บทคัดย่อ

โบรโมเปอร์ออกซิเดส (BPO) ถูกสกัดออกมาจากสาหร่ายทะเลชนิด *Polycarvernosa* และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนใน 0-60% แอมโมเนียมซัลเฟต, คอลัมน์ DE52 โครมาโตกราฟี และ FPLC โดยใช้คอลัมน์ MonoQ และ Superose12 BPO1 และ BPO2 เป็น isoenzyme ที่แยกจากขั้นตอนของคอลัมน์ DE52 โครมาโตกราฟี หลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้วได้ BPO1 และ BPO2 โดยมี specific activity 61.86 และ 330.58 mU/mg ตามลำดับ BPO1 และ BPO2 เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีฮีม ซึ่ง V_2O_5 สามารถกระตุ้นให้มีความสามารถในการทำงานเพิ่มขึ้น 2.5 และ 3.5 เท่าจากเอนไซม์ตามธรรมชาติตามลำดับ มีการดัดแปลงทางเคมีของ BPO1 โดย 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid และ iodoacetamide จะเพิ่มความสามารถในการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดย N-acetylimidazole, diethylpyrocarbonate, 5-5′-dithiolbis (2-nitrobenzoic acid) และ 1, 2-cyclohexanedione ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการทำงาน และเสถียรภาพของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ BPO1 โดย N-bromosuccinimide, 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide, diethylpyrocarbonate, carbodiimide, iodoacetic acid และ iodoacetamide ลดการทำงานของเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงเคมีโดย N-acetylimidazole, o-nitrophenylsulfenyl chloride และ 1, 2-cyclohexanedione ไม่ทำให้ความสามารถในการทำงานของ BPO2 ลดลง ในการศึกษานี้โดยใช้สารเคมีชนิดต่าง ๆ พบว่าสารที่ใช้ในการศึกษาทดลองนี้ไม่ทำให้ความสามารถในการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์ทั้งในสารละลายที่เป็นกรดและด่าง ค่า K_m ของเอนไซม์ที่ถูกเปลี่ยนแปลงสำหรับ monochlorodimedone, potassium bromide และ hydrogen peroxide เท่ากับ 1.43×10^{-5} 1.54×10^{-2} และ 9.09×10^{-7} M ตามลำดับ ในขณะที่ค่า K_m ของเอนไซม์ตามธรรมชาติเท่ากับ 2.94×10^{-5}, 2.17×10^{-4} และ 1.00×10^{-4} M ตามลำดับ

BPO1 มี 2 isoenzyme คือ BPO1.1 และ BPO1.2 ที่แยกโดยใช้ non-denaturing electrophoresis จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนของทั้ง BPO1.1 และ BPO1.2 ที่ถูกเปลี่ยนแปลงโดย iodoacetamide มีหมู่ของกรดอะมิโนไลซีนที่ถูกเปลี่ยนแปลง 14 และ 16 หมู่ จากจำนวนทั้งหมด 42 และ 49.5 หมู่ ในขณะที่มีหมู่ของกรดอะมิโนฮีสติดีนที่ถูกเปลี่ยนแปลง 6 และ 9.5 หมู่ ในจำนวนทั้งหมด 30 และ 21.6 หมู่ ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้อาจชี้แนะว่าหมู่ของกรดอะมิโนไลซีน และฮีสติดีนที่ถูกเปลี่ยนแปลงอาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความสามารถในการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์ BPO1

ABSTRACT

Bromoperoxidase was extracted from Thai seaweed, *Polycarvernosa* sp. and purified by using 0-60% ammonium sulphate precipitation, DE 52 column chromatography and fast protein liquid chromatography by using MonoQ column and Wuperose 12 column. Two isoenzymes, BPO1 and BPO2 were separated in the purification step of DE52 column chromatography. After purification by Superose 12 column the specific activity of BPO1 and BPO2 were 61.86 and 330.58 mU/mg, respectively. BPO1 and BPO2, were non-heme enzymes that could be activated 2.5 and 3.5 fold by V_2O_2. Chemical modification of BPO1 by 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid and iodoacetamide caused an enhancement in the enzyme activity and stability while the modification by N-acetylimidazole, diethylpyrocarbonate, 5, 5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) and 1,2-cyclohexanedione did not cause any change in enzyme activity and stability. The modification of BPO1 by N-bromosuccinimide, 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide, carbodiimide and iodoacetic acid caused a decrease in the enzyme activity. Chemical modification of BPO2 by 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid, N-bromosuccinimide, 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide, diethylpyrocarbonate, carbodiimide, iodoacetic acid and iodoacetamide inactivated the enzyme activity while modification by N-acetylimidazole, o-nitrophenylsulfenylsulfenyl chloride and 1,2-cyclohexanedione did not change the enzyme activity. None of the modifying agent used in this study increased the enzyme activity or stability. The modification of BPO1 by iodoacetamide enhanced the enzyme activity about 500% and enhanced thermostability in both acidic and alkaline condition. K_m values of iodoacetamide-modified BPO1 for monochlorodimedone, potassium bromide and hydrogen peroxide were 1.43×10^{-5} 1.54×10^{-2}, and 9.09×10^{-7} M respectively while the K_m values of the native enzyme were 2.94×10^{-5}, 2.17×10^{-4} and 1.00×10^{-4} M, respectively.

BPO1 contained two isoenzymes, BPO1.1 and BPO1.2 were isolated by using non-denatruing electrophoresis. From amino acid analysis of iodoacetamide-modified BPO1.1 and BPO1.2, the modified lysyl resdues were 14 and 16 residues of the total lysyl residues of 42 and 49.5 residues, respectively at 18 hours of incubation at 35^{O}C pH 7.0 while the modified histidyl residues were 6 and 9.5 of the total histidyl residues of 30 and 21.6 residues, respectively. The results suggested that the modified lysyl and histidyl residues might be involved in the enhancement of the enzyme activity and stability of BPO1.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2540 ทำให้การศึกษาวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คณะผู้วิจัย

CONTENTS

		Page
ABSTRACT		i
CHAPTER		
I	INTRODUCTION	1
1.1	Peroxidases and Haloperaoxidaes	1
1.2	Type of Haloperoxidases	1
1.3	Discovery of Haloperoxidases	1
1.4	Types of Bromoperoxidases	2
1.5	Sources of Bromoperoxidases from Marine Algae	2
1.6	Prosthetic Group	2
1.7	Glycoprotein-Containing Bromoperoxidase	7
1.8	Catalytic Mechanism and Kinetic Properties	7
1.9	Function of Bromoperoxidase	9
1.10	Haloperoxidase Reactions	11
1.11	Applications for Haloperoxidases	16
1.12	Physicochemical Properties	18
1.13	Amino Acid Composition of Haloperoxidase	21
1.14	Thermostability of Bromoperoxidase	23
1.15	Chemical Modification of Enzyme	23
1.16	Effect of Chemical Modification	24
1.17	Effect of Chemical Modification on Enzyme Property	25
1.17.1	Effect of Chemical Modification on Enzymatic Activity	25
1.17.2	Effect of Chemical Modification on Enzyme Stability	27
1.18	Iodoacetamide and Iodoacetic acid	34
1.19	Aims of Study	35
II	MATERIALS AND METHODS	36
2.1	MATERIALS	36
2.1.1	Chemicals	76
2.1.2	Instruments	39

2.2 Methods 40

2.2.1 Collection of Seaweed 40

2.2.2 Enzyme Assay 40

2.2.3 Purification of Bromoperoxidase from Seaweed 40

2.2.4 Molecular Weight Determination by Superose 12 Column Chromatography 42

2.2.5 Protein Determination Using Coomassie Brilliant Blue G-250 42

2.2.6 Absorption Spectra Determination 42

2.2.7 Non-denaturing Gel Electrophoresis 42

2.2.8 Modification of BPO1 and BPO2 by Iodoacetamide 42

2.2.9 Stability of BPO1, BPO2 Modified BPO1 and Modified BPO2 by Various Modified Reagents at $37^{O}C$ 43

2.2.10 Effect pH on Modification of BPO1 by Iodoacetamide 43

2.2.11 Effect of Temperature on Modification of BPO1 by Iodoacetamide 43

2.2.12 Iodoacetamide-Modified BPO1 43

2.2.13 Effect of Protease Inhibitor and BPO1 and Iodoacetamide-modified BPO1 44

2.2.14 Effect of Temperature on BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 44

2.2.15 Stability of BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 at $25^{O}C$ and $45^{O}C$ pH 7.0 44

2.2.16 Stability of BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 at $25^{O}C$ and $4^{O}C$, pH 5.5 44

2.2.17 Effect of NaN_3 and KCN on BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 45

2.2.18 pH Activity of BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 45

2.2.19 pH Activity of BPO2 45

2.2.20 pH Stability of BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 45

2.2.21 Effect of V_2O_2 on Modification of BPO1 by Iodoacetamide 46

2.2.22 Analytical Isoelectric Focusing of Iodoacetamide-Modified BPO1.1 and Iodoacetamide-Modified BPO1.2 46

III RESULTS

3.1 Purification of BPO1 and BPO2 from Seaweed 60

3.2 Iodoacetamide Modification of BPO1 and BPO2 61

3.3 Effect of Chemical Modification on BPO1 and BPO2 64

3.4 Number of Modified Amino Acid Residues by Modifying Reagents 65

3.5 Stability of BPO1, BPO2, Modified BPO1 and Modified BPO2 65

3.6 Iodoacetamide Modification 65

3.7 Half-life determination 68

3.8 Effect of Temperature on Iodoacetamide Modificiation of BPO1 69

3.9 Effect of Temperature on BPO1 and Iodoacetmide-Modified BPO1 69

3.10 Thermostability of BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 at 25°C and 45°C, pH 7.0 72

3.10.1 At Temperature 25°C 72

3.10.2 At Temperature 45°C 72

3.11 Thermostability of BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 at 25^{O}C, pH 5.5 75

3.12 Effect of Protease Inhibitor on BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 75

3.13 Effect of NaN_3 and KCN on BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 77

3.13 pH Activity of BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 79

3.14 pH Activity of BPO2 79

3.15 pH Stability of BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 79

3.16 Effect of V_2O_5 on the Modification of BPO1 by Iodoacetamide 79

3.19 Amino Acid Analysis of BPO1.1 and BPO1.2 85

IV DISCUSSION 95

4.1 Purification of Bromoperoxidases from Seaweed 95

4.2 Iodoacetamide Modification of BPO1 and BPO2 96

4.3 Effect of pH on Iodoacetamide Modification 97

4.4 Effect of Temperature on Iodoacetamide Modification of BPO1 98

4.5 Effect of Temperature on BPO1 and Iodoacetamide-Modified BPO1 98

4.6 Effect of pH Activity and Stability of Native and Modified BPO1 99

4.7 Thermostability of BPO1 and Iodacetamide-Modified BPO1 99

4.8 Effect of V_2O_5 on the Modification of BPO1 by Iodoacetamide 100

V CONCLUSIONS 101

VI BIBLIOGRAPHY 103