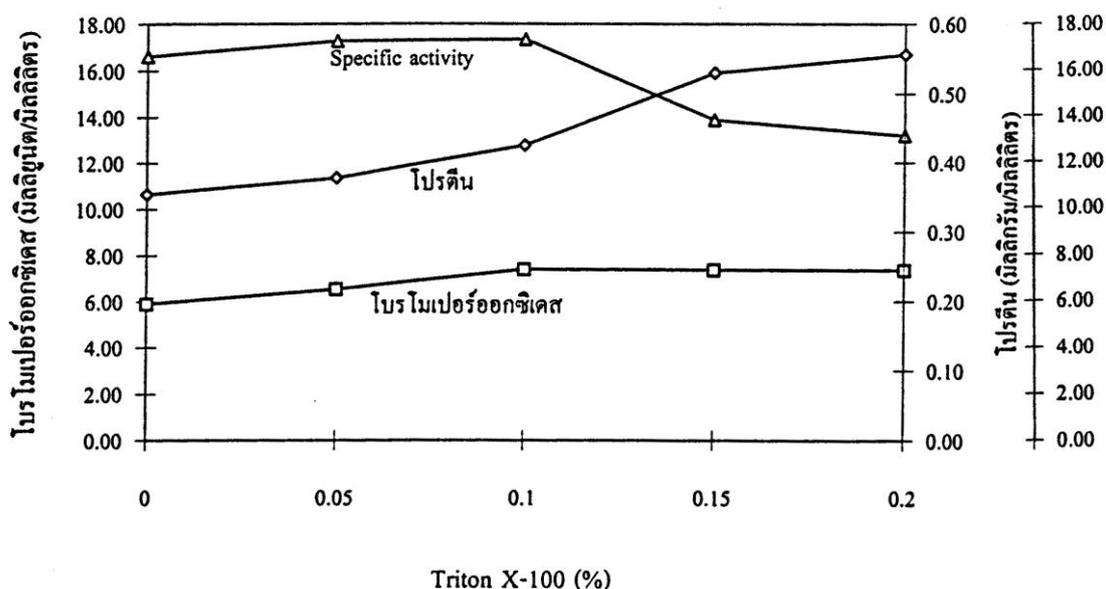
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสกัดโบรมิเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยการบดร่วมกับการใช้ดีเทอร์เจนท์

1.1 Triton X-100

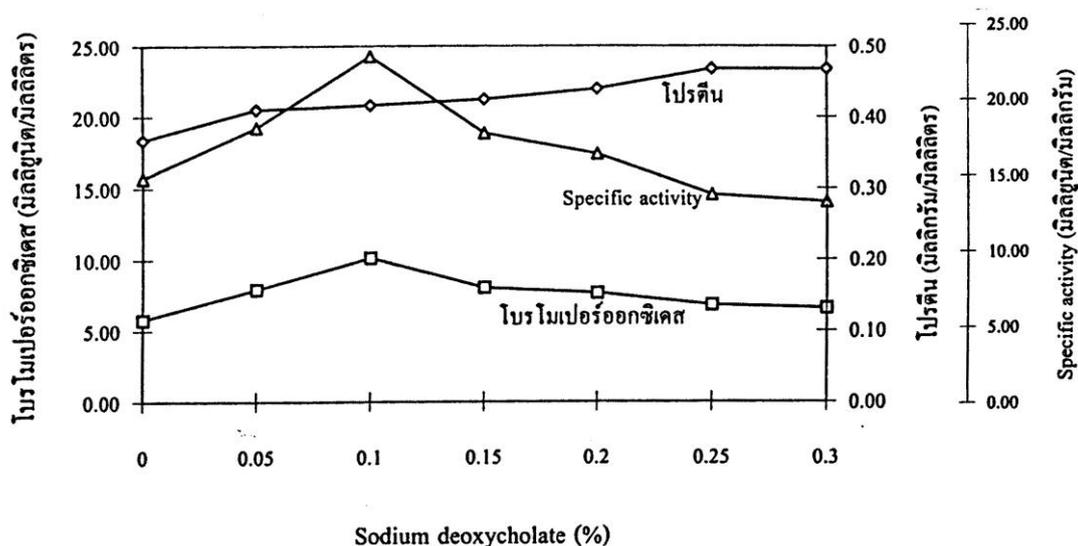
ภายหลังจากการบดเซลล์สำหรับด้วยเครื่องบดแล้ว เมื่อใช้ Triton X-100 เข้าช่วยสกัดโบรมิเปอร์ออกซิเดส พบว่า Triton X-100 เข้มข้น 0.1% สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนออกจากเซลล์ได้สูงสุด โดยปริมาณโบรมิเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme เพิ่มขึ้น 25.20% เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้ดีเทอร์เจนท์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Triton X-100 ขึ้นเป็น 0.15 และ 0.20% สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดออกจากเซลล์ได้ แต่เมื่อตรวจสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme ไม่พบว่าการเพิ่มเอนไซม์เพิ่มขึ้น และพบว่า specific activity มีค่าลดลง 19.93% และ 23.94% ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.1 และตารางที่ ก.1



รูปที่ 4.1 ผลของการสกัดโบรมิเปอร์ออกซิเดสโดยการบดเซลล์ร่วมกับ Triton X-100

1.2 deoxycholate

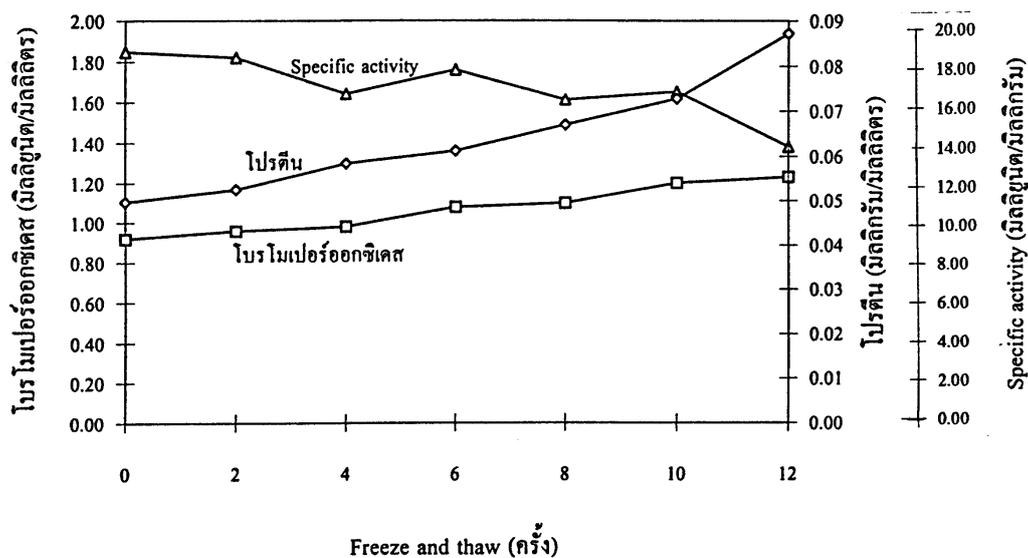
ภายหลังจากการบดเซลล์สาหร่าย เมื่อใช้ sodium deoxycholate เข้าช่วยสกัด โบรโมเปอร้ออกซิเดส พบว่า sodium deoxycholate เข้มข้น 0.1% สามารถเพิ่มปริมาณโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่สกัดออกจากเซลล์ได้สูงสุด โดย specific activity ใน crude enzyme เพิ่มขึ้น 54.87% เมื่อเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้ sodium deoxycholate เข้าช่วยในการสกัดเอนไซม์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ sodium deoxycholate ขึ้นเป็น 0.15% และ 0.20% สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดออกจากเซลล์ได้อีก 2.07% และ 5.57% ตามลำดับ แต่เมื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และ specific activity ลดลง 22.34% และ 28.27% ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.2 และตารางที่ ก.2



รูปที่ 4.2 ผลของการสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสโดยการบดเซลล์ร่วมกับ sodium deoxycholate

2. การสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยวิธี freeze and thaw

จากการทำให้เซลล์แตกโดยวิธี freeze and thaw พบว่าการทำงาน freeze and thaw สามารถทำให้เซลล์แตก แต่ช่วยสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากเซลล์แมมเบรนได้ในปริมาณต่ำ โดยเมื่อทำ freeze and thaw 4, 8 และ 12 รอบ ได้ปริมาณโปรตีน 0.06, 0.07 และ 0.09 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสได้ 0.96, 1.08 และ 1.20 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 4.3 และตารางที่ ก.3

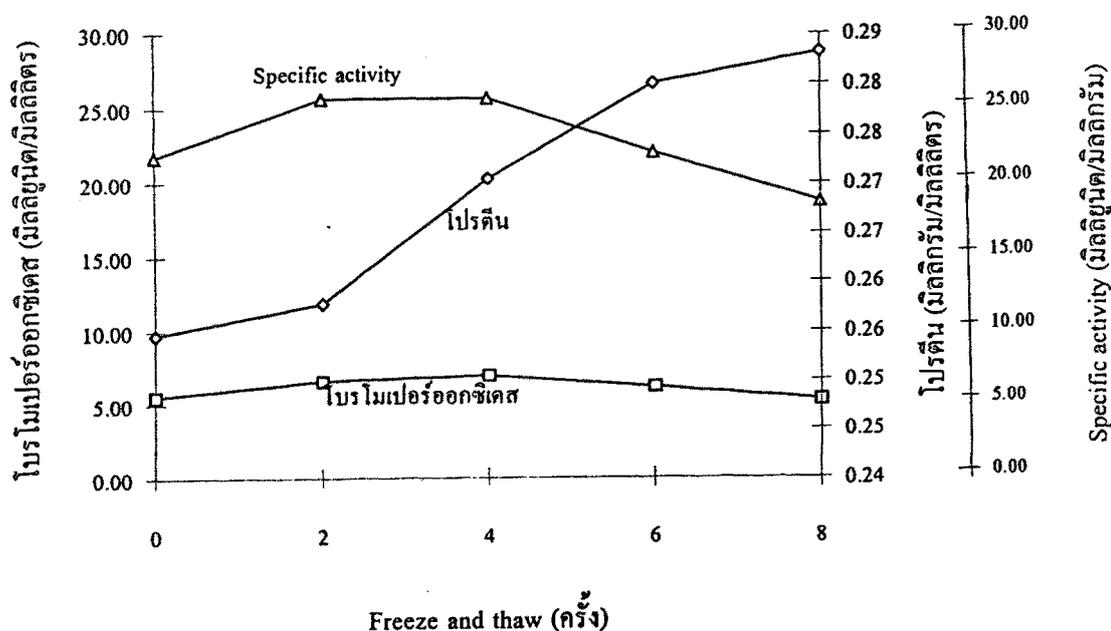


รูปที่ 4.3 ผลของการสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยวิธี freeze and thaw

3. การสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยวิธีการบดเซลล์ร่วมกับวิธี freeze and thaw

3.1 freeze and thaw โดยใช้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในการแช่แข็ง

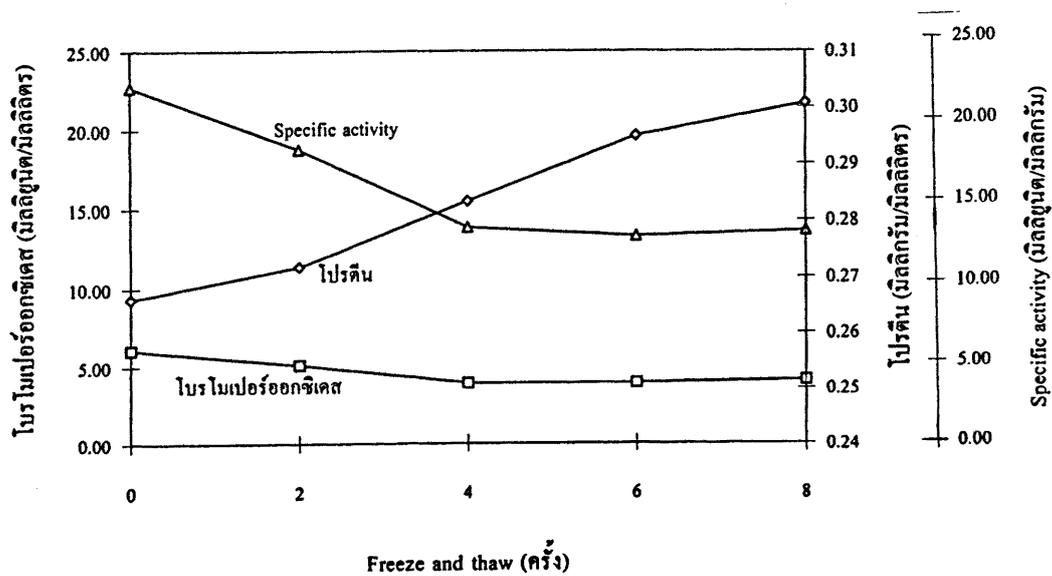
เมื่อบดเซลล์ร่วมกับการทำ freeze and thaw โดยใช้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในการแช่แข็ง พบว่าการทำ freeze and thaw 4 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่สกัดจากเซลล์ได้สูงสุด โดย specific activity ใน crude enzyme เพิ่มขึ้น 18.09% เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้ freeze and thaw เข้าช่วยในการสกัดเอนไซม์ เมื่อเพิ่มจำนวนการทำ freeze and thaw สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ได้ โดยการทำ freeze and thaw 8 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนได้ 12.01% แต่เมื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme พบว่า specific activity มีค่าลดลง 4.16% ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.4 และตารางที่ ก.4



รูปที่ 4.4 ผลของการสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสโดยการบดเซลล์ร่วมกับวิธี freeze and thaw เมื่อใช้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในการแช่แข็ง

3.2 Freeze and thaw โดยใช้ น้ำแข็งแห้ง ในการแช่แข็ง

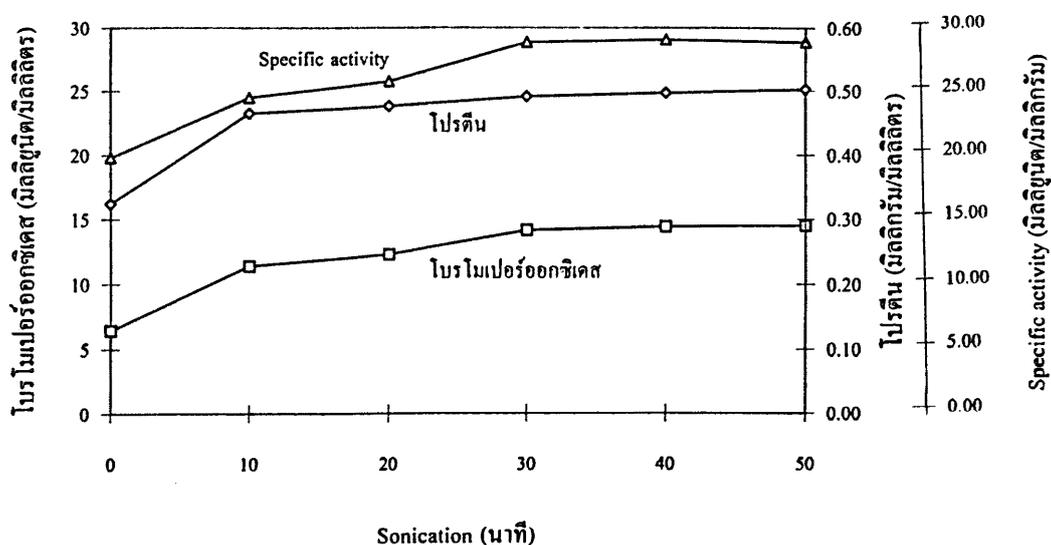
เมื่ออบเซลล์ร่วมกับการทำ freeze and thaw โดยใช้ น้ำแข็งแห้ง ในการแช่แข็ง เซลล์สาหร่าย พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนจากเซลล์ที่ถูกอบแล้วได้ โดยในการทำ freeze and thaw 8 ครั้ง สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนได้ 11.10% เมื่อตรวจสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสพบว่าหลังการทำ freeze and thaw 4 ครั้งมีค่าคงที่ แต่ specific activity ใน crude enzyme มีแนวโน้มลดลง โดยลดลง 17.50%, 39.16% และ 41.58% ในการทำ freeze and thaw 2, 4 และ 6 ครั้ง ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.5 และตารางที่ ก.5



รูปที่ 4.5 ผลของการสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสโดยการอบเซลล์ร่วมกับการทำ freeze and thaw เมื่อใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็ง

4. การสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยวิธีการบดเซลล์ร่วมกับวิธี sonication

เมื่อบดสาหร่ายด้วยเครื่องบด นำกากเซลล์และ crude enzyme มาทำการ sonicate พบว่าการ sonicate นาน 30 นาที สามารถเพิ่มปริมาณโบรโมเปอร้ออกซิเดสออกจากเซลล์ได้สูงสุด โดย specific activity ใน crude enzyme เพิ่มขึ้น 45.48% เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้ sonication เข้าช่วยในการสกัดเอนไซม์ หลังจาก 30 นาที เมื่อเพิ่มเวลาในการ sonicate พบว่าปริมาณโปรตีนจากเซลล์เพิ่มขึ้นในปริมาณน้อย โดยในนาทีที่ 50 โปรตีนเพิ่มขึ้นเพียง 1.99% และ specific activity เพิ่มขึ้นเพียง 0.03% ผลการทดลองแสดงในรูปแบบที่ 4.6 และตารางที่ ก.6

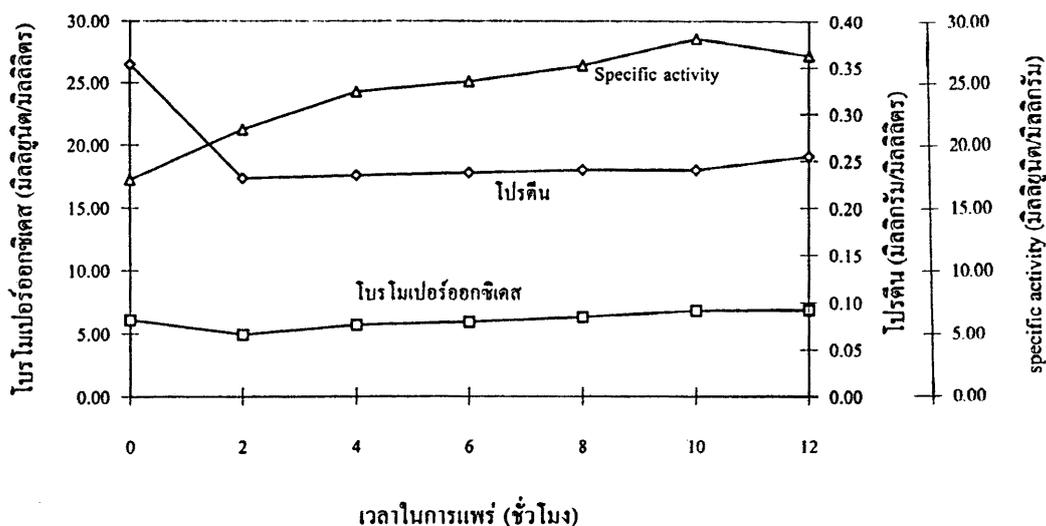


รูปที่ 4.6 ผลของการสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสโดยการบดเซลล์ร่วมกับวิธี sonication

5. ผลของการกวนต่อการแพร่ของโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนหลังจากบดเซลล์

5.1 การแพร่ของโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนหลังการบดเซลล์

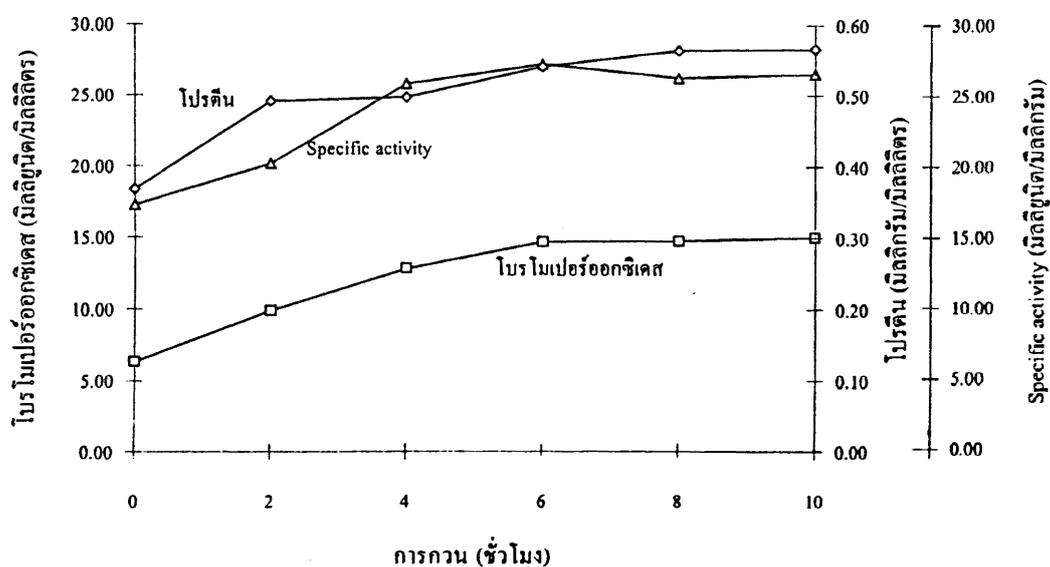
เมื่อบดเซลล์สําหรับและปล่อยให้เกิดการแพร่ของโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าในชั่วโมงที่ 10 specific activity ใน crude enzyme มีค่าสูงสุดโดยเพิ่มขึ้น 65.64% และกิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme เพิ่มขึ้น 12.85% ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.7 และตารางที่ ก.7



รูปที่ 4.7 ผลของการแพร่ของโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนหลังจากการบดเซลล์

5.2 การสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากเซลล์โดยวิธีการบดเซลล์ร่วมกับการกวน

เมื่อบดเซลล์สำหรับ และกวนเศษเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้เวลาในการกวน 6 ชั่วโมง specific activity ของ crude enzyme เพิ่มขึ้น 57.54% เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้การกวนเข้าช่วยในการสกัดเอนไซม์ เมื่อเพิ่มเวลาในการกวน สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดออกจากเซลล์ได้ โดยในชั่วโมงที่ 10 ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น 54.05% เมื่อตรวจสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme พบว่า specific activity ลดลง 2.12% เมื่อเปรียบเทียบกับ specific activity ในชั่วโมงที่ 6 ผลการทดลองแสดงในรูปแบบที่ 4.8 และตารางที่ ก.8



รูปที่ 4.8 ผลของการสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากเซลล์โดยวิธีการบดเซลล์ร่วมกับการกวน

6. การทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยการตกตะกอน

หลังจากการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต, เมธานอล, เอทานอล และอะซีโตน เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีน และตรวจสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส ใน crude และ partial purified enzymes จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงการตกตะกอน 30-70%, partial purified enzyme จากการตกตะกอนด้วยเมธานอล และเอทานอล ช่วงการตกตะกอน 0-60% และ partial purified enzyme จากการตกตะกอนด้วยอะซีโตน ช่วงการตกตะกอน 30-70% พบว่าการตกตะกอนด้วยอะซีโตนให้ค่า degree of purification สูงสุดเท่ากับ 4.21 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, เมธานอล และเอทานอลให้ค่า degree of purification เท่ากับ 1.95, 0.95 และ 0.87 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 และ ตารางที่ ก.9 ถึง ก.12

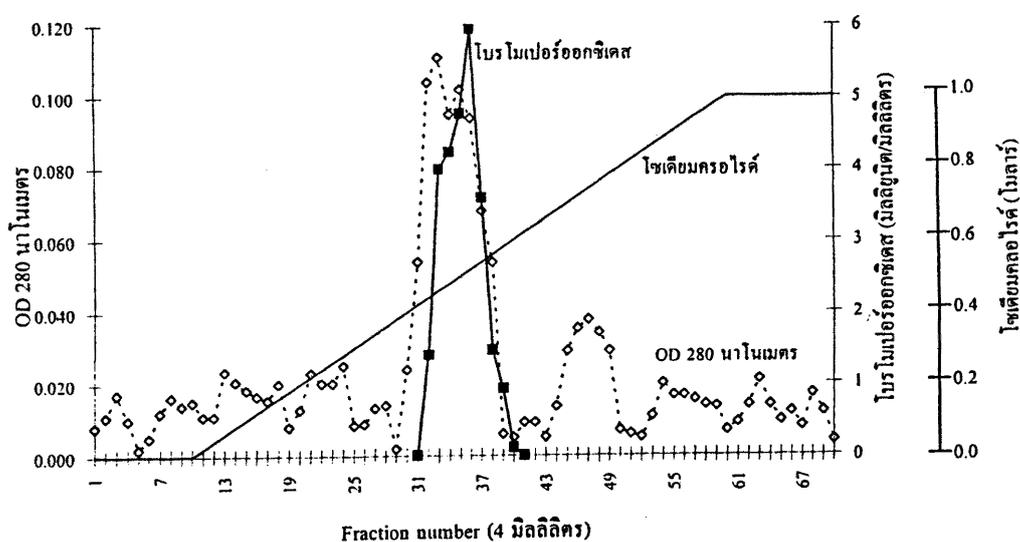
ตารางที่ 4.1 ผลของการตกตะกอน crude enzyme ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, อะซีโตน, เมธานอล และเอทานอล

Precipitant	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิกรัม)		Degree of purification
	Crude enzyme	Partial purified enzyme จากการตกตะกอน	
แอมโมเนียมซัลเฟต (30-70%)	22.52	43.91	1.95
อะซีโตน (30-70%)	22.52	97.80	4.21
เมธานอล (0-60%)	20.32	19.30	0.95
เอทานอล (0-60%)	20.32	17.67	0.87

7. การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย ion-exchange chromatography

7.1 DEAE-Sephadex

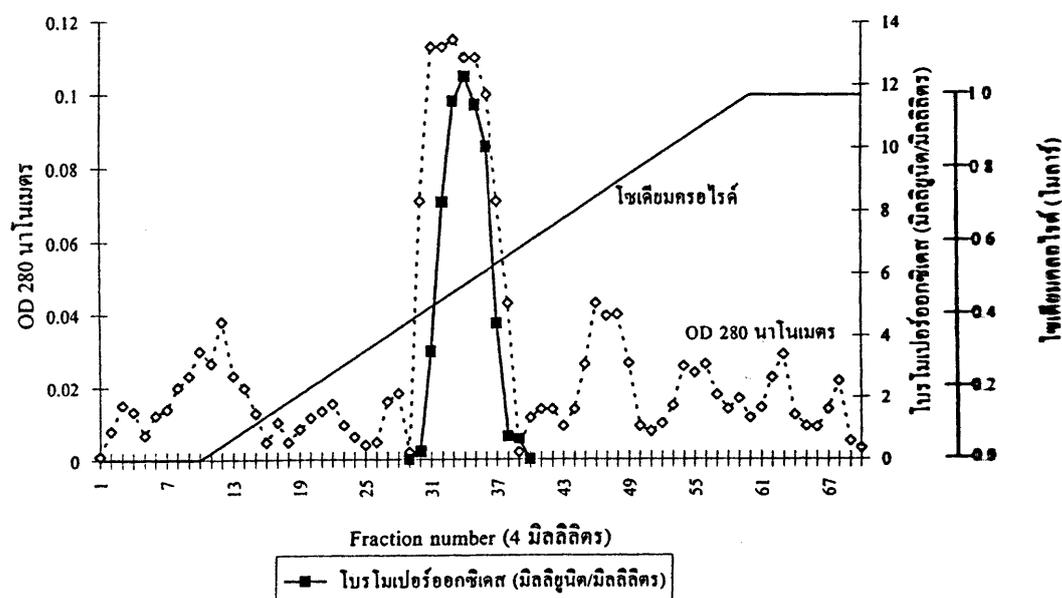
นำ partial purified enzyme ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซิโตน มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยใช้ DEAE-Sephadex ซึ่งเป็น anion-exchanger เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction พบว่าโบรมิเปอร์ออกซิเดสเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ใน fraction ที่ 32 และพบปริมาณของโบรมิเปอร์ออกซิเดสสูงสุดใน fraction ที่ 36 (5.94 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร) elution profiles ของการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.9 และตารางที่ ก.13



รูปที่ 4.9 Elution profiles ของโบรมิเปอร์ออกซิเดสจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย DEAE-Sephadex

7.2 DEAE-Toyopearl

นำ partial purified enzyme ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยอะซีโตน มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ DEAE-Toyopearl ซึ่งเป็น anion exchanger เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสในแต่ละ fraction พบว่าโบรโมเปอร้ออกซิเดสเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ใน fraction ที่ 30 และพบปริมาณของโบรโมเปอร้ออกซิเดสสูงสุดใน fraction ที่ 34 (12.24 มิลลิวินิต/มิลลิลิตร) elution profiles ของการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.10 และตารางที่ ก.14

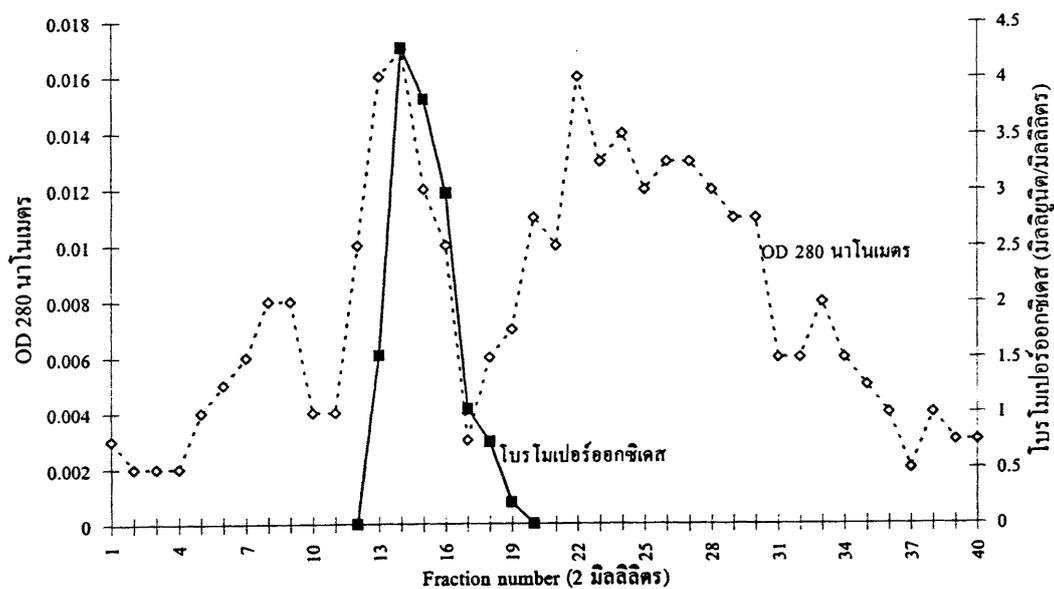


รูปที่ 4.10 Elution profiles ของโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย DEAE-Toyopearl

8. การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย gel filtration chromatography

8.1 Sephadex G-75

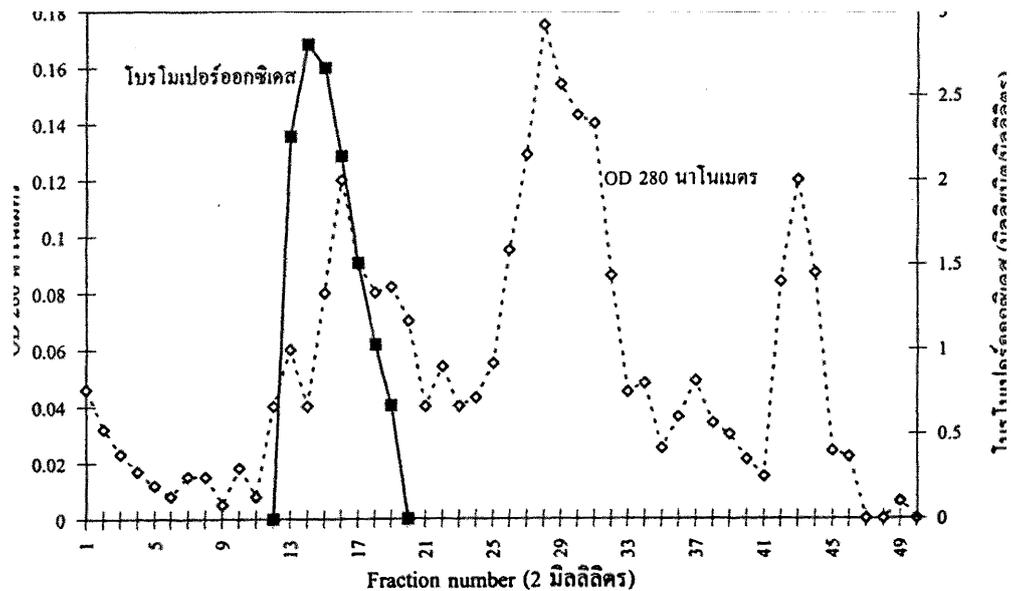
เมื่อนำ partial purified enzyme ที่ได้จาก DEAE-Toyopearl มาทำให้บริสุทธิ์โดย Sephadex G-75 เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction พบว่าโบรมิเปอร์ออกซิเดสเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ใน fraction ที่ 13 และปริมาณของโบรมิเปอร์ออกซิเดสสูงสุดใน fraction ที่ 14 (4.26 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร) elution profiles ของการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11 และตารางที่ ก.15



รูปที่ 4.11 Elution profiles ของโบรมิเปอร์ออกซิเดสจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย Sephadex G-75

8.2 Biogel A-0.5 M

เมื่อนำ partial purified enzyme ที่ได้จาก DEAE-Toyopearl มาทำให้บริสุทธิ์โดย Biogel A-0.5 M เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสในแต่ละ fraction พบว่าโบรโมเปอร้ออกซิเดสเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ใน fraction ที่ 13 และปริมาณของโบรโมเปอร้ออกซิเดสสูงสุดใน fraction ที่ 14 (2.81 มิลลิวินิต/มิลลิลิตร) elution profiles ของการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.12 และตารางที่ ก.16



รูปที่ 4.12 Elution profiles ของโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย Biogel A-0.5 M

9. สรุปการสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดง *Polycarvernosa* sp.

จากการสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากสาหร่ายหนัก 500 กรัม (น้ำหนักเปียก) โดยเลือกใช้วิธีการสกัดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดได้แก่ การบดเซลล์ร่วมกับการกวนนาน 6 ชั่วโมง และเลือกวิธีการตกตะกอนด้วย precipitant ที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดได้แก่ การตกตะกอนด้วยอะซีโตนโดยใช้ช่วงการตกตะกอน 30-70% และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย ion-exchange chromatography (DEAE-Toyopearl) และ gel filtration chromatography (Sephadex G-75) สามารถสรุปผลการสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดส ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดง *Polycarvernosa* sp.

ขั้นตอน ในการสกัด	Total protein (มิลลิกรัม)	Total activity (มิลลียูนิต)	Specific activity (มิลลียูนิต/มิลลิกรัม)	Purification fold	Yield (%)
การบดเซลล์ และกวนนาน 6 ชั่วโมง	667.95	14746.59	22.14	1.00	100.00
การตกตะกอน ด้วยอะซีโตน (30-70%)	98.23	9156.83	93.21	4.21	62.09
Ion-exchange chromatography (DEAE-Toyopearl)	43.57	6986.35	160.38	7.24	47.37
Gel filtration chromatography (Sephadex G-75)	17.71	5589.12	315.30	14.42	37.90

10. การตรวจวัดโปรตีนใน crude และ partial purified enzymes

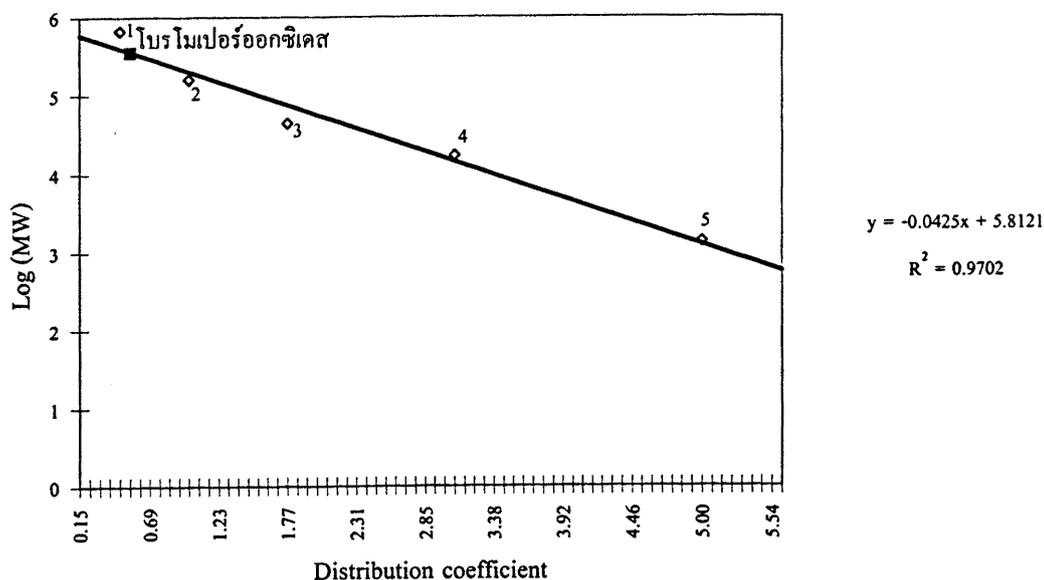
เมื่อนำ crude และ partial purified enzymes มาตรวจหาปริมาณโปรตีนแล้ว นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 นาโนเมตร มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (แสดงในภาคผนวก ข.) สามารถหาปริมาณโปรตีนได้ดังผลการทดลองในตารางที่ 4.3 และตารางที่ ก.17

ตารางที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนใน crude และ partial purified enzymes

ตัวอย่างเอนไซม์	โปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิตร)
Crude enzyme	267
Partial purified enzyme	0.002

11. การประมาณขนาดโมเลกุลโบริโมเปอร้ออกซิเดสโดย gel filtration chromatography

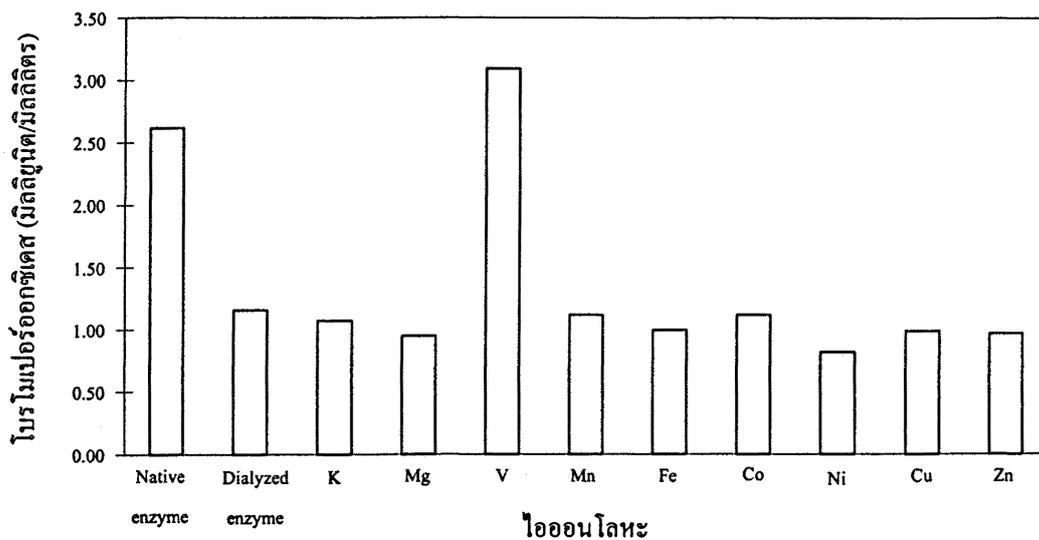
หลังจากผ่านโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งประกอบด้วย thyroglobulin (670,000), gamma globulin (158,000), ovalbumin (44,000), myoglobin (17,000) และ vitamin B-12 (1,350) ลงใน Sephadex G-75 คอลัมน์ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนในแต่ละ fraction ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Log (MW) และ distribution coefficient ของโปรตีนมาตรฐาน จากนั้น apply ตัวอย่างเอนไซม์ลงในคอลัมน์เดียวกับโปรตีนมาตรฐาน แล้วนำค่า distribution coefficient ของโบริโมเปอร้ออกซิเดสมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งสามารถหาขนาดโมเลกุลของโบริโมเปอร้ออกซิเดสได้ประมาณ 615,000 ดาลตัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.13 และตารางที่ ก.18



รูปที่ 4.13 การประมาณขนาดโมเลกุลของโบริโมเปอร้ออกซิเดสโดย Sephadex G-75

12. ผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

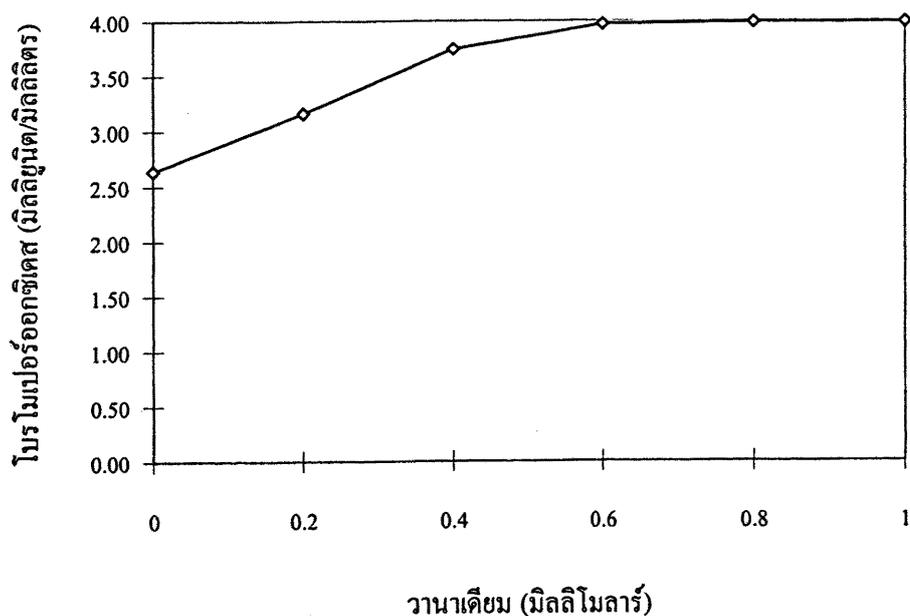
เมื่อนำ partial purified enzyme มา dialyze ด้วย EDTA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเติมไอออนโลหะของ K^+ , Mg^{2+} , V^{5+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ นำมาตรวจสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.14 และตารางที่ ก.19



รูปที่ 4.14 ผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

13. ผลของปริมาณวานาเดียมไอออนต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

เมื่อนำ partial purified enzyme มาเติมสารละลายวานาเดียมที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ แล้วตรวจสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส พบว่าสารละลายวานาเดียมไอออนที่ความเข้มข้นของสุดท้ายเท่ากับ 0.6 มิลลิโมลาร์ ทำให้กิจกรรมของ partial purified enzyme เพิ่มขึ้น 50.98% และความเข้มข้นของวานาเดียมสูงกว่า 0.6 มิลลิโมลาร์ไม่ทำให้กิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.15 และตารางที่ ก.20

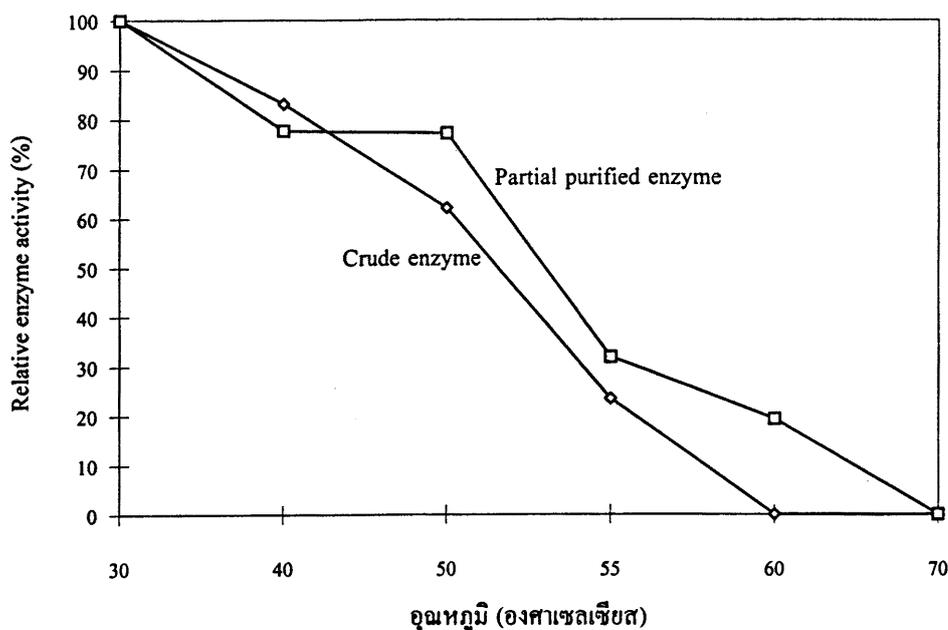


รูปที่ 4.15 ผลของปริมาณของวานาเดียมไอออนต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

14. การศึกษาคุณสมบัติของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

14.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

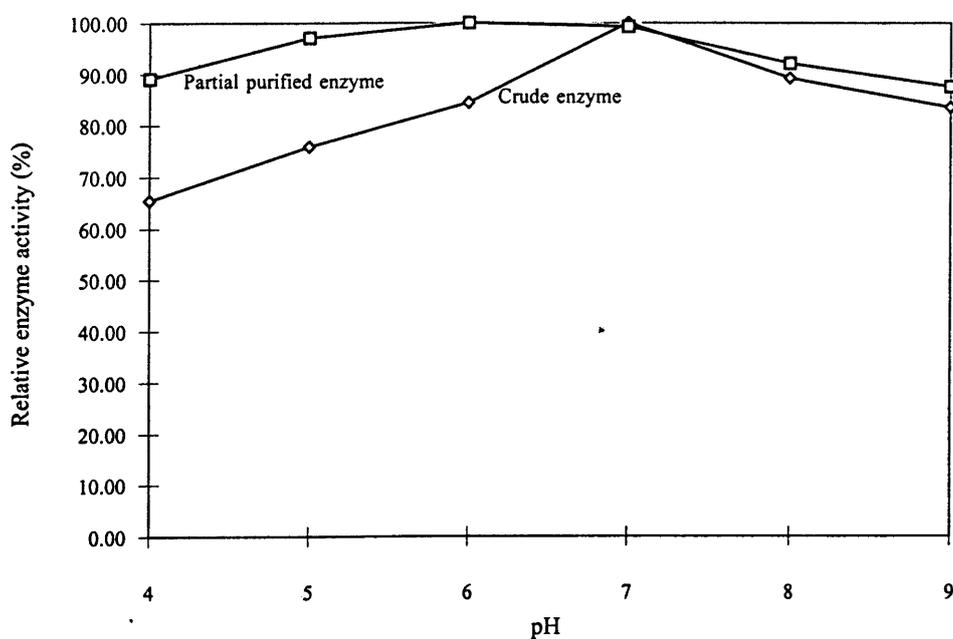
เมื่อแบ่ง crude และ partial purified enzymes เป็น 6 ส่วน ปรับอุณหภูมิของเอนไซม์แต่ละส่วนเป็น 30, 40, 50, 55, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ที่ pH 6 ตามลำดับ นาน 30 นาทีตรวจสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความคงทนของ crude enzyme มีแนวโน้มลดลง โดยที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ไม่พบกิจกรรมของ crude enzyme และพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความคงทนของ partial purified enzyme มีแนวโน้มลดลง โดยที่อุณหภูมิ 40, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส relative enzyme activity ลดลง 22.29%, 22.85%, 68.27% และ 80.80% ตามลำดับ และที่ 70 องศาเซลเซียส ไม่พบกิจกรรมของ partial purified enzyme ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.16, ตารางที่ ก.21 และตารางที่ ก.22



รูปที่ 4.16 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของ crude และ partial purified enzymes

14.2 ศึกษาผลของความเป็นกรดและด่างต่อความคงทนของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

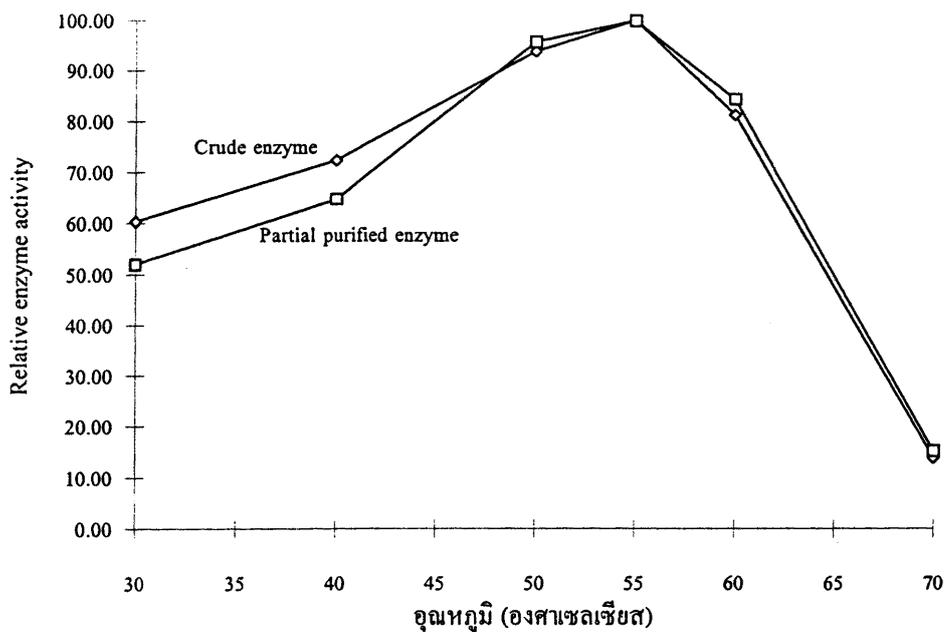
เมื่อแบ่ง crude และ partial purified enzymes ที่สกัดได้เป็น 6 ส่วน ปรับระดับความเป็นกรดและด่างของสารละลายเอนไซม์แต่ละส่วนให้มีค่า pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ตามลำดับ จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส พบว่า crude enzyme มีความคงทนที่ pH 7 ได้ดีที่สุดในที่ pH 4 และ pH 9 กิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสลดลง 34.53% และ 16.48% ตามลำดับ และพบว่า partial purified enzyme มีความคงทนที่ pH 6 ได้ดีที่สุดในที่ pH 4 และ pH 9 กิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสลดลง 10.99% และ 12.34% ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.17, ตารางที่ ก.23 และตารางที่ ก.24



รูปที่ 4.17 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อความคงทนของ crude และ partial purified enzymes

14.3 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของโบรมิเปอร์ออกซิเดส

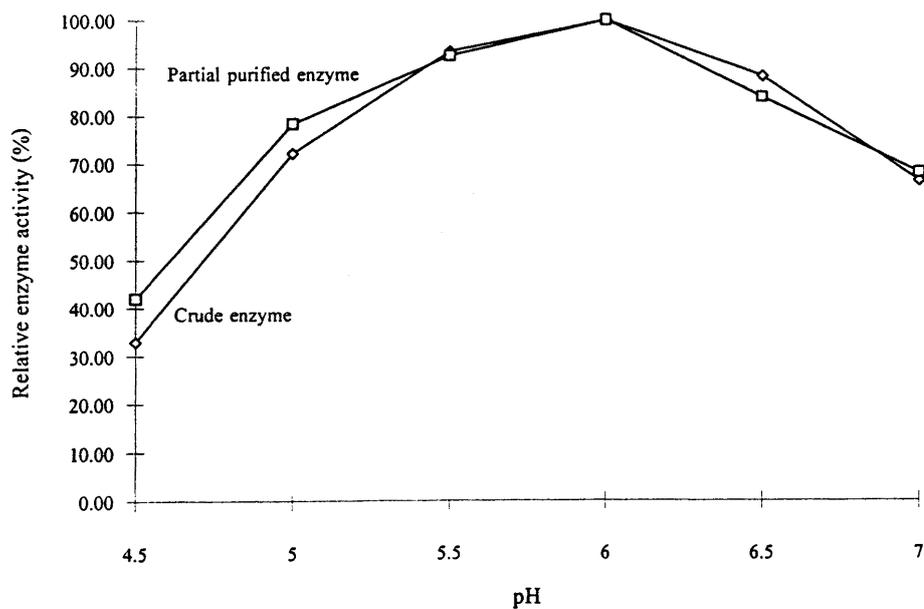
เมื่อแบ่ง crude และ partial purified enzymes เป็น 6 ส่วน แล้วทดสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดส ที่ระดับอุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่ pH 6 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของ crude และ partial purified enzymes คือที่ 55 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.18, ตารางที่ ก.25 และตารางที่ ก.26



รูปที่ 4.18 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude และ partial purified enzymes

14.4 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อการทำงานของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

เมื่อแบ่ง crude และ partial purified enzymes เป็น 6 ส่วน แล้วทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของ crude และ partial purified enzymes คือ pH 6 ผลการทดลองดังรูปที่ 4.19, ตารางที่ ก.27 และตารางที่ ก.28

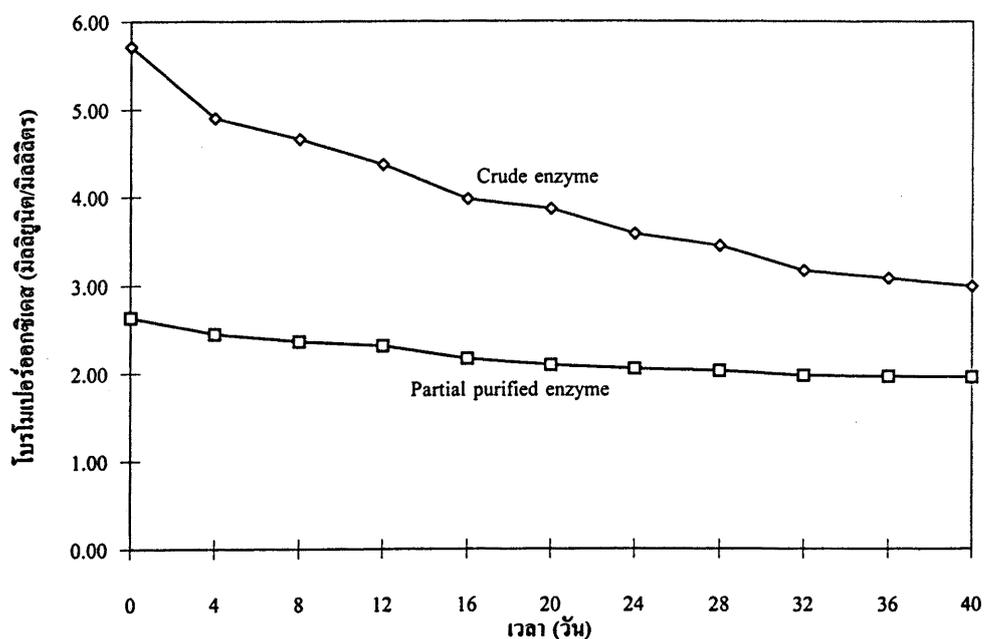


รูปที่ 4.19 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อการทำงานของ crude และ partial purified enzymes

15. ศึกษาความคงทนต่อการเก็บ

15.1 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

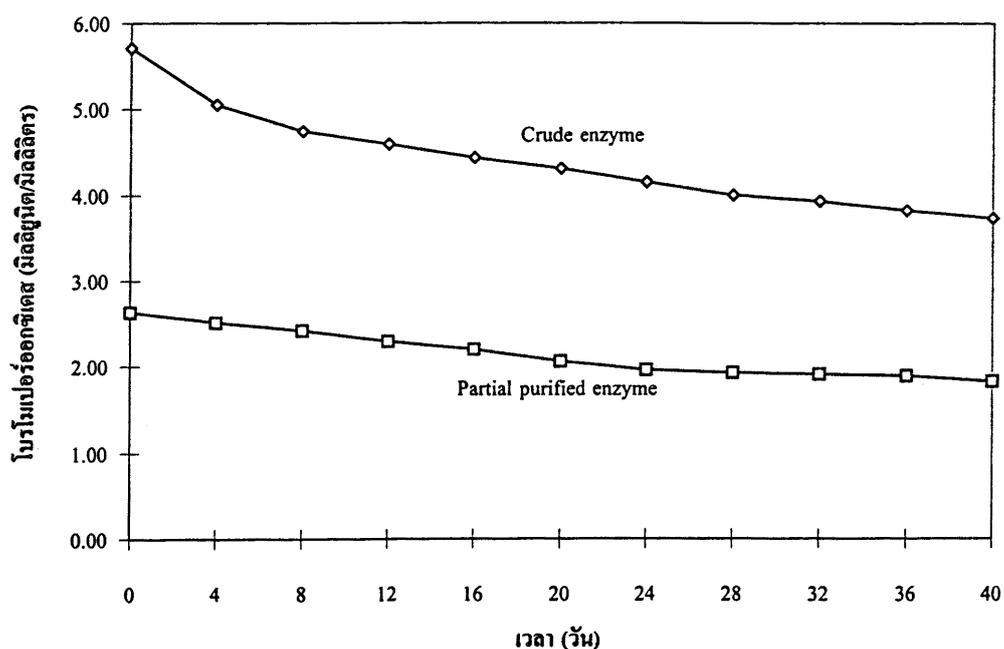
หลังจากเก็บ crude และ partial purified enzymes ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสทุก 4 วัน พบว่าเมื่อเวลานานขึ้น ความคงทนของ crude และ partial purified enzymes มีแนวโน้มลดลง โดยในเวลา 40 วัน กิจกรรมของ crude enzyme ลดลง 47.50% และกิจกรรมของ partial purified enzyme ลดลง 26.07% ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.20 และตารางที่ ก.29



รูปที่ 4.20 ความคงทนของ crude และ partial purified enzymes เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

15.2 เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

หลังจากเก็บ crude และ partial purified enzymes ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสทุก 4 วัน พบว่าเมื่อเวลานานขึ้นความคงทนของ crude และ partial purified enzymes มีแนวโน้มลดลง โดยในเวลา 40 วันกิจกรรมของ crude enzyme ลดลง 34.48% และกิจกรรมของ partial purified enzyme ลดลง 30.63% ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.21 และตารางที่ ก.30



รูปที่ 4.21 ความคงทนของ crude และ partial purified enzymes เมื่อเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

หลังจากการบดเซลล์สาหร่ายด้วยเครื่องบด เมื่อใช้ Triton X-100 เข้าช่วยสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดส พบว่า Triton X-100 เข้มข้น 0.1% ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนของสาหร่าย โดยปริมาณโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme เพิ่มขึ้น 25.20% เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้ Triton X-100 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Triton X-100 เป็น 0.15 และ 0.20% สามารถช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนออกจากเซลล์เมมเบรนได้ แต่เมื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme พบว่าปริมาณโบรโมเปอร้ออกซิเดสมีค่าคงที่ ดังนั้นการใช้ Triton X-100 มากกว่า 0.10% จึงไม่ช่วยให้ specific activity ใน crude enzyme มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งผลจากการทดลองสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Baden และ Corbett (1980) ที่สกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลสีเขียว *Pennicillus lamouroxii*, *Pennicillus capitatus* และ *Ripocephalus phoenix* โดยในขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก (cell breaking) ได้ใช้ Triton X-100 ความเข้มข้น 0.1% เพื่อเร่งการแยกตัวของโบรโมเปอร้ออกซิเดสออกจากเซลล์เมมเบรน

หลังจากการบดเซลล์สาหร่าย เมื่อใช้ sodium deoxycholate เข้าช่วยสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดส พบว่า sodium deoxycholate เข้มข้น 0.10% สามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่สกัดออกจากเซลล์ได้สูงสุด โดย specific activity ใน crude enzyme เพิ่มขึ้น 54.87% เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้ sodium deoxycholate เข้าช่วยในการสกัดเอนไซม์ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ sodium deoxycholate ขึ้นเป็น 0.15 และ 0.2% สามารถช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดออกจากเซลล์ได้ 2.07% และ 5.57% ตามลำดับ แต่เมื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme พบว่า specific activity มีค่าลดลง

จากการใช้ดีเทอร์เจนท์ทั้ง Triton X-100 และ sodium deoxycholate เข้าช่วยในการสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสออกจากเซลล์ของสาหร่าย พบว่าการใช้ดีเทอร์เจนท์ทั้งสองชนิดในปริมาณต่ำ (0.1%) มีผลต่อการดึงโบรโมเปอร้ออกซิเดสออกจากเมมเบรน โดยไม่รบกวนประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เมื่อใช้ดีเทอร์เจนท์ในปริมาณมากขึ้นพบว่ากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสลดลง อาจเป็นดีเทอร์เจนท์ทำหน้าที่ละลายเมมเบรน (dissolving membrane) และการดึงเอนไซม์ออกจากเมมเบรน ในการจับตัวระหว่างเอนไซม์กับดีเทอร์เจนท์จะเกิด hydrophobic interaction ระหว่าง tail group ของดีเทอร์เจนท์ และบริเวณ hydrophobic surface ของเอนไซม์ การเกิด hydrophobic interaction ในปริมาณมากอาจรบกวนลักษณะโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ จึงทำให้กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสลดลง (Harris และคณะ 1990)

Cantor (1982) เสนอว่าการใช้ดีเทอร์เจนท์ในปริมาณมากจะรบกวนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อ ๆ ไป เช่น การตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟต โดย Triton X-100 มักจะแยกตัวออกมาก่อนและดึงเอนไซม์ที่ต้องการออกมาพร้อมกัน จึงยากต่อการแบ่งช่วงการตกตะกอน และเสนอว่าเมื่อเอนไซม์ยึดเกาะอยู่กับ nonionic detergent แล้ว การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขั้นตอนต่อ ๆ ไป เช่น gel filtration chromatography ไม่สามารถแยกดีเทอร์เจนท์ออกจากเอนไซม์ที่ต้องการได้

จากการทำให้เซลล์แตกโดยวิธี freeze and thaw พบว่าวิธีการ freeze and thaw สามารถทำให้เซลล์แตก แต่ช่วยสกัดโบรโมเปอร้ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนได้ในปริมาณต่ำ โดยการทำให้ freeze and thaw 4, 8 และ 12 ครั้ง ทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme ได้ 0.96, 1.08 และ 1.20 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การบดเซลล์แล้วตรวจสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสได้ 5.75 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร

การทำให้เซลล์แตกโดยวิธี freeze and thaw สามารถสกัดเอนไซม์ได้ เนื่องจากเมื่อเซลล์อยู่ในสถานะที่ถูกแช่แข็งแล้วละลายกลับไปมาหลาย ๆ ครั้ง intracellular ice จะเป็นสาเหตุให้เกิด membrane leakage (Cantor, 1982) แต่ในการทำให้เซลล์แตกโดย freeze and thaw เพียงวิธีเดียว พบว่าได้ปริมาณเอนไซม์น้อยกว่าการทำให้เซลล์แตกโดยวิธีการบด อาจเป็นเพราะในการบดเซลล์นอกจากจะมีผลในการทำให้เซลล์แตกแล้ว ยังเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างสารละลายบัฟเฟอร์ และพื้นที่ผิวของ membrane leakage ซึ่งมีผลต่ออัตราการแพร่ของเอนไซม์ออกจากเมมเบรน

เมื่อบดเซลล์ร่วมกับการ freeze and thaw โดยใช้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในการแช่แข็งพบว่าการทำ freeze and thaw 4 รอบ สามารถช่วยเพิ่มปริมาณโบรโมเปอร้ออกซิเดสที่สกัดจากเซลล์ได้สูงสุด โดย specific activity ใน crude enzyme เพิ่มขึ้น 18.09% เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้ freeze and thaw เข้าช่วยในการสกัดเอนไซม์ เมื่อเพิ่มจำนวนการทำ freeze and thaw สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดออกจากเซลล์ได้ โดยเมื่อทำ freeze and thaw 12 รอบสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนได้ 16.09% แต่เมื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme พบว่า specific activity มีค่าลดลง 34.30% ดังนั้นทำให้เซลล์ *Polycarvermosa* sp. แตกโดยการบดเซลล์ร่วมกับการ freeze and thaw โดยใช้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในการแช่แข็ง จึงไม่มีความจำเป็นต้องทำ freeze and thaw มากกว่า 4 ครั้ง

Harris และคณะ (1990) เสนอว่าการทำ freeze and thaw ซ้ำ ๆ จะช่วยเพิ่มจำนวนของรอยแตกในเมมเบรนซึ่งย่อมมีผลต่อการหลุดออกของโปรตีน ในการทดลองนี้พบว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งของการทำ freeze and thaw ดังนั้นปริมาณโบรโมเปอร้ออกซิเดสจึงควรมีปริมาณเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme พบว่าการทำ freeze and thaw มากกว่า 4 รอบ ส่งผลให้กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดสใน crude enzyme ลดลง

เมื่อบดเซลล์ร่วมกับการทำ freeze and thaw โดยใช้ น้ำแข็งแห้ง ในการแช่แข็ง สาหรัยพบว่าปริมาณโปรตีนใน crude enzyme เพิ่มขึ้นตามจำนวนครั้งของการทำ freeze and thaw โดยในการทำ freeze and thaw 8 ครั้ง สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนได้ 11.01% แต่เมื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดส พบว่า specific activity ใน crude enzyme มีแนวโน้มลดลง โดยลดลง 17.50%, 39.16% และ 41.58% ในการทำ freeze and thaw 2, 4 และ 6 ครั้ง ตามลำดับ Harris และคณะ (1990) เสนอว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญในการทำ freeze and thaw และการที่เอนไซม์อยู่ในสภาวะที่ระดับอุณหภูมิต่ำมาก ๆ อาจทำให้เกิดการเสียดสภาพได้ ดังนั้นการใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็งสาหรัยอันเป็นการปรับลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว และอุณหภูมิของเซลล์สาหรัยขณะถูกแช่แข็งอยู่ในระดับต่ำมาก จึงอาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างและการทำงานของโบรมิเปอร์ออกซิเดส

เมื่อบดสาหรัยด้วยเครื่องบด แล้วนำส่วนที่เป็นกากเซลล์มาทำการ sonicate พบว่าการใช้คลื่นเสียงนาน 30 นาที สามารถเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่สกัดออกจากเซลล์ได้สูงสุด โดย specific activity ใน crude enzyme เพิ่มขึ้น 45.48% เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่ไม่ใช้ sonication เข้าช่วยในการสกัดเอนไซม์ เมื่อเพิ่มเวลาในการ sonicate สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดออกจากเซลล์ได้อีกเพียงเล็กน้อย โดยในนาที 50 ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเพียง 2.01% แต่เมื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme พบว่า specific activity มีค่าลดลง 7.06% จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการทำ sonication มีผลต่อการหลุดของโปรตีนออกจากเซลล์เมมเบรน แต่การ sonicate นานกว่า 30 นาที ทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดสนั้น อาจเป็นเพราะโมเลกุลของโบรมิเปอร์ออกซิเดสถูกทำให้ denature โดยโมเลกุลของ free radical และไอออนที่สะสมในระหว่างการ sonicate เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาในการ sonicate (Harris และคณะ 1990)

เมื่อบดเซลล์สาหรัยและปล่อยให้เกิดการแพร่ของโบรมิเปอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าใน 2 ชั่วโมงแรกปริมาณโปรตีนใน crude enzyme ลดลงจาก 0.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็น 0.23 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 6 ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme เท่ากับ 0.24 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบหากิจกรรมของโบรมิเปอร์ออกซิเดส พบว่าในเวลา 2 ชั่วโมงแรก ปริมาณโบรมิเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme ลดลงจาก 6.07 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร เป็น 4.91 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร และในชั่วโมงที่ 6 ปริมาณโบรมิเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme เท่ากับ 5.94 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ภายในเวลา 6 ชั่วโมงการแพร่เพียงอย่างเดียวไม่ทำให้ปริมาณโบรมิเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาผลของการแพร่ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเมมเบรน และผลของการกวนหลังการบดเซลล์ พบว่าการกวนนาน 6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเมมเบรนได้สูงสุด โดยค่า specific activity ของ crude enzyme เพิ่มขึ้น 57.54% เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme จากการบดเซลล์

จากผลการทดลองการทำให้เซลล์แตกแล้วปล่อยให้เกิดการแพร่โดยไม่กวน พบว่าปริมาณโบรโมเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme ลดลง 19.19% ในเวลา 2 ชั่วโมง อาจเป็นเพราะโบรโมเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme กลับเข้ามาแรกอยู่ในเซลล์เมมเบรนตามเดิม เนื่องจากโครงสร้างโบรโมเปอร์ออกซิเดสและเซลล์เมมเบรนมีความจำเพาะต่อกัน ดังข้อเสนอของ Jarvis และ Pierpoint (1989) ที่กล่าวถึงการสกัดโปรตีนจาก fiber ของพืช และสาหร่าย ว่าหลังจากการทำให้เซลล์แตกเมื่อได้ของผสมระหว่างชิ้นส่วน fiber และ crude enzyme ควรแยก fiber ออกโดยเร็ว เพื่อหลีกเลี่ยงการแทรกตัวของโปรตีนกลับคืนสู่เมมเบรน

การทำให้เซลล์แตกโดยการบดรวมกับการกวน พบว่าเป็นวิธีเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์สาหร่ายทะเลอย่างมีประสิทธิภาพ มีความสะดวกและไม่สิ้นเปลืองเวลา ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับข้อเสนอของ Harris และคณะ (1990) ที่ว่าการกวนเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ สามารถช่วยเพิ่มอัตราการสกัดเอนไซม์ออกจากเนื้อเยื่อที่มีค่า relative shear resistance ต่ำ อันได้แก่ เนื้อเยื่อพืช และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ด รา ที่ประกอบด้วย mycelial และ microfibril skeleton แต่การกวนจะไม่ได้ผลในกรณีของกลุ่มเซลล์พวก gram-positive cocci และ spore

หลังจากการตกตะกอนโปรตีน โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงการตกตะกอน 30-70% และตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ เมทานอล, เอทานอล และอะซิโตน ในช่วงการตกตะกอน 0-60%, 0-60% และ 30-70% ตามลำดับ เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme และสารละลายโปรตีนที่ได้จาก pellet พบว่าค่า degree of purification จากการตกตะกอนโดยใช้อะซิโตนมีค่าสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 4.21 การตกตะกอนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต มีค่า degree of purification เท่ากับ 1.95 การตกตะกอนโดยใช้เมทานอล และเอทานอลจะได้ degree of purification ที่ใกล้เคียงกัน คือ 0.95 และ 0.87 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, เมทานอล, เอทานอล และอะซิโตนพบว่าการตกตะกอนด้วยอะซิโตนเป็นวิธีที่ให้อัตราส่วน degree of purification สูงสุด อาจเป็นเพราะโมเลกุลของอะซิโตนเป็นโมเลกุลที่มีความยืดหยุ่น (flexibility) ในระดับต่ำ จึงไม่แทรกตัวเข้าสู่โครงสร้างภายในของโบรโมเปอร์ออกซิเดส และไม่ทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ (Cartor, 1982) และอาจเป็นไปได้ว่าในกลุ่มตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เมทานอล, เอทานอล และอะซิโตน โมเลกุลของอะซิโตนมีค่าไดอิเล็กทริกต่ำที่สุด จึงเป็น

โมเลกุลที่มีสภาพขั้วทางไฟฟ้าต่ำที่สุด (อาภัสรา ชมิตท์, 2537) โบรโมเปอร์ออกซิเดสเป็น เอนไซม์ที่แทรกตัวอยู่ในเมมเบรน จึงควรมีองค์ประกอบส่วนใหญ่แสดงคุณสมบัติเป็น hydrophobic area ดังนั้นอะซีโตนซึ่งมีสภาพขั้วทางไฟฟ้าต่ำที่สุด จึงน่าจะมีผลกระทบต่อโครงสร้างของโบรโมเปอร์ออกซิเดสน้อยกว่าเมธานอล และเอทานอล รวมถึงแอมโมเนียมซัลเฟตที่เมื่อละลายน้ำจะเกิด cation แล multi-charged anion ในปริมาณมาก และในกรณีที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นตัวทำให้เกิดการตกตะกอน Harris และคณะ (1990) เสนอว่าการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และการกวนจะทำให้แก๊สที่ละลายอยู่ใน crude enzyme รวมตัวกันเป็นกลุ่มฟองขนาดเล็ก โดยกลุ่มฟองและการกวนอาจเป็นสาเหตุให้เกิด denature ของเอนไซม์ขึ้นได้

หลังจากการทำให้สารละลายเอนไซม์จากการตกตะกอนโดยอะซีโตนบริสุทธิ์โดย ion-exchange chromatography (DEAE-Sephadex) เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหา กิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction พบว่าโบรโมเปอร์ออกซิเดสเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ใน fraction ที่ 32 และพบปริมาณของโบรโมเปอร์ออกซิเดสสูงสุดใน fraction ที่ 36 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ 5.94 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร

หลังจากทำให้สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนโดยอะซีโตนบริสุทธิ์โดย ion-exchange chromatography (DEAE-Toyopearl) เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีน และทดสอบหา กิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction พบว่าโบรโมเปอร์ออกซิเดสเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ใน fraction ที่ 30 และพบปริมาณของโบรโมเปอร์ออกซิเดสสูงสุดใน fraction ที่ 34 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ 12.24 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร

จากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย ion-exchange chromatography โดยใช้ DEAE-Sephadex และ DEAE-Toyopearl พบว่าโบรโมเปอร์ออกซิเดสเริ่มถูกสารละลายโซเดียมคลอไรด์ชะออกมาที่ความเข้มข้น 0.44 โมลาร์ และ 0.41 โมลาร์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงค่า purification fold พบว่าการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE-Toyopearl เป็น anion-exchanger ที่ให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า อาจเป็นเพราะขนาดโครงร่างตาข่ายของ dextran มีความผันแปรตาม ionic strength และความดันภายในคอลัมน์ (Harris และคณะ 1990) ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ชะผ่านคอลัมน์ จึงมีผลต่อ ionic strength ภายในคอลัมน์ รวมถึงการส่งแรงดันอย่างต่อเนื่องจาก peristaltic pump ย่อมมีผลต่อปริมาตรรวมของ โครงร่างตาข่ายของ dextran และจากการทดลองพบว่าหลังจากการชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ DEAE-Sephadex ในคอลัมน์มีปริมาตรลดลง ดังนั้นการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยใช้ DEAE-Sephadex มีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้ DEAE-Toyopearl อาจเป็นเพราะขณะที่อยู่ในคอลัมน์โบรโมเปอร์ออกซิเดสถูกตรึง และถูกบีบอัดในเวลาเดียวกัน อันเป็นสภาวะการณ์ที่ไม่พบตามธรรมชาติของเอนไซม์ ซึ่งอาจทำให้เกิดการเสียสภาพของโครงสร้างบางส่วนภายในโมเลกุลโบรโมเปอร์ออกซิเดส

เมื่อนำ partial purified enzyme ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดย DEAE-Toyopearl มาทำให้บริสุทธิ์โดย gel filtration chromatography (Sephadex G-75) เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีน และตรวจสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction พบว่าโบรโมเปอร์ออกซิเดสเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ใน fraction ที่ 13 และพบปริมาณของโบรโมเปอร์ออกซิเดสสูงสุดใน fraction ที่ 14 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ 4.26 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร

หลังจากการผ่าน partial purified enzyme ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดย DEAE-Toyopearl มาทำให้บริสุทธิ์โดย gel filtration chromatography (Biogel A-0.5 M) เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนและตรวจสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction พบว่าโบรโมเปอร์ออกซิเดสเริ่มถูกชะออกจากคอลัมน์ใน fraction ที่ 13 และพบปริมาณของโบรโมเปอร์ออกซิเดสสูงสุดใน fraction ที่ 14 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ 2.81 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร

การใช้เจลทั้งสองชนิด ให้ค่า purification fold ที่ใกล้เคียงกัน โดยเมื่อใช้ Sephadex G-75 เป็นตัวกลางในคอลัมน์ ให้ค่า purification fold เท่ากับ 14.24 ส่วนจาก Biogel A-0.5 M ให้ค่า purification fold เท่ากับ 12.14

เมื่อตรวจหาปริมาณโปรตีน พบว่าใน crude enzyme มีโปรตีน 267 ไมโครยูนิต/มิลลิลิตร และใน partial purified enzyme ที่ได้จาก Sephadex G-75 มีโปรตีน 0.002 ไมโครยูนิต/มิลลิลิตร เหตุที่ตรวจพบโปรตีนใน crude enzyme อาจเป็นเพราะการทำให้เซลล์แตก โดยการบดเพื่อสกัด membrane bound enzyme ส่งผลให้แวกิวโอลซึ่งเป็นอแกเนลที่เก็บสะสมโปรตีนเอสเกิดการฉีกขาด จึงพบโปรตีนปะปนออกมาใน crude enzyme [Harris และคณะ 1990] แต่ปริมาณโปรตีนที่พบใน partial purified enzyme อยู่ในระดับที่ต่ำมาก ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในการผลิตโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านขั้นตอนการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยการตกตะกอนด้วยอะซีโตน การทำ ion-exchange chromatography และ gel filtration chromatography จึงเป็นการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้นซึ่งสามารถลดปริมาณโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ partial purified enzyme ที่ผลิตได้จึงไม่ถูกรบกวนโดยโปรตีน หรืออาจถูกรบกวนเพียงเล็กน้อย ซึ่งมีผลต่อการเก็บเอนไซม์ การเพิ่มความคงทนต่อระดับอุณหภูมิของเอนไซม์ และสามารถประยุกต์ใช้งานต่าง ๆ ได้โดยไม่ถูกโปรตีนรบกวนโมเลกุลของเอนไซม์ [Harris และคณะ 1990]

ในการประมาณขนาดโมเลกุลโดย gel filtration chromatography พบว่าโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้มีมวลโมเลกุลประมาณ 615,000 ดาลตัน จากการศึกษาโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล *Corrallina pilulifera*, *Ceramium rubrum* และ *Laminaria saccharina* พบว่ามีขนาดโมเลกุล 790,000 ดาลตัน, 240,000 ดาลตัน และ 180,000 ดาลตัน ตามลำดับ (Itoh และคณะ, 1988; Albert และคณะ, 1989; Klenn และคณะ, 1987) โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเลที่กล่าวมาข้างต้นล้วนเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามโบรโมเปอร์ออกซิเด

สจากสาหร่ายทะเลอื่น ๆ มีขนาดเล็กถึงกลาง เช่น โบริโมเปอร์ออกซิเดสจาก *Penicillus capitatus* มีขนาดโมเลกุล 97,600 ดาลตัน (Manthey และ Hager, 1981) และโบริโมเปอร์ออกซิเดสจาก *Ascophyllum nodosum* มีขนาดโมเลกุล 90,000 ดาลตัน (Deboer และคณะ, 1986)

เมื่อศึกษาผลของโลหะไอออนชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของโบริโมเปอร์ออกซิเดส พบว่าวานาเดียมไอออน (V^{+5}) สามารถเพิ่มกิจกรรมของโบริโมเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการล้างด้วย สารละลาย EDTA และ dialysis แล้ว โบริโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จึงอาจเป็นเอนไซม์ที่มีวานาเดียมเป็น prosthetic group จากการศึกษาคูณสมบัติของโบริโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล พบว่าสาหร่ายทะเลหลายชนิดผลิตโบริโมเปอร์ออกซิเดสที่มีวานาเดียมเป็น prosthetic group เช่น *Ceramium rubrum* (Klenn และคณะ, 1987), *Laminaria saccharina* [Deboer และคณะ, 1986], *Ascophyllum nodosum* (Albert และคณะ, 1989) และ *Corallina officinalis* (Yu และ Whittaker, 1989) เป็นต้น

เมื่อศึกษาผลของปริมาณวานาเดียมต่อกิจกรรมของโบริโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้ พบว่า สารละลายวานาเดียมไอออนที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.6 มิลลิโมลาร์ มีความเหมาะสมต่อ partial purified enzyme โดยสามารถทำให้กิจกรรมของโบริโมเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น 50.98% อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของวานาเดียม พบว่ากิจกรรมของโบริโมเปอร์ออกซิเดสมีแนวโน้มคงที่การที่ partial purified enzyme ที่ผลิตได้มีกิจกรรมของโบริโมเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น หลังการเติมวานาเดียมไอออน อาจเป็นเพราะในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์หลาย ๆ ขั้นตอนทำให้โบริโมเปอร์ออกซิเดสบางส่วนสูญเสียวานาเดียม จึงมีโครงสร้างของโมเลกุลต่างไป และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ลงไปได้ การเติมวานาเดียมไอออนกลับคืนสู่โมเลกุลของเอนไซม์ จึงเป็นการ re-activate โบริโมเปอร์ออกซิเดสที่สูญเสียวานาเดียม ให้กลับมีโครงสร้างและคุณสมบัติตามเดิม (Palmer, 1995)

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของโบริโมเปอร์ออกซิเดส พบว่าเมื่อเอนไซม์อยู่ที่ระดับอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำให้ relative enzyme activity ของ crude และ partial purified enzymes ลดลง 37.92% และ 22.85% ตามลำดับ การที่ partial purified enzyme มีความคงทนต่อระดับอุณหภูมิมากกว่า crude enzyme อาจเป็นเพราะใน crude enzyme มีโปรตีนเอนไซม์ปนอยู่มาก แต่ใน partial purified enzyme ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาหลายขั้นตอน โปรตีนจึงถูกคัดแยกออกในปริมาณมาก

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นกรดและด่างต่อความคงทนของโบริโมเปอร์ออกซิเดส พบว่า crude enzyme มีความคงทนต่อสภาพความเป็นกรดและด่างที่ pH 7 ได้สูงสุด และเมื่ออยู่ในสภาวะที่ pH 4 และ 9 ในเวลา 30 นาที พบว่าประสิทธิภาพของ crude enzyme ลดลง 34.53% และ 16.48% ตามลำดับ ส่วนใน partial purified enzyme มีความคงทนต่อความเป็นกรดและด่างดีที่สุดที่ pH 6 เมื่อ partial purified enzyme อยู่ในสภาวะที่ pH 4 และ 9 ในเวลา 30

นาที่ พบว่าประสิทธิภาพของ partial purified enzyme ลดลง 10.90% และ 12.34% ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า partial purified enzyme มีแนวโน้มในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด และมีความคงทนต่อระดับอุณหภูมิที่ดีกว่า crude enzyme ดังนั้นการทำให้โบรโมเปอร์ออกซิเดสมีความบริสุทธิ์ขึ้นจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง สำหรับการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ตามสภาวะของการใช้งานต่าง ๆ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ crude และ partial purified enzymes คือ 55 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ crude และ partial purified enzyme คือที่ pH 6 เมื่อพิจารณาถึง relative enzyme activity ในการทำงานของ crude และ partial purified enzymes ที่ pH และอุณหภูมิระดับต่าง ๆ พบว่ามีค่าแตกต่างกันเล็กน้อย อาจเป็นเพราะใน crude enzymes ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่เซลล์ของสาหร่ายผลิตขึ้น เช่น โปรตีนเอส และสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ ที่อาจมีผลต่อการทำงานของโบรโมเปอร์ออกซิเดส (Jarvis, และ, 1989) แต่ partial purified enzyme ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาหลายขั้นตอน จึงเหลือสารชีวโมเลกุลอื่น ๆ เหล่านั้นในปริมาณน้อย

เมื่อศึกษาความคงทนในการเก็บเอนไซม์ พบว่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส crude และ partial purified enzymes มีกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสลดลง 47.50% และ 26.07% ตามลำดับ ภายในเวลา 40 วัน จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ไม่สมควรเก็บ crude enzyme ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากประสิทธิภาพของโบรโมเปอร์ออกซิเดสลดลงอย่างมาก อาจเป็นเพราะโปรตีนเอสที่มีใน crude enzyme สามารถย่อยสลายโบรโมเปอร์ออกซิเดสได้ แม้ว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายจะดำเนินไปอย่างช้า ๆ ก็ตาม จากการทดลองเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่า crude และ partial purified enzymes มีกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสลดลง 34.48% และ 30.63% ตามลำดับ ภายในเวลา 40 วัน

2. ข้อเสนอแนะ

2.1 ในการทำให้เซลล์แตกโดยการบด อาจศึกษาเพิ่มเติมโดยการใช้เม็ดทรายเข้าร่วมในการบด เพื่อเพิ่มอัตราการแตกของผนังเซลล์และเมมเบรน เช่น ในการทดลองของ Rush และคณะ (Rush และคณะ, 1995) ที่ทำให้เซลล์ของสาหร่ายสีแดง *Corallina officinalis* แตก โดยวิธีการบด และใช้ abrasive material เช่น เม็ดทรายเข้าร่วมในการฉีกผนังเซลล์และเมมเบรนในขั้นตอนการบดเซลล์ และในขั้นตอนการใช้ stirrer เข้าร่วมกวนหลังการทำให้เซลล์แตก อาจพัฒนาให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น โดยการใช้ bead เข้าร่วมในการกวน เพราะโดยทั่วไปแล้ว bead จะช่วยเร่งการแตกของผนังเซลล์ และเร่งการแพร่ของเอนไซม์ออกจากเมมเบรน (Cartor, 1982) ดังนั้นในการศึกษาเพิ่มเติมทั้ง 2 กรณี อาจใช้ข้อมูลอันเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพใน

การสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์ของสาหร่ายเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุด อันมีผลต่อการลดค่าใช้จ่ายในการขนส่ง ลดพื้นที่ และพลังงานที่ใช้ในการเก็บสาหร่าย

2.2 ในการตกตะกอน crude enzyme โดยอะซีโตน เป็นขั้นตอนที่ต้องใช้อะซีโตนในปริมาณมาก อาจทดลองใช้อะซีโตนที่มีคุณภาพในระดับ commercial grade ในการตกตะกอนเพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิต

2.3 ในการนำโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้ไปประยุกต์ใช้ อาจเพิ่มกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสโดยการ treat ด้วยสารละลายวานาเดียมไอออนความเข้มข้นสุดท้าย 0.6 มิลลิโมลาร์ หากว่าวานาเดียมไม่เป็นอุปสรรคต่อการใช้งานประเภทนั้น ๆ

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนภาชน์ ลีวมนอนต์, 2527, **สาหร่าย Algae**, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 32.
- วิวรรณ สิงห์ทิวศักดิ์, 2537, **ผลของความเข้มแสงและความเค็มที่มีต่อการงอกของคาร์โปสปอร์ สาหร่ายเขากวาง *Gacilaria changii***, เอกสารวิชาการฉบับที่ 13/2539 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี กรมประมง, หน้า 10-23.
- บุญเกียรติ แซ่ตั้ง, 2535, **การประยุกต์ใช้ไบรโมเปอร์ออกซิเดสร่วมกับกลูโคออกซิเดสในการหาปริมาณกลูโคส**, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล, หน้า 92-102.
- เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2530 “เทคนิคในการเตรียมเอนไซม์” การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยมหิดล เรื่องเอนไซม์และการประยุกต์ใช้, วันที่ 12-15 พฤษภาคม 2530 กรุงเทพมหานคร, หน้า 43-50.
- อภัสรา ชมิดทัม, 2537, **คู่มือทางชีวเคมี**, สำนักพิมพ์สหมิตร, หน้า 90-91.
- Ahern, J.T., Allan, G.G. and Medcaff, D.G., 1980 , “New bromoperoxidase of marine origin partial purification and characterization”, **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 616, pp. 329-339.
- Albert, J.M., Deboer, E., Gamer, C.D., Hasnain, S.S. and Wever, R., 1989, “Vanadium K-edge x-ray absorption spectroscopy of bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*”, **Biochemistry**, Vol. 28, pp. 7968-7973.
- Alexander, N.M., 1959, “Iodine Peroxidase in Rat Thyroid and salivary glands and its inhibition by antithyroid compounds”, **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 234, pp. 1530-1533.
- Almeida, M., Filipe, S., Humanes, M., Maia, M.F., Melo, R., Severino, N., Da Silva, J.A., Frau’sto da Silva, J.J. and Wever, R., 2001, “Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family”, **Phytochemistry**, Vol. 57, pp. 633-642.
- Almeida, M., Humanes, M., Melo, R., Silva, J. A., Dasilva, J.J.R.F., Vilter, H. and Wever, R., 1998, “*Saccorhiza polyschides* a new source for vanadium-dependent haloperoxidase,” **Phytochemistry**, Vol. 48, pp. 229-239.
- Baden, D.G. and Corbett, M.D., 1979, “Peroxidases produced by the marine sponge *Iotrochota birotulata*”, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, Vol. 64, pp. 279-283.

- Baden, D.G. and Corbett, M.D., 1980, "Bromoperoxidase from *Penicillium capitatus*, *Penicillium lomourouxii* and *Rhipocephalus phoenix*", **Biochemical Journal**, Vol. 187, pp. 205-211.
- Barnett, P., Hemrika, W., Dekker, H.L., Muijsers, A.O., Renirie, R. and Wever, R., 1998, "Isolation, characterization and primary structure of the vanadium-choloperoxidase from fungus *Embellisia didymospora*", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 273, pp. 23381-23387
- Beissner, R.S., Guilford, W. J., Coates, R.M. and Hager, L.P., 1981, "Synthesis of brominated heptanones and bromoform by a bromoperoxidase of marine origin", **Biochemistry**, Vol. 20, pp. 3724-3731.
- Burkholderr, P.R., Pfister, R.M. and Leitz, F.H., 1966, "Production of a pyrrol antibiotic by a marine bacterium", **Applied Microbiology**, Vol. 14, pp. 649-653.
- Carlson, M.G., Peterson, C.G. and Venge, P., 1985, "Human eosinophil peroxidase purification and characterization", **American Journal of Immunology**, Vol. 134, pp. 1875-1879.
- Carter, J.N., Beatty, K.E., Simpson, M.T. and Butler, A.J., 2002, "Reactivity of recombinant and mutant vanadium bromoperoxidase from the red alga *Corallina officinalis*", **Journal of Inorganic Biochemistry**, Vol. 91, pp. 59-69.
- Cartor, C.R., 1982. Protein Purification, New York, Donnelly and Sons, pp. 29-37.
- Chen, C.-M., Lin, L.-C. and Yen, G.-G., 1994, "Relationship between changes in biogenic amine contents and freshness of pork during storage at different temperatures", **Journal of Chinese Agricultural and Chemistry Society**, Vol. 32, pp. 47-60.
- De Boer, E., Van Kooyk, Y., Tromp, M.G.M., Plat, H. and Wever, R., 1986, "Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*: a novel class of enzymes containing vanadium as a prosthetic group?", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 869, pp. 48-53.
- Deboer, E., Boon, K. and Wever, R., 1988, "Electron paramagnetic resonance studies on conformational states and metal ion exchange properties of vanadium bromoperoxidase", **Biochemistry**, Vol. 27, pp. 1629-1635.
- Deboer, E., Tromp, M.G.M., Plat, H., Klenn, G.E. and Wever, R., 1986, "Vanadium as an essential element for haloperoxidase activity in marine brown algae: purification and characterization of a vanadium containing bromoperoxidase from *Laminaria sacchrina*", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 872, pp. 104-115.

- Deboer, E., Franssen, M.C.R., Van Der Plas, H.C., Plat, H. and Wever, R., 1987, "Vanadium containing bromoperoxidase: an example of an oxidoreductase with high operation stability in aqueous or organic media", **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 30, pp. 607-610.
- Deits, T.M., Farance, M. and Kae, E.S., 1984, "Purification and properties of ovoperoxidase, the enzyme responsible for hardening the fertilization membrane of sea urchin egg", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 259, pp. 13525-13533.
- Dembitsky, V.M., 2003, "Oxidation, epoxidation and sulfoxidation reactions catalysed by haloperoxidases", **Tetrahedron**, Vol. 59, pp. 4701-4720.
- Everett, R.R., Kanofsky, J.R. and Butler, A., 1990, "Mechanistic investigation of the novel non-heme vanadium bromoperoxidase: evidence for singlet oxygen formation", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 265, pp. 4908-4914.
- Fenical, W., 1974, "Polyhaloketone from the red seaweed *Asparagopsis taxiformis*", **Tetrahedral Letters**, Vol. 51, pp. 4463-4466.
- Fenical, W., 1982, "Natural product chemistry in the marine environment", **Science**, Vol. 215, pp. 923-928.
- Fonong, T. and Rechitz, G.A., 1984, "Homogenous potentiometric enzyme immunoassay for human immunoglobulin-G", **Analytical Chemistry**, Vol. 56, pp. 2586-2590.
- Hager, L.P., 1982, "Mother nature like some halogenate compounds", **Basic Life Science**, Vol. 19, pp. 415-429.
- Hara, I. and Sakurai, T., 1998, "Isolation and characterization of vanadium bromoperoxidase from a marine macroalga, *Ecklonia stolonifera*", **Journal of Inorganic Biochemistry**, Vol. 72, pp. 23-28.
- Harris, E.L.V., Angal, S. and Whittington, P.N., 1990. Protein Purification Method, New York, Oxford University Press, pp. 93-95.
- Hewson, W.D., 1980, "Bromoperoxidase and halogenated lipids in marine algae", **Journal of Phycology**, Vol. 16, pp. 340-345.
- Isupov, M.N., Dalby, A.R., Brindley, A.A., Izumi, Y., Tanabe, T., Murshudov, G. N. and Littlechild, J. A., 2000, "Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*", **Journal of Molecular Biology**, Vol. 299, pp. 1035-1049.

- Itoh, N., Izumi, Y. and Yamada, H., 1985, "Purification of bromoperoxidase from *Corallina pilulifera*", **Biochemical and Biophysical Research Communication**, Vol. 131, pp. 425-428.
- Itoh, N., Sasaki, H., Shibata M.S. and Miura, J., 1996, "Bromoperoxidase in *Corallina pilulifera* is regulated by its vanadate content", **Phytochemistry**, Vol. 42, No. 2, pp. 277-281.
- Itoh, N., Izumi, Y. and Yamada, H., 1987, "Haloperoxidase-catalyzed halogenation of nitrogen containing aromatic heterocycle represented by nucleic base biochemistry", **Biochemistry**, Vol. 26, pp. 282-289.
- Itoh, N., Izumi, Y. and Yamada, H., 1988, "Substrate specificity, regiospecificity and stereospecificity of halogenation reactions catalyzed by non heme type bromoperoxidase of *Corallina pilulifera*", **European Journal of Biochemistry**, Vol. 172, pp. 477-484.
- Jannum, R. and Coe, L.E., 1987, "Bromoperoxidase from the Marine Snail, *Murex trunculus*", **Journal of General Microbiology**, Vol. 88, pp. 917-922.
- Jarvis, L. and Pierpoint, W.S., 1989. "Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Analysis of the Vanadium-Dependent Haloperoxidase from *Corallina officinalis*," **FEBS Letters**, Vol. 359, pp. 244-246.
- Jordan, P. and Vilter, H., 1991, "Extraction of proteins from material rich in anionic mucilages : partition and fractionation of vanadate-dependent bromoperoxidase from the brown algae *Laminaria digitata* in aqueous polymer two-phase system", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 1073, pp. 98-106.
- Kawanami, T., Miyakoshi, M., Dairi, T. and Itoh, N., 2002, "Reaction mechanism of the Co^{2+} -activated multifunctional bromoperoxidase-esterase from *Pseudomonas putida* IF-3", **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Vol. 398, pp. 94-100.
- Klenn, G.E., Plat, H. and Wever, R., 1987, "The Bromoperoxidase from the red Algae *Ceramium rubrum* also containing vanadium as prosthetic group", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 912, pp. 287-291.
- Klenn, G.E., Plat, H. and Wever, R., 1988, "Purification and some characteristics of a non-heme bromoperoxidase from *Streptomyces aureofaciens*", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 952, pp. 255-260.
- Klibanov, A.M., Tu, T.M. and Scott, K.P., 1983, "Peroxidase catalyzed removal of phenol from coal conversion waste water", **Science**, Vol. 221, pp. 259-261.

- Klifbanov, A.M. and Morris, M.D., 1981, "Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 3, pp. 119-122.
- Krenn, B.E., Plat, H. and Wever, R., 1987, "The bromoperoxidase from the red alga *Ceramium rubrum* also contains vanadium as a prosthetic group", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol., 912, pp. 287-291.
- Krenn, B.E., Plat, H. and Wever, R., 1988, "Purification and some characteristics of a non-haem bromoperoxidase from *Streptomyces aureofaciens*", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 952, pp. 255-260.
- Krenn, B.E., Izumi, Y., Yamada, H. and Wever, R., 1989, "A comparison of different (vanadium) bromoperoxidases; the bromoperoxidase from *Corallina pilulifera* is also a vanadium enzyme", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 998, pp. 63-68.
- Lambeir, A.M. and Dunford, H.B., 1983, "A steady state kinetic analysis of the reaction of chloroperoxidase with peracetic acid, chloride and 2-chlorodimedone", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 258, pp. 13558-13563.
- Littlechild, J. and Garcia-Rodriguez, E.E., 2003, "Structural studies on the dodecameric vanadium bromoperoxidase from *Corallina* species", **Coordination Chemistry Reviews**, Vol. 237, pp. 65-76.
- Morris, D.R. and Hager, L.P., 1986, "Chloroperoxidase, isolation and properties of the crystalline glycoprotein", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 241, pp. 1763-1768.
- Manthey, J.A. and Hager, L.P., 1981, "Purification and property of bromoperoxidase from *Penicillium capitatus*", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 256, pp. 11232-11238.
- Manthey, J.A. and Hager, L.P., 1989, "Characterization of the catalytic properties of bromoperoxidase", **Biochemistry**, Vol. 28, pp. 3052-3057.
- Manthey, J.A., Hager, L.P. and McElvany, K.D., 1984, "Protein bromination by bromoperoxidase from *penicillium capitatus*", **Method in Enzymology**, Vol. 107, pp. 439-445.
- Marshall, V.M.E. and Reiter, B., 1980, "Comparison of the antibacterial activity of the hypothiocyanite anion towards *Streptococcus lactis* and *Escherichia coli*", **Journal of General Microbiology**, Vol. 120, pp.513-516.
- McConnel, O.T. and Fenocal, W., 1980, "Halogenation chemistry of the red algae *Bonnemaisonia* sp.," **Phytochemistry**, Vol. 19, pp. 233-247.

- Messerschmide, A. and Wever, R., 1996, "X-ray structure of a vanadium-containing enzyme from the fungus *Curvularia inaequalis*," **Biochemistry**, Vol. 93, pp. 392-396.
- Mickelson, M.N., 1979, "Antibacterial action of lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogenperoxide on *Streptococcus agalactiae*", **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 38, pp.821-826.
- Mottola, H.A., Simpson, B.E. and Gorin, G., 1970, "Absorbtionmetric determination of hydrogen peroxidase in submicrogram amounts with leuco crystal violet and peroxidase as catalyst", **Analytical Chemistry**, Vol. 42, pp. 410-411.
- Neidleman, S.L., 1980, "Use of enzymes as a catalytic for alkene oxide production", **Hydrocarbon Processing**, Vol. 35, pp.135-138.
- Neidleman, S.L. and Geigert, J., 1986, **Bioloalogenation : principle basic roles and application**, New York, John Wiley & Son, p. 295.
- Nichol, A.W., Angel, L. A., Moon, T. and Clezy, P. S., 1987, "Lactoperoxidase heam, an iron-porphyrin thiol", **Biochemical Journal**, Vol. 247, pp. 147-150.
- Ohshiro, T., Nakano, S., Takahashi, Y., Suzuki, Y. and Izumi, Y., 1999, "Occurrence of bromoperoxidase in the marine green macro-alga, *ulvella lens*, and emission of volatile brominated methane by the enzyme", **Phytochemistry**, Vol. 52, pp. 1211-1215.
- Paice, M.G. and Jurasek, L., 1984, "Peroxidase-catalized colour removal from bleach plant effluent", **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 26, pp. 477-480.
- Palmer, T., 1995, *Understanding Enzyme*, London, Ellis Horwood Limited, pp. 202-206.
- Pedersen, M., 1973, "Identification of a cytokinin, 6-(3-methyl-2-butenylamino) purine in sea water and the effects of cytokinins on brown algae", **Physiology Plant**. Vol. 28, pp. 101-105.
- Plat, H., Krenn, E.B. and Wever, R., 1987, "The Bromoperoxidase from the lichen *Xanthoria parietina* is a vanadium enzyme", **Biochemical Journal**, Vol. 248, pp. 277-279.
- Rorrer, G.L., Tucker, M.P., Cheney, D.P. and Maliakal, S., 2001, "Bromoperoxidase activity in microplantlet suspension cultures of the macrophytic red alga *Ochtodes secundiramea*", **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 74, pp. 389-395.
- Shang, M., Okuda, R.K. and Worthen, D. (1994), "Bromination of phenol using and algal bromoperoxidase," **Phytochemistry**, Vol. 37, pp. 307-310.

- Shannon, L.M., Kay, E. and Lew, J.Y., 1966, "Peroxidase isoenzyme from horseradish root", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 264, pp. 22166-22172.
- Sheffield, D.J., Harry, T., Smith, A.J. and Rogers, L.J., 1992, "Purification and characterization of the vanadium bromoperoxidase from the macroalga *Corallina officinalis*," **Phytochemistry**, Vol. 32, pp. 21-26.
- Sheikh, Y.M. and Djerassi, C., 1975, "2,6-Dibromophenol and 2,4,6-tribromophenols antiseptic secondary metabolites of *Phoronopsis viridis*", **Experientia**, Vol. 31, pp. 265-266.
- Shimonishi, M., Kuwamoto, S., Inoue, H., Wever, R., Ohshiro, T., Izumi, Y. and Tanabe, T., 1998, "Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macro-alga, *Corallina pilulifera*", **FEBS Letters**, Vol. 428, pp. 105-110.
- Soedjak, H.S. and Butler, A., 1991, "Mechanism of dioxygen formation catalyzed by vanadium bromoperoxidase from *Macrocystis pyrifera* and *Fucus distichus*: steady state kinetic analysis and comparison to the mechanism of V-BrPO from *Ascophyllum nodosum*", **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 1079, pp. 1-7.
- Tanaka, N., Dumay, V., Liao, Q., Lange, A.J. and Wever, R., 2002, "Bromoperoxidase activity of vanadate-substituted acid phosphatases from *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica* ser. *Typhimurium*", **European Journal of Biochemistry**, Vol. 269, pp. 2162-2167.
- Theiler, R., Cock, J.C. and Hager, L.P., 1978, "Halohydrocarbon synthesis by bromoperoxidase", **Science**, Vol. 202, pp. 1094-1096.
- Van Pee, K.H. and Lingen, F., 1987, "Purification of bromoperoxidase from *Pseudomonas aureofaciens*", **Journal of Bacteriology**, Vol. 161, pp. 1171-1175.
- Vilter, H., 1984, "Peroxidase from *Phaeophyceae*: a vanadium (V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*", **Phytochemistry**, Vol. 23, pp. 1387-1390.
- Vanpee, K.H., Sury, G. and Lingen, F., 1987, "Purification and property of a non-heme bromoperoxidase from *Streptomyces aureofaciens*", **Journal of Biological Chemistry**, Vol. 368, pp. 1225-1232.
- Vanpee, K.H. and Lingen, F., 1987, "Purification of bromoperoxidase from *Pseudomonas aureofaciens*", **Journal of Bacteriology**, Vol. 161, pp. 1171-1175.
- Vanpee, K.H. and Lingen, F., 1985, "Purification and molecular and catalytic properties of bromoperoxidase from *Streptomyces phaeochromogenes*", **Journal of General Microbiology**, Vol. 131, pp. 1911-1916.

- Vanpee, K.H., 1988, "Molecular cloning and high-level expression of a bromoperoxidase gene from *Streptomyces aureofaciens*," **Journal of Bacteriology**, Vol. 170, pp. 5890-5894.
- Vilter, H., 1984, "Peroxidase from *Phaeophyceae*: a vanadium (V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*", **Phytochemistry**, Vol. 23, pp. 1387-1390.
- Veokeki, B., 1988, **Bromoperoxidase in Thai seaweeds**, Master of science Thesis, Biochemistry Program, Mahidol University, pp. 43-63.
- Weng, M, Pfeifer, O.T., Krauss, S.S., Lingess, F. and Vanpee, K.H. 1991. "Purification, characterization and comparison of two non-heme bromoperoxidase from *Streptomyces aureofaciens* ATCC 10762," **Journal of General Microbiology**, Vol. 137, pp. 2539-2546.
- Wever, R. and Tromp, M.G.M., 1991, "Structure and function of vanadium bromoperoxidases", **Journal of Inorganic Biochemistry**, Vol. 43, p. 404.
- Weyand, M., Hecht, H.J., Kieß, M., Liaud, M.F., Vilter, H. and Schomburg, D., 1999, "X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution", **Journal of Molecular Biology**, Vol. 293, pp. 595-611.
- Yamada, H., Itoh, N., Murakami, S. and Izumi, Y. 1985, "New bromoperoxidase from *Corallina* algae that brominates phenol compounds", **Agricultural and Biological Chemistry**, Vol. 49, pp. 2961-2967.
- Yu, H. and Whittaker, J.W., 1989, "Vanadate activation of bromoperoxidase from *Corallina officinalis*", **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 160, pp. 87-92.
- Zeiner, R., Van Pee, K.H. and Lingens, F., 1988, "Purification and partial characterization of multiple bromoperoxidase from *Streptomyces griseus*", **Journal of General Microbiology**, Vol. 134, pp. 3141-3149.

ภาคผนวก ก.

ตารางผนวก

ตารางที่ ก.1 ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยการบดรวมกับการใช้ Triton X-100

Triton X-100 (%, v/v)	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
0.00	0.35	5.89	16.62
0.05	0.38	6.53	17.26
0.10	0.43	7.38	17.34
0.15	0.53	7.36	13.88
0.20	0.56	7.33	13.18

ตารางที่ ก.2 ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยการบดรวมกับการใช้ sodium deoxycholate

sodium deoxycholate (%, w/v)	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
0.00	0.37	5.75	15.68
0.05	0.41	7.89	19.23
0.10	0.42	10.11	24.29
0.15	0.42	8.01	18.86
0.20	0.44	7.65	17.42
0.25	0.47	6.80	14.53
0.30	0.47	6.56	14.02

ตารางที่ ก.3 ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยวิธี freeze and thaw

freeze and thaw (ครั้ง)	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
0	0.05	0.92	18.48
2	0.05	0.96	18.23
4	0.06	0.96	16.43
6	0.06	1.08	17.63
8	0.07	1.08	16.11
10	0.07	1.20	16.49
12	0.09	1.20	13.77

ตารางที่ ก.4 ผลของการบดเซลล์ร่วมกับวิธี freeze and thaw โดยใช้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในการแช่แข็ง

Freeze and thaw (ครั้ง)	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
0	0.25	5.53	21.74
2	0.26	6.61	25.64
4	0.27	6.94	25.68
6	0.28	6.17	22.05
8	0.28	5.30	18.71

ตารางที่ ก.5 ผลของการบดเซลล์ร่วมกับวิธี freeze and thaw โดยใช้ น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็ง

Freeze and thaw (ครั้ง)	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
0	0.27	6.04	22.71
2	0.27	5.10	18.75
4	0.28	3.92	13.82
6	0.29	3.92	13.28
8	0.30	4.09	13.62

ตารางที่ ก.6 ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยการบดเซลล์ร่วมกับวิธี sonication

Sonication (นาที)	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
0	0.32	6.42	19.83
10	0.47	11.38	24.47
20	0.48	12.29	25.78
30	0.49	14.17	28.85
40	0.50	14.43	29.04
50	0.50	14.50	28.86

ตารางที่ ก.7 ผลของการแพร่โบรโมเปอร์ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนหลังการบดเซลล์

เวลา (ชั่วโมง)	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
0	0.35	6.07	17.23
2	0.23	4.91	21.21
4	0.23	5.69	24.26
6	0.24	5.94	25.06
8	0.24	6.33	26.38
10	0.24	6.85	28.54
12	0.25	6.92	27.18

ตารางที่ ก.8 ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากเซลล์โดยวิธีการบดเซลล์ร่วมกับการกวน

เวลา (ชั่วโมง)	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
0	0.37	6.34	17.26
2	0.49	9.90	20.16
4	0.50	12.82	25.79
6	0.54	14.70	27.21
8	0.56	14.76	26.21
10	0.57	15.02	26.53
12	0.57	15.21	26.60

ตารางที่ ก.9 ผลของการตกตะกอน crude enzyme ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

Percent saturation range	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
0 – 30	1.14	2.69	2.36
30 – 70	0.99	43.68	43.91
supernatant	0.21	0.00	0.00

ตารางที่ ก.10 ผลของการตกตะกอน crude enzyme ด้วยอะซีโตน

Percent saturation range	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
0 – 30	0.02	0.04	2.19
30 – 70	0.99	94.30	94.80
supernatant	0.68	0.00	0.00

ตารางที่ ก.11 ผลของการตกตะกอน crude enzyme ด้วยเมธานอล

Percent saturation range	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร้ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)
0 – 60	2.12	41.01	19.30
supernatant	2.50	1.05	0.42

ตารางที่ ก.12 ผลของการตกตะกอน crude enzyme ด้วยเอทานอล

Percent saturation range	โปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	โบรโมเปอร้ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)	Specific activity (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)
0 – 60	2.59	45.85	17.67
supernatant	2.15	2.41	1.12

ตารางที่ ก.13 ค่า OD₂₈₀ และกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction ที่ผ่านการแยก
ด้วย DEAE-Sephadex

Fraction number (4 มิลลิลิตร)	OD ₂₈₀	โบรโมเปอร์- ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Fraction number (4 มิลลิลิตร)	OD ₂₈₀	โบรโมเปอร์- ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
1	0.008	0	25	0.008	0
2	0.011	0	26	0.009	0
3	0.017	0	27	0.013	0
4	0.010	0	28	0.014	0
5	0.002	0	29	0.002	0
6	0.005	0	30	0.024	0
7	0.012	0	31	0.054	0
8	0.016	0	32	0.104	1.40
9	0.014	0	33	0.111	3.98
10	0.015	0	34	0.095	4.22
11	0.011	0	35	0.102	4.76
12	0.011	0	36	0.094	5.94
13	0.024	0	37	0.068	3.59
14	0.021	0	38	0.054	1.48
15	0.018	0	39	0.006	0.93
16	0.017	0	40	0.005	0.11
17	0.016	0	41	0.009	0
18	0.020	0	42	0.009	0
19	0.008	0	43	0.005	0
20	0.013	0	44	0.014	0
21	0.023	0	45	0.029	0
22	0.020	0	46	0.036	0
23	0.020	0	47	0.038	0
24	0.025	0	48	0.034	0

ตารางที่ ก.13 (ต่อ) ค่า OD₂₈₀ และกิจกรรมของโบริโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction ที่ผ่าน
การแยกด้วย DEAE-Sephadex

Fraction number (4 มิลลิลิตร)	OD ₂₈₀	โบริโมเปอร์- ออกซิเดส (มิลลิวินาที/มิลลิลิตร)
49	0.029	0
50	0.007	0
51	0.006	0
52	0.005	0
53	0.011	0
54	0.020	0
55	0.017	0
56	0.017	0
57	0.016	0
58	0.014	0
59	0.014	0
60	0.007	0
61	0.009	0
62	0.014	0
63	0.021	0
64	0.014	0
65	0.010	0
66	0.012	0
67	0.008	0
68	0.017	0
69	0.012	0
70	0.004	0

ตารางที่ ก.14 ค่า OD₂₈₀ และกิจกรรมของโบริโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction ที่ผ่านการแยกด้วย DEAE-Toyopearl

Fraction number (4 มิลลิลิตร)	OD ₂₈₀	โบริโมเปอร์- ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)	Fraction number (4 มิลลิลิตร)	OD ₂₈₀	โบริโมเปอร์- ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)
1	0.001	0	25	0.004	0
2	0.008	0	26	0.005	0
3	0.015	0	27	0.016	0
4	0.013	0	28	0.018	0
5	0.007	0	29	0.002	0
6	0.012	0	30	0.071	0.27
7	0.014	0	31	0.113	3.47
8	0.020	0	32	0.113	8.25
9	0.023	0	33	0.115	11.45
10	0.030	0	34	0.110	12.24
11	0.027	0	35	0.110	11.34
12	0.038	0	36	0.100	10.01
13	0.023	0	37	0.071	4.37
14	0.020	0	38	0.043	0.73
15	0.013	0	39	0.002	0.66
16	0.005	0	40	0.011	0
17	0.010	0	41	0.014	0
18	0.005	0	42	0.014	0
19	0.008	0	43	0.009	0
20	0.011	0	44	0.014	0
21	0.013	0	45	0.026	0
22	0.015	0	46	0.043	0
23	0.009	0	47	0.040	0
24	0.006	0	48	0.040	0

ตารางที่ ก.14 (ต่อ) ค่า OD₂₈₀ และกิจกรรมของโบริโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction ที่ผ่าน
การแยกด้วย DEAE-Toyopearl

Fraction number (4 มิลลิลิตร)	OD ₂₈₀	โบริโมเปอร์- ออกซิเดส (มิลลิวินาที/มิลลิลิตร)
49	0.027	0
50	0.009	0
51	0.008	0
52	0.010	0
53	0.015	0
54	0.026	0
55	0.024	0
56	0.026	0
57	0.018	0
58	0.014	0
59	0.017	0
60	0.011	0
61	0.014	0
62	0.023	0
63	0.029	0
64	0.012	0
65	0.009	0
66	0.009	0
67	0.014	0
68	0.022	0
69	0.005	0
70	0.003	0

ตารางที่ ก.15 ค่า OD₂₈₀ และกิจกรรมของโบริโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction ที่ผ่านการแยก
ด้วย Sephadex G-75

Fraction number (2 มิลลิลิตร)	OD ₂₈₀	โบริโมเปอร์- ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Fraction number (4 มิลลิลิตร)	OD ₂₈₀	โบริโมเปอร์- ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
1	0.003	0	21	0.010	0
2	0.002	0	22	0.016	0
3	0.002	0	23	0.013	0
4	0.002	0	24	0.014	0
5	0.004	0	25	0.012	0
6	0.005	0	26	0.013	0
7	0.006	0	27	0.013	0
8	0.008	0	28	0.012	0
9	0.008	0	29	0.011	0
10	0.004	0	30	0.011	0
11	0.004	0	31	0.006	0
12	0.010	0	32	0.006	0
13	0.016	0	33	0.008	0
14	0.017	0	34	0.006	0
15	0.012	0	35	0.005	0
16	0.010	0	36	0.004	0
17	0.003	0	37	0.002	0
18	0.006	0	38	0.004	0
19	0.007	0	39	0.003	0
20	0.011	0	40	0.003	0

ตารางที่ ก.16 ค่า OD₂₈₀ และกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction ที่ผ่านการแยก
ด้วย Biogel A-0.5 M

Fraction number (2 มิลลิลิตร)	OD ₂₈₀	โบรโมเปอร์- ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)	Fraction number (4 มิลลิลิตร)	OD ₂₈₀	โบรโมเปอร์- ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)
1	0.046	0	26	0.095	0
2	0.032	0	27	0.129	0
3	0.023	0	28	0.175	0
4	0.017	0	29	0.154	0
5	0.012	0	30	0.143	0
6	0.008	0	31	0.140	0
7	0.015	0	32	0.086	0
8	0.015	0	33	0.045	0
9	0.005	0	34	0.048	0
10	0.018	0	35	0.025	0
11	0.008	0	36	0.036	0
12	0.040	0	37	0.049	0
13	0.061	226	38	0.034	0
14	0.040	2.81	39	0.030	0
15	0.082	267	40	0.021	0
16	0.120	2.14	41	0.015	0
17	0.091	1.51	42	0.084	0
18	0.083	1.03	43	0.120	0
19	0.082	0.67	44	0.087	0
20	0.071	0	45	0.024	0
21	0.040	0	46	0.022	0
22	0.054	0	47	0.000	0
23	0.041	0	48	0.000	0
24	0.043	0	49	0.006	0
25	0.055	0	50	0.000	0

ตารางที่ ก.17 การตรวจวัดปริมาณโปรตีนใน crude และ purified enzymes

ตัวอย่างเอนไซม์	การดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร
Crude enzyme	0.22
Partial purified enzyme	0.01

ตารางที่ ก.18 Distribution coefficient ของ fraction ลำดับต่าง ๆ เมื่อใช้ Sephadex G-75 ในการ
หาขนาดโมเลกุล

Fraction	Distribution coefficient	Fraction	Distribution coefficient
8	0.08	45	2.92
9	0.15	46	3.00
10	0.23	47	3.08
11	0.31	48	3.15
12	0.38	49	3.23
13	0.46	50	3.31
14	0.54	51	3.38
15	0.62	52	3.46
16	0.69	53	3.54
17	0.77	54	3.62
18	0.85	55	3.69
19	0.92	56	3.77
20	1.00	57	3.85
21	1.08	58	3.92
22	1.15	59	4.00
23	1.23	60	4.08
24	1.31	61	4.15
25	1.38	62	4.23
26	1.46	63	4.31
27	1.54	64	4.38
28	1.62	65	4.46
29	1.69	66	4.54
30	1.77	67	4.62
31	1.85	68	4.69
32	1.92	69	4.77
33	2.00	70	4.85
34	2.08	71	4.92
35	2.15	72	5.00
36	2.23	73	5.08
37	2.31	74	5.15
38	2.38	75	5.23
39	2.46	76	5.31
40	2.54	77	5.38
41	2.62	78	5.46
42	2.69	79	5.54
43	2.77	80	5.62
44	2.85		

ตารางที่ ก.19 ผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของ partial purified enzyme

ไอออนโลหะ (1 มิลลิโมลาร์)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)
ไม่ได้เติม	2.62
Dialyzed enzyme	1.15
K^+	1.07
Mg^{2+}	0.95
V^{5+}	3.09
Mn^{2+}	1.12
Fe^{3+}	0.99
Co^{2+}	1.12
Ni^{2+}	0.82
Cu^{2+}	0.99
Zn^{2+}	0.97

ตารางที่ ก.20 ผลของความเข้มข้นวานาเดียมไอออนต่อกิจกรรมของ partial purified enzyme

วานาเดียม (มิลลิโมลาร์)	โบรโมเปอร์ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)
0.0	2.64
0.2	3.16
0.4	3.74
0.6	3.97
0.8	3.99
1.0	3.99

ตารางที่ ก.21 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของ crude enzyme

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	โบรโมเปอร้ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)	Relative enzyme activity (%)
30	5.43	100.00
40	4.52	83.19
50	3.37	62.08
55	1.27	23.37
60	0.00	0.00
70	0.00	0.00

ตารางที่ ก.22 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของ partial purified enzyme

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	โบรโมเปอร้ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)	Relative enzyme activity (%)
30	2.51	100.00
40	1.96	77.71
50	1.94	77.15
55	0.80	31.73
60	0.48	19.20
70	0.00	0.00

ตารางที่ ก.23 ผลของความเป็นกรดและต่างต่อความคงทนของ crude enzyme

ชนิดของบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์)	กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)					
	pH					
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
อะซีเตท บัฟเฟอร์	3.58	4.15	4.62	-	-	-
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	-	-	5.01	5.94	5.30	-
Tris-HCl บัฟเฟอร์	-	-	-	-	5.11	4.79
Relative enzyme activity (%)	65.47	75.87	84.38	100.00	89.19	83.52

- = ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูล

ตารางที่ ก.24 ผลของความเป็นกรดและต่างต่อความคงทนของ partial purified enzyme

ชนิดของบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์)	กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส (มิลลิวินิต/มิลลิลิตร)					
	pH					
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
อะซีเตท บัฟเฟอร์	2.16	2.35	2.42	-	-	-
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	-	-	2.62	2.60	2.41	-
Tris-HCl บัฟเฟอร์	-	-	-	-	2.33	2.22
Relative enzyme activity (%)	89.10	97.08	100.00	99.21	92.06	87.66

ตารางที่ ก.25 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude enzyme

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	โบรโมเปอร้ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)	Relative enzyme activity (%)
30	5.93	60.35
40	7.11	72.33
50	9.22	93.88
55	9.83	100.00
60	7.99	81.36
70	1.37	13.91

ตารางที่ ก.26 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ partial purified enzyme

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	โบรโมเปอร้ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)	Relative enzyme activity (%)
30	2.63	51.96
40	3.27	64.68
50	4.85	95.76
55	5.06	100.00
60	4.28	84.46
70	0.77	15.22

ตารางที่ ก.27 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อการทำงานของ crude enzyme

ชนิดของบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์)	กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)					
	pH					
	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
อะซิเตท บัฟเฟอร์	1.93	4.25	5.50	5.89	-	-
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	-	-	-	5.89	5.28	3.98
Relative enzyme activity (%)	32.85	72.23	93.44	100.00	88.36	66.52

- = ไม่ได้วิเคราะห์ข้อมูล

ตารางที่ ก.28 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อการทำงานของ partial purified enzyme

ชนิดของบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์)	กิจกรรมของโบรโมเปอร้ออกซิเดส (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)					
	pH					
	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
อะซิเตท บัฟเฟอร์	1.11	2.08	2.45	2.65	-	-
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์	-	-	-	2.71	2.27	1.85
Relative enzyme activity (%)	41.96	78.32	92.44	100.00	83.92	68.25

ตารางที่ ก.29 ความคงทนของโบรโมเปอร์ออกซิเดสเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เวลาในการเก็บ (วัน)	Crude enzyme (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)	Partial purified enzyme (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)
0	5.71	2.64
4	4.90	2.45
8	4.66	2.36
12	4.37	2.32
16	3.98	2.16
20	3.87	2.10
24	3.58	2.05
28	3.45	2.03
32	3.16	1.97
36	3.07	1.96
40	2.99	1.95

ตารางที่ ก.30 ความคงทนของโบรโมเปอร์ออกซิเดสเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เวลาในการเก็บ (วัน)	Crude enzyme (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)	Partial purified enzyme (มิลลียูนิต/มิลลิลิตร)
0	5.71	2.64
4	5.05	2.51
8	4.74	2.42
12	4.59	2.29
16	4.44	2.20
20	4.30	2.06
24	4.15	1.96
28	4.00	1.93
32	3.93	1.91
36	3.82	1.89
40	3.73	1.83

ภาคผนวก ข.

1. การประมาณขนาดโมเลกุลของโพรโมเปอร้ออกซิเดสโดย gelfiltration chromatography

1.1 สารเคมี

Sephadex G-75

สารละลายโปรตีนมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย

Thyroglobulin	มวลโมเลกุล	670,000	คาลตัน
Gamma globulin	มวลโมเลกุล	158,000	คาลตัน
Ovulbumin	มวลโมเลกุล	44,000	คาลตัน
Myoglobin	มวลโมเลกุล	17,000	คาลตัน
Vitamin B-12	มวลโมเลกุล	1,350	คาลตัน

1.2 ขั้นตอนการทดสอบ

1.2.1 ใส้ Sephadex G-75 ลงในคอลัมน์ขนาด 1.1×40 เซนติเมตร equilibrate คอลัมน์ด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 โดยใช้ flow rate 40 มิลลิลิตร/ชั่วโมง นาน 12 ชั่วโมง

1.2.2 เติมสารละลายโปรตีนมาตรฐานลงในคอลัมน์ ชะด้วย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 โดยใช้ flow rate 40 มิลลิลิตร/ชั่วโมง

1.2.3 เก็บสารละลายโปรตีน fraction ละ 2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 นาโนเมตร คำนวณค่า distribution coefficient ของโปรตีนมาตรฐานที่ผ่าน gelfiltration chromatography โดยมีการคำนวณดังต่อไปนี้

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

K_{av} = distribution coefficient

V_e = elution volume

V_o = void volume (14 มิลลิลิตร)

V_t = total volume (40 มิลลิลิตร)

1.2.4 เมื่อทราบค่า distribution coefficient จึงเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Log (MW) และ distribution coefficient ของโปรตีนมาตรฐาน

1.2.5 คำนวณค่า distribution coefficient ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส เพื่อเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง Log (MW) และ distribution coefficient ของโปรตีนมาตรฐาน

1.2.6 นำค่า Log (MW) ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส มาคำนวณขนาดโมเลกุล

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีเอส

2.1 สารเคมี

เคซีน	0.6	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
โซเดียมคาร์บอเนต	0.55	โมลาร์
Folin-Ciocalteu reagent	0.5	มิลลิลิตร
ไซโรซีน	1.0	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
Trichloroacetic acid	40.0	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.2 ขั้นตอนการทดสอบ

2.2.1 ทำกราฟมาตรฐานระหว่างการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 นาโนเมตร และสารละลายไซโรซีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยนำสารละลายไซโรซีนมาทำปฏิกิริยากับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.55 โมลาร์ และ Folin-Ciocalteu reagent 0.5 มิลลิลิตร แล้ววัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 นาโนเมตร

2.2.2 เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และความเข้มข้นของสารละลายไซโรซีนดังรูป

2.2.3 บ่มเอนไซม์ (สารตัวอย่างที่ต้องการตรวจวัดโปรตีเอส) 0.25 มิลลิลิตร ในสารละลายเคซีน 0.6% (สับสเตรทของโปรตีเอส) ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

2.2.4 หยุดปฏิกิริยาด้วย trichloroacetic acid 20% ปั่นแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที

2.2.5 นำ supernatant 1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.55 โมลาร์ 2.5 มิลลิลิตร และ Folin-Ciocalteu reagent 0.5 มิลลิลิตร นาน 30 นาที วัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 660 นาโนเมตร (เพื่อหาปริมาณไซโรซีนที่เกิดขึ้นโดยใช้กราฟมาตรฐาน)

2.2.6 จำนวนปริมาณไซโรซีนที่เกิดขึ้นจากการทำงานของโปรตีเอส

1 หน่วย (U) โปรตีเอส หมายถึงปริมาณโปรตีเอสที่ผลิตไซโรซีน 1 ไมโครโมล ต่อนาทีภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry method)

3.1 สารเคมี

สารละลาย A : 1% (w/w) คอปเปอร์ ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

สารละลาย B : 2% (w/w) โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เตรต (sodium potassium tartrate)

สารละลาย C : 0.2 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

สารละลาย D : 4% (w/v) โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate)

สารละลาย E : เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย C 49 มิลลิลิตร กับสารละลาย D 49 มิลลิลิตร เติมสารละลาย A 1 มิลลิลิตร จากนั้นใส่สารละลาย B 1 มิลลิลิตร (สารละลาย E ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง)

สารละลาย F : เตรียมสารละลาย F โดยเจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่น

3.2 ขั้นตอนการทดสอบ

3.2.1 ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย E 2.5 มิลลิลิตร

3.2.2 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

3.2.3 เติมสารละลาย F 0.25 มิลลิลิตร

3.2.4 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที

3.2.5 วัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 750 นาโนเมตร

3.2.6 เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย BSA