บทคัดย่อ

ศึกษาการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดง *Polycarvernosa* sp. โดยการบดด้วยเครื่องบดร่วมกับการใช้ดีเทอร์เจนท์ (ได้แก่ Triton X-100 และ sodium deoxycholate), การบดร่วมกับวิธี freeze and thaw, การบดร่วมกับการใช้คลื่นเสียง และศึกษาผลของการกวนต่อการแพร่ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเมมเบรนหลังการบดเซลล์ พบว่าการกวนนาน 6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้สูงสุด โดยเพิ่ม specific activity ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสใน crude enzyme 57.54% เมื่อเปรียบเทียบกับ crude enzyme ที่ได้จากการบดเซลล์ เมื่อทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เมธานอล เอธานอล และอะซีโตน พบว่าการตกตะกอนด้วยอะซีโตนให้โบรโมเปอร์ออกซิเดสปริมาณสูงที่สุด โดยมีค่า degree of purification เท่ากับ 4.21 ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย ion-exchange chromatography (DEAE-Sephadex และ DEAE-Toyopearl) พบว่า DEAE-Toyopearl มีประสิทธิภาพดีกว่า โดย partial purified enzyme มีค่า degree of purification เท่ากับ 7.24 ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย gel filtration chromatography (Biogel A-0.5 M และ Sephadex G-75) พบว่า Sephadex G-75 มีประสิทธิภาพดีกว่า โดยมี degree of purification เท่ากับ 14.42 เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีเอส พบว่าใน crude enzyme มีโปรตีเอส 267 ไมโครยูนิต/มิลลิลิตร ขณะที่ partial purified enzyme จาก Sephadex G-75 มีปริมาณโปรตีเอส 0.002 ไมโครยูนิต/มิลลิลิตร การหาขนาดโมเลกุลโดย Sephadex G-75 พบว่าโบรโมเปอร์ออกซิเดสมีมวลโมเลกุลประมาณ 615,000 ดาลตัน เมื่อศึกษาผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส พบว่าวานาเดียมไอออน (V^{+5}) สามารถเพิ่มกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่ผ่านการล้างด้วยสารละลาย EDTA และ dialysis แล้ว โดยวานาเดียมไอออนที่ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์มีความเหมาะสมที่สุดต่อโบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้ โดยเพิ่มกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 50.98% เมื่อศึกษาคุณสมบัติของโบรโมเปอร์ออกซิเดส พบว่า partial purified enzyme มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงกว่า crude enzyme เมื่อศึกษาความคงทนต่อสภาวะความเป็นกรดและด่าง พบว่า crude enzyme คงทนต่อ pH7 ได้ดีที่สุด และยังคงกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสได้ดีที่ pH 4 และ 9 partial purified enzyme มีความคงทนที่ pH 6 ดีที่สุด และยังคงกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสได้ดีที่ pH 4 และ 9 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ crude และ partial purified enzymes คือ 55 องศาเซลเซียส และระดับความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของ crude และ partial purified enzymes คือที่ pH 6 เมื่อศึกษาถึงสภาพความคงทนในการเก็บรักษา พบว่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส crude และ partial purified enzymes มีกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสลดลง 47.50 % และ 26.07 % ตามลำดับ ขณะที่เมื่อเก็บที่

อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส crude และ partial purified enzymes มีกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสลดลง 34.48% และ 30.63% ตามลำดับ ภายในเวลา 40 วัน

คำสำคัญ (Keywords) : โบรโมเปอร์ออกซิเดส / *Polycarvernosa* sp. / สาหร่ายสีแดง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2548-2549 ทำให้การศึกษาวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
รายการตาราง		ซ
รายการรูปประกอบ		ญ
รายการคำย่อ		ฏ
บทที่ 1 บทนำ		
	1.1 เหตุผลและที่มาของงานวิจัย	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
	1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
	1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎี		
	2.1 โบรโมเปอร์ออกซิเดส (Bromoperoxidase)	3
	2.2 ชนิดของโบรโมเปอร์ออกซิเดส	4
	2.3 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของโบรโมเปอร์ออกซิเดส	5
	2.4 หน้าที่ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในสิ่งมีชีวิต	7
	2.5 แหล่งของโบรโมเปอร์ออกซิเดส	9
	2.6 คุณสมบัติของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายทะเล	12
	2.7 ปฏิกิริยาของโบรโมเปอร์ออกซิเดส	13
	2.8 ประโยชน์ของโบรโมเปอร์ออกซิเดส	13
	2.9 สาหร่ายทะเล	15
	2.10 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์	18
	2.11 ผลของไอออนโลหะต่อโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์	20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.12 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ 24

3.2 ระเบียบวิธีวิจัย 26

3.2.1 การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยการบดด้วยเครื่องบดร่วมกับการใช้ดีเทอร์เจนท์ 26

3.2.2 การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยวิธี freeze and thaw 26

3.2.3 การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยการบดร่วมกับวิธี freeze and thaw 26

3.2.4 การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยการบดร่วมกับวิธี sonication 27

3.2.5 ศึกษาผลของการกวนต่อการแพร่ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนหลังการบดเซลล์ 27

3.2.6 การทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยการตกตะกอน 27

3.2.7 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย ion-exchange chromatography 28

3.2.8 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย gel filtration chromatography 29

3.2.9 การตรวจวัดโปรตีเอสใน crude และ partial purified enzymes 29

3.2.10 การประมาณขนาดโมเลกุลโบรโมเปอร์ออกซิเดสโดยวิธี gel filtration chromatography 29

3.2.11 ศึกษาผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 30

3.2.12 ศึกษาผลของปริมาณวานาเดียมไอออนต่อกิจกรรมของ โบรโมเปอร์ออกซิเดสที่สกัดได้ 30

3.2.13 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 32

3.2.14 ศึกษาผลของความเป็นกรดและด่างต่อความคงทนของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 30

3.2.15 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.16 ศึกษาระดับความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 31

3.2.17 การศึกษาความคงทนในการเก็บรักษา 31

3.3 การทดสอบหากิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 31

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 การสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยการบดร่วมกับการใช้ดีเทอร์เจนท์

4.1.1 Triton X-100 33

4.1.2 Sodium deoxycholate 34

4.2 การสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยวิธี freeze and thaw 35

4.3 การสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยวิธีการบดเซลล์ร่วมกับวิธี freeze and thaw

4.3.1 Freeze and thaw โดยใช้อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสในการแช่แข็ง 36

4.3.2 Freeze and thaw โดยใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็ง 37

4.4 การสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยวิธีการบดเซลล์ร่วมกับวิธี sonication 38

4.5 ผลของการกวนต่อการแพร่ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนหลังการบดเซลล์

4.5.1 การแพร่ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนหลังการบดเซลล์ 39

4.5.2 การสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากเซลล์โดยวิธีการบดเซลล์ร่วมกับการกวน 40

4.6 การทำให้เอนไซม์เข้มข้นโดยการตกตะกอน 41

4.7 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย ion-exchange chromatography

4.7.1 DEAE-Sephadex 42

4.7.2 DEAE-Toyopearl 43

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.8 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย gel filtration chromatography

4.8.1 Sephadex G-75 44

4.8.2 Biogel A-0.5 M 45

4.9 สรุปการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดง *Polycarvernosa* sp. 46

4.10 การตรวจวัดโปรตีเอสใน crude และ partial purified enzymes 47

4.11 การประมาณขนาดโมเลกุลโบรโมเปอร์ออกซิเดสโดย gel filtration chromatography 48

4.12 ผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 49

4.13 ผลของปริมาณไอออนวานาเดียมต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 50

4.14 การศึกษาคุณสมบัติของโบรโมเปอร์ออกซิเดส

4.14.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 51

4.14.2 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อความคงทนของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 52

4.14.3 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 53

4.14.4 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อการทำงานของโบรโมเปอร์ออกซิเดส 54

4.15 การศึกษาความคงทนต่อการเก็บรักษา

4.15.1 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 55

4.15.2 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 56

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 57

เอกสารอ้างอิง 66

ภาคผนวก ก. 76

ภาคผนวก ข.

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชนิดของฮาโลเปอร์ออกซิเดส	3
2.2	แหล่งของเอนไซม์โบรโมเปอร์ออกซิเดส	10
2.3	ตัวอย่างสายพันธุ์และคุณลักษณะของสาหร่ายทะเลที่พบในประเทศไทย	16
4.1	ผลของการตกตะกอน crude enzyme ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, อะซีโตน, เมธานอล และเอธานอล	41
4.2	การสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายสีแดง *Polycarvernosa* sp.	46
4.3	ปริมาณโปรตีเอสใน crude และ partial purified enzymes	47
ก.1	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยการบดร่วมกับการใช้ Triton X-100	74
ก.2	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยการบดร่วมกับการใช้ sodium dexoycholate	74
ก.3	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยวิธี freeze and thaw	75
ก.4	ผลของการบดเซลล์ร่วมกับวิธี freeze and thaw โดยใช้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในการแช่แข็ง	75
ก.5	ผลของการบดเซลล์ร่วมกับวิธี freeze and thaw โดยใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็ง	75
ก.6	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยการบดเซลล์ร่วมกับวิธี sonication	76
ก.7	ผลของการแพร่ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนหลังการบดเซลล์	76
ก.8	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากเซลล์โดยการบดเซลล์ร่วมกับการกวน	77
ก.9	ผลของการตกตะกอน crude enzyme ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	77
ก.10	ผลของการตกตะกอน crude enzyme ด้วยอะซีโตน	77
ก.11	ผลของการตกตะกอน crude enzyme ด้วยเมธานอล	78
ก.12	ผลของการตกตะกอน crude enzyme ด้วยเอธานอล	78
ก.13	ค่า OD_{280} และกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction ที่ผ่านการแยกด้วย DEAE-Sephadex	79

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ก.14 ค่า OD_{280} และกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction ที่ผ่านการแยกด้วย DEAE-Toyopearl 81

ก.15 ค่า OD_{280} และกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction ที่ผ่านการแยกด้วย Sephadex G-75 83

ก.16 ค่า OD_{280} และกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดสในแต่ละ fraction ที่ผ่านการแยกด้วย Biogel A-0.5 M 84

ก.17 การตรวจวัดปริมาณโปรตีเอสใน crude และ partial purified enzymes 85

ก.18 Distribution coefficient ของ fraction ลำดับต่าง ๆ เมื่อใช้ Sephadex G-75 ในการหาขนาดโมเลกุล 86

ก.19 ผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของ partial purified enzyme 87

ก.20 ผลของความเข้มข้นวานาเดียมไอออนต่อกิจกรรมของ partial purified enzyme 87

ก.21 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของ crude enzyme 88

ก.22 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของ partial purified enzyme 88

ก.23 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อความคงทนของ crude enzyme 89

ก.24 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อความคงทนของ partial purified enzyme 89

ก.25 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude enzyme 90

ก.26 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ partial purified enzyme 90

ก.27 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อการทำงานของ crude enzyme 91

ก.28 ผลของความเป็นกรดและด่างต่อการทำงานของ partial purified enzyme 91

ก.29 ความคงทนของโบรโมเปอร์ออกซิเดสเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 92

ก.30 ความคงทนของโบรโมเปอร์ออกซิเดสเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 92

รายการรูปประกอบ

รูปที่		หน้า
2.1	Heme component ของ ferriprotoporphyrin IX	5
2.2	พันธะระหว่างวานาเดียมกับออกซิเจน และวานาเดียมกับไนโตรเจน (หรือออกซิเจน)	6
2.3	กลไกการเปิดปฏิกิริยาของโบรโมเปอร์ออกซิเดส	7
4.1	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสโดยการบดเซลล์ร่วมกับ Triton X-100	31
4.2	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสโดยการบดเซลล์ร่วมกับ sodium deoxycholate	34
4.3	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสออกจากเซลล์โดยวิธี freeze and thaw	35
4.4	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสโดยการบดเซลล์ร่วมกับวิธี freeze and thaw เมื่อใช้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในการแช่แข็ง	36
4.5	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสโดยการบดเซลล์ร่วมกับวิธี freeze and thaw เมื่อใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็ง	37
4.6	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสโดยการบดเซลล์ร่วมกับวิธี sonication	38
4.7	ผลของการแพร่ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากเซลล์เมมเบรนหลังจากการบดเซลล์	39
4.8	ผลของการสกัดโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากเซลล์โดยวิธีการบดเซลล์ร่วมกับการกวน	40
4.9	Elution profiles ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย DEAE-Sephadex	42
4.10	Elution profiles ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย DEAE-Toyopearl	43
4.11	Elution profiles ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดย Sephadex G-75	44

รายการรูปประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.12	Elution profiles ของโบรโมเปอร์ออกซิเดสจากการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ โดย Biogel A-0.5 M	45
4.13	การประมาณขนาดโมเลกุลของโบรโมเปอร์ออกซิเดสโดย Sephadex G-75	48
4.14	ผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส	49
4.15	ผลของปริมาณวานาเดียมไอออนต่อกิจกรรมของโบรโมเปอร์ออกซิเดส	50
4.16	ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของ crude และ partial purified enzymes	51
4.17	ผลของความเป็นกรดและด่างต่อความคงทนของ crude และ partial purified enzymes	52
4.18	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของ crude และ partial purified enzymes	53
4.19	ผลของความเป็นกรดและด่างต่อการทำงานของ crude และ partial purified enzymes	54
4.20	ความคงทนของ crude และ partial purified enzymes เมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	55
4.21	ความคงทนของ crude และ partial purified enzymes เมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	56

รายการคำย่อ

pH	=	ค่าความเป็นกรดและด่าง
MW	=	มวลโมเลกุล
BSA	=	Bovine serum albumin
DEAE	=	Diethylaminoethyl
OD	=	Optical density
α	=	แอลฟ่า
β	=	เบต้า