Thesis Title Characterization of Partially Purified Peroxidase from Fingerroot (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.)

Author Mr. Nattapong Fongbua

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Lalida Shank Chairperson

Asst. Prof. Dr. Pairoje Kijjanapanich Member

ABSTRACT

Boesenbergia rotunda (L.) Mansf., fingerroot was selected to be studied as a source of peroxidase. It was found that 10 mM phosphate buffer, pH 6.0 was the best buffer for peroxidase extraction from this plant. Initial purification began with ammonium sulfate fractionation at 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% and 80-90% and followed by removal of salt by dialysis. Peroxidase activity was determined using guaiacol as a substrate in the presence of hydrogen peroxide by measuring absorbance at 470 nm and protein content was analyzed by Bradford method for calculation of specific activity. Results showed that the fraction obtained from precipitation at 20-40% of saturation of ammonium sulfate had the maximum specificity activity of 7.74 Unit/mg with purification fold of 2.71. The native PAGE revealed the red-brown bands of tetraguaiacol produced by peroxidase catalysis. Results from the native PAGE agreed with the profile of the specific activity reported.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The 20-40% ammonium sulfate fraction was further purified using DEAE-Cellulose ion exchange chromatography or Con A-Sepharose 4B affinity chromatography for comparison. It was revealed that both of the chromatographic methods increased the specific activity to 55.32 and 47.34 Unit/mg and the purity of enzyme to 19.34 and 16.55 fold, respectively. In this study the affinity chromatography was considered more efficient than the ion exchange chromatography for purification of peroxidase according to the higher specific activity and purity obtained. The increased purity of peroxidase was confirmed by fewer protein bands detected via SDS-PAGE. Peroxidase from fingerroot may exist as isozymes with molecular weights ranging from 15.5 to 28.6 kDa and 45.0 to 70.0 kDa. Chromatofocusing revealed pI values of peroxidase candidates at about 7.46 and 6.14. At pH 6.0, room temperature, peroxidase activity remained above 60% for 5 h and at 40.0˚C, the enzyme retained 70% of its activity for 5 h. $CuCl_2$ at 5 mM, $FeCl_3$ at 0.5 mM and $FeCl_2$ at 0.5 mM moderately inhibited the activity of peroxidase, up to 30%, while $AlCl_3$, $FeCl_3$ and $FeCl_2$ at 5 mM highly inhibited the activity of the enzyme up to 70%. Kinetic studies revealed that ABTS; (K_m 2.10, V_{max} 0.271 and V_{max}/K_m 0.129) was the best substrate for fingerroot peroxidase. The second best substrate was *o*-dianisidine; (K_m 2.96, V_{max} 0.210 and V_{max}/K_m 0.071), followed by guaiacol; (K_m 21.3, V_{max} 0.219 and V_{max}/K_m 0.001) in the unit of mM, ΔA/min and (ΔA/min)/mM, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การหาลักษณะเฉพาะของเปอร์ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนจากกระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.)

ผู้เขียน นายณัฐพงศ์ ฟองบัว

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. ลลิดา แชงค์ ประธานกรรมการ

ผศ. ดร. ไพโรจน์ กิจจนะพานิช กรรมการ

บทคัดย่อ

กระชายถูกเลือกนำมาศึกษาเพื่อเป็นแหล่งของเปอร์ออกซิเดส พบว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 10 mM ที่ pH 6.0 เป็นสภาวะเหมาะสมที่สุดของการสกัดเปอร์ออกซิเดสจากพืชชนิดนี้ จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปทำบริสุทธิ์เบื้องต้นโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวในช่วง 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% และ 80-90% ตามด้วยการกำจัดเกลือออกโดยวิธีไดอะไลซิส แล้ววัดการทำงานของเปอร์ออกซิเดสโดยใช้ไกลอะคอลเป็นสารตั้งต้นในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร และวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด ซึ่งจะนำไปคำนวณหาแอคติวิตีจำเพาะ จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ 20-40% จะมีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ 7.74 Unit/mg ให้ความบริสุทธิ์ที่ 2.71 เท่า การทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

native PAGE ให้แถบโปรตีนที่มีสีน้ำตาลแดงของผลิตภัณฑ์คือ เตตระไกลอะคอล ที่ถูกสร้างโดยการเร่งของเปอร์ออกซิเดส ซึ่งวิธี native PAGE ให้ผลสอดคล้องกับค่าแอคติวิตีจำเพาะที่รายงาน

เมื่อนำส่วนที่ตกตะกอนโดยแอมโมเนียมซัลเฟตทำบริสุทธิ์ต่อโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ซึ่งใช้ DEAE-cellulose column หรือโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ โดยใช้ Con A-Sepharose 4B column เพื่อเปรียบเทียบกัน พบว่าการทำบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีทั้งสองวิธีจะเพิ่มแอคติวีตีจำเพาะ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 55.32 และ 47.34 Unit/mg 19.34 และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ 16.55 เท่า ตามลำดับ ในการศึกษานี้โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ เมื่อพิจารณาจากค่าแอคติวิตีจำเพาะและความบริสุทธิ์ที่มากกว่า ความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นได้รับการยืนยันจากจำนวนแถบโปรตีนที่ลดลงเมื่อตรวจโดยวิธี SDS-PAGE เปอร์ออกซิเดสจากกระชายอาจจะเป็นไอโซเอนไซม์โดยมีมวลโมเลกุลอยู่ในระหว่าง 15.5 ถึง 28.6 kDa และ 45.0 ถึง 70.0 kDa โครมาโทโฟกัสซิงให้ค่า pI ประมาณ 7.46 และ 6.14 ที่ pH 6.0 ที่อุณหภูมิห้อง เปอร์ออกซิเดสมีแอคติวีตีอยู่มากกว่า 60% เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 40.0°C เอนไซม์สามารถคงแอคติวีตีไว้ได้ 70% เป็นเวลา 5 ชั่วโมง $CuCl_2$ ที่ความเข้มข้น 5 mM, $FeCl_3$ และ $FeCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.5 mM ยับยั้งการทำงานของเปอร์ออกซิเดสได้ปานกลางถึงร้อยละ 30 ในขณะที่ $AlCl_3$, $FeCl_3$ and $FeCl_2$ ที่ความเข้มข้น 5 mM สามารถยับยั้งการทำงานของเปอร์ออกซิเดสได้มากถึงร้อยละ70 และการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์พบว่า ABTS; (K_m 2.10, V_{max} 0.271 และ V_{max}/ K_m 0.129) เป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะกับเปอร์ออกซิเดสที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนจากกระชายมากที่สุด รองลงมาคือ *o*-dianisidine; (K_m 2.96, V_{max} 0.210 และ V_{max}/ K_m 0.071), และ guaiacol; (K_m 21.3,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved