การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

ปริญญานิพนธ์

ของ

ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
พฤษภาคม 2556

การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

ปริญญานิพนธ์

ของ

ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

พฤษภาคม 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

บทคัดย่อ

ของ

ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
พฤษภาคม 2556

ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ. (2556). *การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย Oscillatoria* sp.. ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ, อาจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ.

งานวิจัยนี้ได้ตรวจวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *Synechococcus* sp. PCC 7942 โดยทำการสกัดหยาบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris – HCl พีเอช 9.0 จากนั้นติดตามแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสด้วยการทำปฏิกิริยาของ 4 – AAP, Gallic acid, ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และสารสกัดหยาบ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที พบว่า สารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 235.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 0 – 20, 20 – 40, 40 – 60, 60 – 80 และ 80 – 100 ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60 – 80 ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุด 828.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ใช้การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0 – 80 พบว่าให้ผลผลิตร้อยละ 57.98 และความบริสุทธิ์ 3.21 เท่า จากนั้นทำไดอะไลซีส และทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้คอลัมน์ DEAE – Cellulose และโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G – 100 พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 21.95 เท่า และได้ผลผลิตร้อยละ 14.41 เพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้มีน้ำหนักโมเลกุล 54 KDa สมบัติของเพอร์ออกซิเดส พบว่า อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 9.0 ตามลำดับ เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. มีความจำเพาะต่อสารประกอบฟีนอลิกเรียงตามลำดับดังนี้ Gallic acid, Phenol, Ascorbic acid และ Caffaein ตามลำดับ ค่าจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดส โดยใช้ Gallic acid เป็นซับสเทรต พบว่า K_m และ V_{max} เป็น 1.00 มิลลิโมลาร์ และ 10000.00 ไมโครโมลต่อนาทีมิลลิกรัมโปรตีน แอคทิวิทีของเอนไซม์จะถูกกระตุ้นด้วย Fe^{3+}, Mn^{2+} และ Na^{+} ที่ความเข้มข้นของอิออน Hg^{2+} 500 ไมโครโมลาร์ ยับยั้งแอคทิวิทีอย่างชัดเจน Urea ไม่มีผลต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส ในขณะที่ SDS และ EDTA มีผลต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส โดยที่ความเข้มข้นของ SDS และ EDTA 10 mM ทำให้แอคทิวิทีลดลงเหลือร้อยละ 80

คำสำคัญ: การทำให้บริสุทธิ์ เพอร์ออกซิเดส ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PEROXIDASE FROM CYANOBACTERIA *Oscillatoria* sp.

AN ABSTRACT

BY

CHAIYASAD KACHENSUWAN

Presented in Partial Fulfillment of Requirements for the

Master of Science Degree in Biology

at Srinakharinwirot University

May 2013

Chaiyasad Kachensuwan. (2013). Purification and Characterization of Peroxidase from Cyanobacteria *Oscillatoria* sp.. Master thesis, M.Sc. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Asst. Prof. Dr. Somkiat Phornphisutthimas, Ph.D.; Dr. Surasak Laloknam, Ph.D.

The research aimed to investigate the screening of peroxidase activity frome 5 cyanobacteria: *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Synechococcus* sp. PCC 7942. All samples were extracted by Tris – HCl buffer, pH 9.0 and crude extracts were measured for peroxidase activity using a reaction mixture consisting of 4 – AAP, Gallic acid and Hydrogen peroxide. The reactions were incubated at 30°C for 10 minutes. *Oscillatoria* sp. showed the highest peroxidase activity, 235.49 units/mg proteins. The *Oscillatoria* sp. crude extracted was fractionted by ammonium sulfate precipitation at percentage saturation range of 0 – 20, 20 – 40, 40 – 60, 60 – 80 and 80 – 100, respectively. Ammonium sulfate fraction range of 60 – 80 % saturation gave the highest peroxidase activity, of 828.92 units/mg proteins. The percentage of ammonium sulfate fractionation at 20 – 80 % saturation was selected to precipitate of peroxidase from *Oscillatoria* sp. crude extracted and gave 57.98 % recovery with 3.21 fold purification. Partial purification of peroxidase has been obtained by passing the 0 – 80 % ammonium sulfate fraction through a diethyl amino ethyl – Cellulose (DEAE – Cellulose) column. The fraction with peroxidase activity were pooled separately and passed through a Sephadex G – 100 column for further purification. The purified enzyme preparation exhibited a specific activity of 5170.00 units/mg proteins, while purification fold and yield were 21.95 and 14.41, respectively. The purified peroxidase was homogenous as judged by native and SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight as determine by gel filtration and SDS - polyacrylamide gel electrophoresis was 54 KDa, which suggested that the purified peroxidase contained only one unit. The optimum temperature and pH for purified peroxidase were 30 °C and 9.0, respectively. The affinity of the enzyme with different substrates showed as the highest relative activity on Gallic acid followed by Phenol, Ascorbic acid and Caffaein, respectively. The apparent K_m and V_{max} values of the enzyme

against Gallic acid were 1.00 mM and 10000.00 μmol.min^{-1}.mg protein^{-1}, respectively. The presence of metal ion such as Fe^{3+}, Mn^{2+} and Na^{+} enhanced peroxidase activity. On the other hand, Hg^{2+} strongly inhibited the enzyme activity at 0.5 mM. Peroxidase was stability in the presence of each urea concentration. The activity was then decreased when SDS and EDTA concentration increased. At 10 mM SDS and EDTA, the peroxidase was remained activity about 80 %

Keywords: Purification Peroxidase Cyanobacteria *Oscillatoria* sp.

ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.
ของ
ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ ..... เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2556

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ)

..... กรรมการ
(ดร.สมบัติ คงวิทยา)

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิต
ในระดับบัณฑิตศึกษา จากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2556

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ ประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ รองประธานควบคุมปริญญานิพนธ์ ที่สละเวลาเพื่อให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางในการดำเนินการทำวิจัย จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เฉลิมชัย วงศ์วัฒนะ และ ดร.สมบัติ คงวิทยา ที่กรุณาแนะนำให้ข้อเสนอแนะต่างๆ ที่เป็นประโยชน์แก่งานวิจัยนี้ และเสียสละเวลาในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่มอบทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2556 เพื่อสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอบขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ และภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นอย่างยิ่งที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการและสารเคมีและเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทภูมิรู้และภูมิธรรมทุกท่าน และขอขอบคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโทที่คอยช่วยเหลืออำนวยความสะดวก และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้สามารถผ่านอุปสรรคต่างๆ จนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ความสำคัญของการวิจัย	3
	ขอบเขตของการวิจัย	3
	ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย	3
	สถานที่ทำการทดลอง	3
	นิยามศัพท์เฉพาะ	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	ไซยาโนแบคทีเรีย	5
	ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.	9
	การนำไปใช้ประโยชน์	11
	เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส	11
	ความหมายของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส	11
	ประเภทของเพอร์ออกซิเดส	13
	แหล่งผลิตเพอร์ออกซิเดส	14
	การใช้ประโยชน์ของเพอร์ออกซิเดส	15
	การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเพอร์ออกซิเดส	16
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	23
	ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา	23
	การตรวจสอบแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสและหาปริมาณโปรตีน	23
	การทำให้เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์	23
	การศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดส	24
	ผลของอุณหภูมิ	24
	ผลของพีเอช	24
	จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดส	25
	ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดส	25

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	**(ต่อ)**.....	25
	ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส.....	25
	ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์.....	25
4	**ผลการวิจัย**	27
	การศึกษาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย.....	27
	สมบัติของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.	28
	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.	28
	ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.	29
	การศึกษาค่าจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.	30
	ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.	31
	ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.	32
	ผลสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.	33
	การทำให้เพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์.....	35
	การตกตะกอนเอนไซม์สกัดหยาบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต.....	35
	สมบัติของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.	36
	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.	36
	ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.	37
	การศึกษาค่าจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.	38

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
4	(ต่อ).....	39
	ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.	39
	ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.	40
	ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.	41
	การทำให้เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. บริสุทธิ์ด้วยการทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ.....	43
	การทำให้เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. บริสุทธิ์ด้วยการทำโครมาโตร-กราฟีแบบแยกขนาด.....	44
	ความบริสุทธิ์ของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.	46
	การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส	47
	สมบัติของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.	50
	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.	50
	ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.	51
	การศึกษาค่าจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.	52
	ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก*Oscillatoria* sp. ..	53
	ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.	54
	ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.	55

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
5	**สรุปและอภิปรายผลการวิจัย**	57
	สรุปและอภิปรายผลการวิจัย	57
	การศึกษาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย.....	57
	การทำให้เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. บริสุทธิ์.....	58
	การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส	59
	สมบัติของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.	59
	ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดจาก *Oscillatoria* sp.	59
	ผลของพีเอชต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดจาก *Oscillatoria* sp.	60
	ค่าจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.	60
	ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดจาก *Oscillatoria* sp.	60
	ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.	61
	ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส จาก *Oscillatoria* sp.	61
บรรณานุกรม		64
ภาคผนวก		72
ประวัติย่อผู้วิจัย		117

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรีย ก. *Chroococcus turgidus* ข. *Eucapsis* sp. ค. *Oscillatoria* sp. ง. *Anabaena* sp. PC 7120 6

2 ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. 9

3 กระบวนการผลิต ROS ในไซยาโนแบคทีเรีย..... 10

4 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเพอร์ออกซิเดส..... 12

5 ซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดส..... 12

6 ขั้นตอนการทาให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย… 26

7 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. 28

8 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria sp.* 29

9 จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria sp.* โดยใช้ *Gallic acid* เป็นซับสเทรต..... 30

10 ผลของยูเรียต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria sp.* 33

11 ผลของ *SDS* ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria sp.*..... 33

12 ผลของ *EDTA* ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria sp.*..... 34

13 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria sp.* 36

14 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria sp.*..... 37

15 จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria sp.* โดยใช้ *Gallic acid* เป็นซับสเทรต..... 38

16 ผลของยูเรียต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. 41

17 ผลของ SDS ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. ... 41

18 ผลของ EDTA ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp... 42

19 การทำให้เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ให้บริสุทธิ์ โดยทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE – Cellulose ชะด้วยสารละลาย 50 mM Tris – HCl, pH 7.5 อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร 43

20 การทำให้เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ให้บริสุทธิ์ โดยทำโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex G – 100 ชะด้วยสารละลาย 50 mM Tris – HCl, pH 7.5 อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร… 44

21 โปรตีนมาตรฐาน ที่แยกด้วยโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex G – 100 ชะด้วยสารละลาย 50 mM Tris – HCl, pH 7.5 อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร..... 45

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ **หน้า**

22 Native – PAGE ของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์.. 47

23 SDS – PGAE ของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์.. 48

24 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (40 – 260 KDa)……..... 48

25 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp……..… 50

26 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. ……. 51

27 จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ Gallic acid เป็นซับสเทรต..... 52

28 ผลของยูเรียต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. ……. 55

29 ผลของ SDS ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. ……. 55

30 ผลของ EDTA ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. ……. 56

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	แหล่งผลิตพอร์ออกซิเดส และสมบัติบางประการ……..	20
2	แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด. ……...	27
3	ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.	31
4	ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.....	32
5	การตกตะกอนเพอร์ออกซิเดสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต…….	35
6	ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. .	39
7	ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. ...	40
8	การทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ……	46
9	ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์…….…	53
10	ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. ……...	54
11	การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ……..	62

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) หรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) เป็นสิ่งมีชีวิตในดิวิชัน Cyanophyta มีความสามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้เช่นเดียวกับพืช ไซยาโน-แบคทีเรียบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ (Incharoensakdi; & Laloknam. 2005) *Oscillatoria erythraea* และ *Oscillatoria thiebautii* เป็นผู้ผลิตเริ่มต้นในห่วงโซ่อาหารบริเวณชายฝั่งทะเล เมื่อมีการเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจะทำให้สัตว์น้ำขาดออกซิเจนและไปอุดตันที่เหงือกของสัตว์น้ำ อาจทำให้สัตว์น้ำตายได้ (มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554) จากการศึกษาของ โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์ และคณะ (2554) พบว่า *Oscillatoria* sp. สามารถเจริญได้ภายใต้ภาวะที่มีเกลือ NaCl เข้มข้น 0 – 1 โมลาร์ และเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.25 โมลาร์ โดยในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงจะทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) มีผลต่อกระบวนการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน (electron transport chain) โดยมีการสร้างและเก็บสารอนุมูลอิสระไว้ในเซลล์ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นพวก reaction oxygen species (ROS) เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Fe^{2+}) จะได้สารที่ไวต่อการทำปฏิกิริยากับอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^-) ซึ่งสามารถทำลายดีเอ็นเอ ลิพิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ และโปรตีนได้ โดยเซลล์จะมีการตอบสนองด้วยกลไกในการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative enzyme) เช่น แคทาเลส (catalase) และเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) เอนไซม์กลุ่มนี้ช่วยในการกำจัด H_2O_2 ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (Takeda; et al. 1998; Becana; & Lotassa. 2007) ซึ่งสอดคล้องกับ Saha และคณะ (2003) รายงานว่า *Oscillatoria willei* BDU 130511 เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ แต่จะใช้เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxidedismutase: SOD) และเพอร์ออกซิเดส เพื่อช่วยในการดำรงชีวิต ในภาวะที่ขาดไนโตรเจน *O. wellei* BDU 130511 จะลดการสังเคราะห์ด้วยแสง และแอคทิวิทีของไนเตรตรีดักเทส (nitrate reductase) มีการสร้างไขมัน ผลิตเอนไซม์กลูตามีนซินเทเทส (glutamine synthetase) มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน และกำจัด H_2O_2 ที่มีปริมาณมากขึ้นด้วยเพอร์ออกซิเดส จากรายงานของ Rout และ Shaw (2001) พบว่า ในพืชทนเค็มจะสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative enzymes) เพื่อช่วยกำจัด H_2O_2 ที่เกิดในภาวะ oxidative stress เช่น แคทาเลส และเพอร์ออกซิเดส จากการศึกษาแอคทิวิทีของแคทาเลส และเพอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*) สาหร่ายหนาม (*Najas indica*) และสาหร่ายเส้นด้าย (*Najas gramenia*) พบว่า ในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือสูงขึ้น สาหร่ายเส้นด้าย สาหร่ายหนาม และสาหร่ายหางกระรอก มีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้น

เพอร์ออกซิเดส (E.C.1.11.1.7) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้ H_2O_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron accepter) (ชื่นสุมณ ยิ้มถิน. 2548) และออกซิไดซ์ซับสเทรตที่ให้

อิเล็กตรอน เช่น ฟีนอล (phenol) แอโรมาทิกเอมีน (aromatic amine) และกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) (Vernwal; et al. 2006) จึงมีการนำเพอร์ออกซิเดสไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกรรม และการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ที่มีสารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (นิตยา จันซิว; และคณะ. 2551; สุวิตา เจริญศรี; และคณะ. 2551; ลือชัย อารยะรังสฤษฎ์; และสุภาพร จันทร์บัวทอง. 2553)

เพอร์ออกซิเดสพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (Kongwithtaya; Laloknam; & Chairote. 2010) ในปัจจุบันเพอร์ออกซิเดสที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ปฏิกิริยาเคมีได้จากรากฮอร์ทเรดิช (horseradish root) ซึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้เอนไซม์มีราคาสูง นักวิทยาศาสตร์ได้ศึกษาหาแหล่งผลิตและแยกเพอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์จากแหล่งต่างๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป โดยสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจะแตกต่างกันตามแหล่งที่ผลิตดังนี้

เพอร์ออกซิเดสจากผักกระถิน (*Leucaena leucocephala*) ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ พบว่า เพอร์ออกซิเดสที่แยกได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 89.3 เท่า มีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 KDa ทำงานได้ดีที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แอคทิวิทีของเอนไซม์จะถูกกระตุ้นด้วย Na^{+} และถูกยับยั้งด้วย Ca^{2+} และ Mn^{2+} ที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 มิลลิโมลาร์ โดยที่เอไซด์ (azide) ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Veda; & Upendra. 2011)

เพอร์ออกซิเดสจากผักตำลึง (Ivy gourd) พบว่า เพอร์ออกซิเดสที่แยกได้ให้ความบริสุทธิ์ 17.45 เท่า มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45 KDa ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 7.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยเอนไซม์จะถูกกระตุ้นด้วย Cu^{2+} และ Ca^{2+} และถูกยับยั้งด้วย Cr^{3+} และ Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ (Kongwithtaya; Laloknam; & Chairote. 2010)

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. เพื่อใช้เป็นแหล่งผลิตเพอร์ออกซิเดสสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น กำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. คัดแยกไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตเพอร์ออกซิเดสให้แอคทิวิทีจำเพาะสูง
2. ทำเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. ให้บริสุทธิ์บางส่วน
3. ศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

ความสำคัญของการวิจัย

1. ได้แหล่งผลิตเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

2. เพอร์ออกซิเดสบริสุทธ์จากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้ เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ และการตรวจสอบสารประกอบฟีนอลิก

ขอบเขตของการวิจัย

การคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียที่ให้แอคทิวิทีจำเพาะสูงสุด

ตรวจหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิดได้แก่ *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *Synechococcus* sp. PCC 7942 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Kongwithtaya; Laloknam; & Chairote (2010) และหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Bradford (1976) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) จากนั้นคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่ให้แอคทิวิทีจำเพาะสูงสุดทำการศึกษาต่อไป

การทำเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรียให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. มาสกัดหยาบด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนและส่วนใส นำส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ทำไดอะไลซีส (dialysis) ทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion – exchange chromaography) โดยใช้คอลัมน์ DEAE – Cellulose นำตัวอย่างที่ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงที่สุดมาทำโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาด (size exclusion) โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G – 100 หาน้ำหนักโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้พอลิอะคริลาไมด์แบบเสียสภาพ (SDS – PAGE) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยใช้พอลิอะคริลาไมด์แบบไม่เสียสภาพ (native – PAGE)

ศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดส

หาภาวะที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ จลนศาสตร์ ความจำเพาะต่อซับสเทรต ไอออน ตัวทำละลายอินทรีย์ และสารยับยั้งแอคทิวิทีของเอนไซม์

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

เริ่มตั้งแต่ กันยายน 2554 – กุมภาพันธ์ 2556

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์อาคาร 15 ห้อง 623 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. เพอร์ออกซิเดส หมายถึง เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันในการสลายซับสเทรตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำและสารประกอบ quinoneimine

2. การทำให้บริสุทธิ์ หมายถึง การทำให้เพอร์ออกซิเดสมีความบริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE – Cellulose และทำโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G – 100

3. เอนไซม์ 1 หน่วย หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันกับซับสเทรตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์หนึ่งไมโครโมลต่อนาทีภายใต้ภาวะการทดลอง

4. แอคทิวิทีจำเพาะ หมายถึง จำนวนหน่วยของเพอร์ออกซิเดสต่อปริมาณโปรตีนหนึ่งมิลลิกรัม

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้ ทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องตามลำดับ ดังนี้

1. ไซยาโนแบคทีเรีย
2. ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.
3. เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส
4. การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเพอร์ออกซิเดส

ไซยาโนแบคทีเรีย

ไซยาโนแบคทีเรียหรือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน จัดอยู่ในดิวิชัน Cyanophyta เป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์ด้วยแสงได้เช่นเดียวกับพืช พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ (Incharoensakdi; & Laloknam. 2005) จากการศึกษาซากดึกดำบรรพ์ (fossil) มีอายุประมาณ 3.5 พันล้านปี พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตโบราณที่ผลิตแก๊สออกซิเจนสู่ชั้นบรรยากาศ พบได้ในสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ทะเล แหล่งน้ำจืด น้ำพุร้อน และในดิน (Osswald; et al. 2007) ไซยาโนแบคทีเรียมีสีซึ่งเกิดจากรงควัตถุในเซลล์โดยสีเขียวเกิดจากคลอโรฟิลล์เอ และคลอโรฟิลล์บี ส่วนสีน้ำเงินเกิดจากไฟโคบิลิโปรตีน (phycobiliproteins) (Dittman; & Wiegand. 2006)

ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรียแบ่งเป็น 2 ประเภท (ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549) ดังนี้

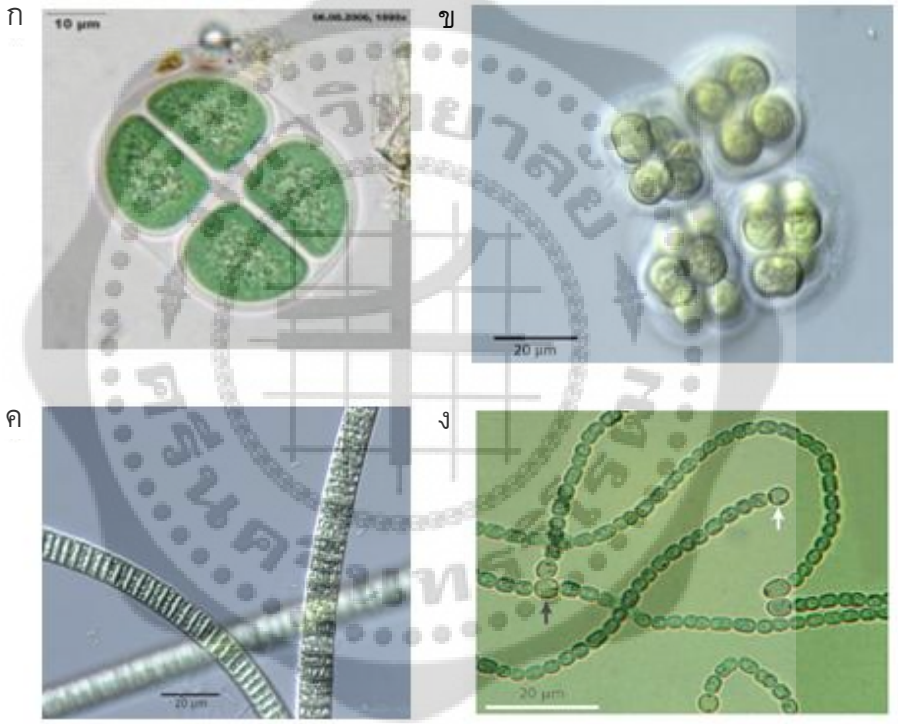
1. ประเภทโคโลนีที่ไม่เป็นเส้นสายหรือเป็นเซลล์เดี่ยว (non filamentous form หรือ unicellular cyanobacteria) ส่วนมากอยู่ในรูป coccoid form พบทั้งพวกที่อยู่เซลล์เดี่ยว เช่น *Chroococcus* และพวกที่อยู่รวมกันเป็นโคโลนีแบบพาล์เมลลา (palmelloid colonies) เช่น *Eucapsis* sp. และ *Anacystis* sp. แสดงดังภาพประกอบ 1

2. ประเภทที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous form) เส้นสายเกิดจากการเรียงต่อกันของเซลล์เรียกว่า ไทรโคม (trichome) ใน *Oscillatoria* sp. และ *Lyngbya* sp. เซลล์มีการเรียงต่อกันเป็นเส้นตรงและเรียบไม่แตกแขนงเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า homocystous form ส่วนใน *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. เซลล์จะเรียงต่อกันแบบ heterocystous form เรียงต่อกันและมีเซลล์เฮเทโรซิสต์ (heterocyst cell) ซึ่งมีผนังเซลล์หนา 2 ชั้น เรียงสลับหรืออยู่ที่ส่วนปลายของไทรโคม แสดงดังภาพประกอบ 1

ไซยาโนแบคทีเรียมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ มี 2 วิธี (จารุ สังขนุกิจ. 2547) ดังนี้

1. การแบ่งเซลล์ ในกลุ่มเซลล์เดี่ยวมีการแบ่งเซลล์ทำให้เกิดกลุ่มเซลล์รวมกันอยู่ภายในผนังเซลล์เดียวกัน จากนั้นเซลล์ที่ได้จากการแบ่งตัวจะหลุดออกจากผนังเซลล์และเจริญเป็นเซลล์ใหม่ (ภาพประกอบ 1 ก) ส่วนในกลุ่มที่อยู่รวมกันเป็นโคโลนีจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและหลุดออกไปเป็นกลุ่มย่อยๆ แล้วจึงเจริญต่อไปเป็นเซลล์ใหม่ (ภาพประกอบ 1 ข) ในขณะที่พวกที่เป็นไทรโคมจะแยก

ไทรโคมเป็นท่อนสั้นๆ ประมาณ 2 – 3 เซลล์หรือมากกว่า เรียกว่า ฮอร์โมโกเนียม (hormogonium) และเจริญเป็นสายใหม่ต่อไป (ภาพประกอบ 1 ค) โดยฮอร์โมโกเนียมจะมีการเคลื่อนไหวมากกว่าไทรโคมเดิม บริเวณที่ขาดออกจากกันตรงบริเวณเซลล์ที่ตายเรียกว่า เซพาเรชันดิสก์ (separation disks) หรือ เนคริเดีย (necridia) ในกลุ่มเส้นสายยังมีการสร้างเฮเทโรซิสต์ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ปกติ และแยกไทรโคมบริเวณรอยต่อระหว่างเฮเทโรซิตส์กับเซลล์ที่อยู่ติดกัน นอกจากนี้ยังสร้างเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ผนังหนาคล้ายสปอร์เรียกว่า อะคีนีต (akinete) ภายในมีเม็ดไซยาโนไฟซิน (cyanophycin granules) โดยเซลล์จะเจริญเมื่อมีการสร้างอะคีนีตเสร็จใหม่ๆ อะคีนีตสามารถทนสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น แห้งแล้ง หรืออุณหภูมิสูงได้ระยะหนึ่งเมื่อมีภาวะแวดล้อมเหมาะสมอะคีนีตจะเจริญเป็นสายใหม่ได้ (ภาพประกอบ 1 ง)



ภาพประกอบ 1 ลักษณะของไซยาโนแบคทีเรีย

ก. *Chroococcus turgidus* (Wagner. 2006)

ข. *Eucapsis* sp. (Graham; & Wilcox. 2000)

ค. *Oscillatoria* sp. (Graham; & Wilcox. 2000)

ง. *Anabaena* sp. PC 7120 (Flores; & Herrero. 2010)

2. การสร้างสปอร์ สปอร์ที่สร้างไซยาโนแบคทีเรียมี 2 ชนิด คือ เอนโดสปอร์ (endospore) และเอกโซสปอร์ (exospore) ซึ่งไม่มีแฟลกเจลลัม (flagellum) สำหรับใช้ในการเคลื่อนที่ เอนโดสปอร์เป็นสปอร์ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จากการแบ่งโพรโทพลาสต์ โดยแต่ละส่วนจะพัฒนาไปเป็น

สปอร์เมื่อหลุดออกจากผนังเซลล์เดิมจะงอกเป็นทัลลัสใหม่ และเอกโซสปอร์เกิดจากการแบ่งของส่วนปลายเซลล์ออกมา

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย (พิมพ์ภาพ มณีธร. 2553) ได้แก่

1. ความเข้มแสง แสงมีความสำคัญต่อการสร้างอาหารโดยกระบวนสังเคราะห์ด้วยแสง โดยปริมาณแสงที่ต้องการของไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ดังรายงานของ ณัฏฐา เสนีวาส และคณะ (2553) รายงานว่า ความเข้มแสงมีผลต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Hapalosiphon* sp. โดยการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในเรือนเพาะชำที่ได้รับแสงจากธรรมชาติ (ความเข้มแสงในช่วง 10.30 – 12.30 น. เท่ากับ 1,806.06 μmol/m^2/s และในช่วงเวลา 16.30 – 18.30 น. มีค่าเท่ากับ 202.56 μmol/m^2/s) เจริญได้ดีกว่าสภาพที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (40 μmol/m^2/s)

2. อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญ การสืบพันธุ์ และปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดเจริญได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และเจริญได้ดีที่สุดในอุณหภูมิที่เหมาะสม เช่น *Hapalosiphon* sp. เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิในช่วง 30.43 – 33.56 องศาเซลเซียส (ณัฏฐา เสนีวาส; และคณะ. 2553)

3. ความเป็นกรด–เบส ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำมีค่าอยู่ในช่วง 6.0 – 8.0 ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการความเป็นกรด – เบส ที่แตกต่างกัน โดยปกติไซยาโนแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในสภาพน้ำที่เป็นเบส ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญได้ดีในแหล่งน้ำที่เป็นกรด เช่น *Hapalosiphon* sp. เจริญได้ดีที่สุดที่พีเอชช่วง 9.055 – 9.376 (ณัฏฐา เสนีวาส; และคณะ. 2553)

4. ความขุ่นของน้ำ มีผลต่อปริมาณแสงที่ส่องผ่านลงมาในน้ำ โดยอนุภาคแขวนลอยที่อยู่ในน้ำทำให้เกิดการกระเจิงของแสง โดยแสงบางส่วนจะถูกดูดซับเอาไว้ เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

5. ปริมาณธาตุอาหาร ไซยาโนแบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องการแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเช่นเดียวกับพืช ซึ่งแบ่งออกตามความต้องการได้ 2 กลุ่ม ดังนี้

5.1 แร่ธาตุที่ต้องการปริมาณมาก (major elements) เป็นแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบโครงสร้างของไซยาโนแบคทีเรีย ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟอร์ และโพแทสเซียม

5.2 แร่ธาตุที่ต้องการปริมาณน้อย (minor elements) เป็นแร่ธาตุที่ไซยาโนแบคทีเรียต้องการในปริมาณต่ำ (น้อยกว่ามิลลิลิตรต่อลิตร) โดยเป็นธาตุที่เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลที่สำคัญ เช่น ปัจจัยต่อการเจริญ (growth factor) เอนไซม์ หรือตัวกระตุ้นเอนไซม์ (activator) มีทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ คลอรีน เหล็ก แมงกานีส โบรอน สังกะสี ทองแดง และโมลิบดินัม

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ (2543) รายงานว่า ความเข้มข้นของฟอร์มาลินและคลอรีนที่เพิ่มขึ้นมีผลในการยับยั้งการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. พบว่า ความเข้มข้นของฟอร์มาลินและคลอรีนที่เหมาะสมในการควบคุมปริมาณ *Oscillatoria* sp. เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตรและ 3

มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าพีเอชและปริมาณแอนไอออนแอมโมเนียมของชุดทดลองที่ได้รับฟอร์มาลินและคลอรีนไม่แตกต่างกัน ($p \geq .05$) ในขณะที่ค่าออกซิเจนละลายน้ำและปริมาณคลอโรฟิลล์เอ แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่เติมฟอร์มาลินและคลอรีน ($p < .05$)

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ไซยาโนแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการธาตุอาหารที่แตกต่างกัน เช่น *Anabaena* และ *Nostoc* สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีความเค็ม (ประเสริฐ อะมริต. 2554) นอกจากนี้ยังมีสารอีกหลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย เช่น วิตามินบี 1 วิตามินบี 12 ไบโอติน ไนอาซิน กรดพาราแอมมิโนเบนโซอิก กรดโฟลิก กรดแพนโทเทนิก ไพริดอก-ซิน กรดแอสคอบิก และไกลซีน

ไซยาโนแบคทีเรียที่พบตามชายฝั่งทะเลในเขตร้อน ได้แก่ *Oscillatoria* sp. เป็นผู้ผลิตเริ่มต้นในห่วงโซ่อาหาร (มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554) ดังการศึกษาของ ปาริชาติ สมพิมาย (2543) ที่ศึกษาการกระจายของแพลงก์ตอนพืชในบึงสิฐาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเก็บตัวอย่างในช่วงพฤศจิกายน ถึงเดือนธันวาคม 2543 พบว่ามีไซยาโนแบคทีเรียจำนวน 9 ชนิด ในสัปดาห์ที่ 1 ไซยาโน-แบคทีเรียที่มีปริมาณมากที่สุดคือ *Oscillatoria* sp. และรองลงมาคือ *Gonium* sp. ในสัปดาห์ที่ 2 พบ *Anabaenopsis* sp. มากที่สุด รองลงมาคือ *Oscillatoria* sp. และ *Euglena* sp. น้อยที่สุด และในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 พบ *Anabaenopsis* sp. มากที่สุด รองลงมาคือ *Oscillatoria* sp. และพบ *Chroococcus* sp. น้อยที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ วีรานุช ปลื้มทรัพย์ และคณะ (2544) ศึกษาการกระจายของไซยาโนแบคทีเรียในพื้นที่น้ำความเค็มต่ำ จังหวัดสุพรรณบุรี ปี พ.ศ. 2542 โดยเก็บตัวอย่างไซยาโนแบคทีเรียในช่วงเดือนเมษายน 2542 – มกราคม 2543 ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบไซยาโนแบคทีเรีย 13 สกุล ไซยาโนแบคทีเรียที่พบมากและพบตลอดช่วงที่ทำการศึกษา ได้แก่ *Trichodesmium* sp. *Oscillatoria* sp. *Raphidiopsis* sp. และ *Microcystis* sp. นอกจากนี้ปริมาณของ *Oscillatoria* sp. ไม่มีผลต่อค่าพีเอช แต่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณไนไทรต์ ($r = 0.154$) และความสัมพันธ์เชิงลบกับความเค็ม ($r = –0.221$) และสอดคล้องกับ เสาวนิตย์ ชอบบุญ และ พัชรี หลุ่งหม่าน (2553) ที่ศึกษาความหลากหลายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา โดยทำการเก็บข้อมูลในช่วงเดือนพฤษภาคม – เดือนพฤศจิกายน 2551 จากแหล่งต่างๆ ภายในมหาวิทยาลัยจำนวน 8 สถานี พบว่า เมื่อนำตัวอย่างที่เก็บมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BGA BG_{11} Allen's และ Ns III ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกสาหร่ายให้บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง และตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาพบไซยาโนแบคทีเรียในดิวิชัน Cyanophyta จำนวน 21 สกุล 51 ชนิด และ *Oscillatoria* มีการกระจายตัวมากที่สุด รองลงมาคือ *Nostoc* และ *Calothrix*

จากข้อมูลงานวิจัยสรุปได้ว่า *Oscillatoria* sp. เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถพบได้ตลอดทั้งปี ตามแหล่งน้ำต่างๆ เมื่อมีจำนวนมากจะมีผลต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ เช่น ปัญหาการอุดตันของ *Oscillatoria* ในซี่เหงือกของกุ้งกุลาดำทำให้ขาดอากาศหายใจ (วีรานุช ปลื้มทรัพย์; และคณะ. 2544)

ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. (จำแนกตามยุวดี พีรพรพิศาล. 2549)

Kingdom Monera

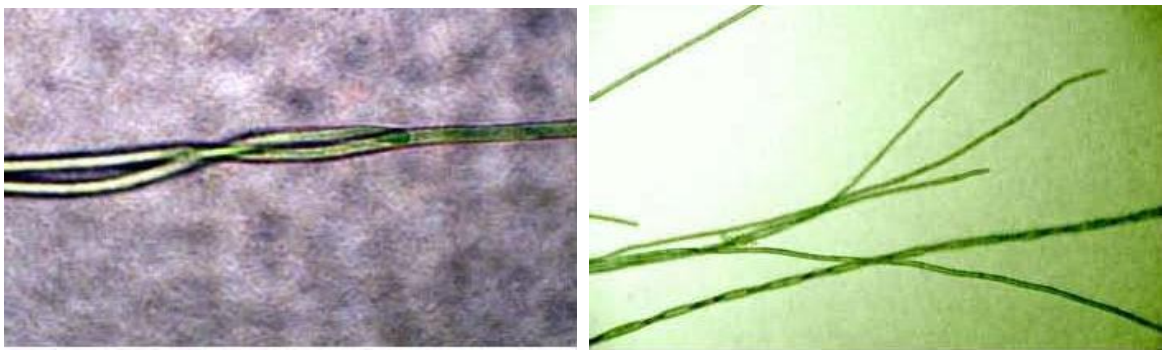
Division Cyanophyta

Order Oscillatoriales

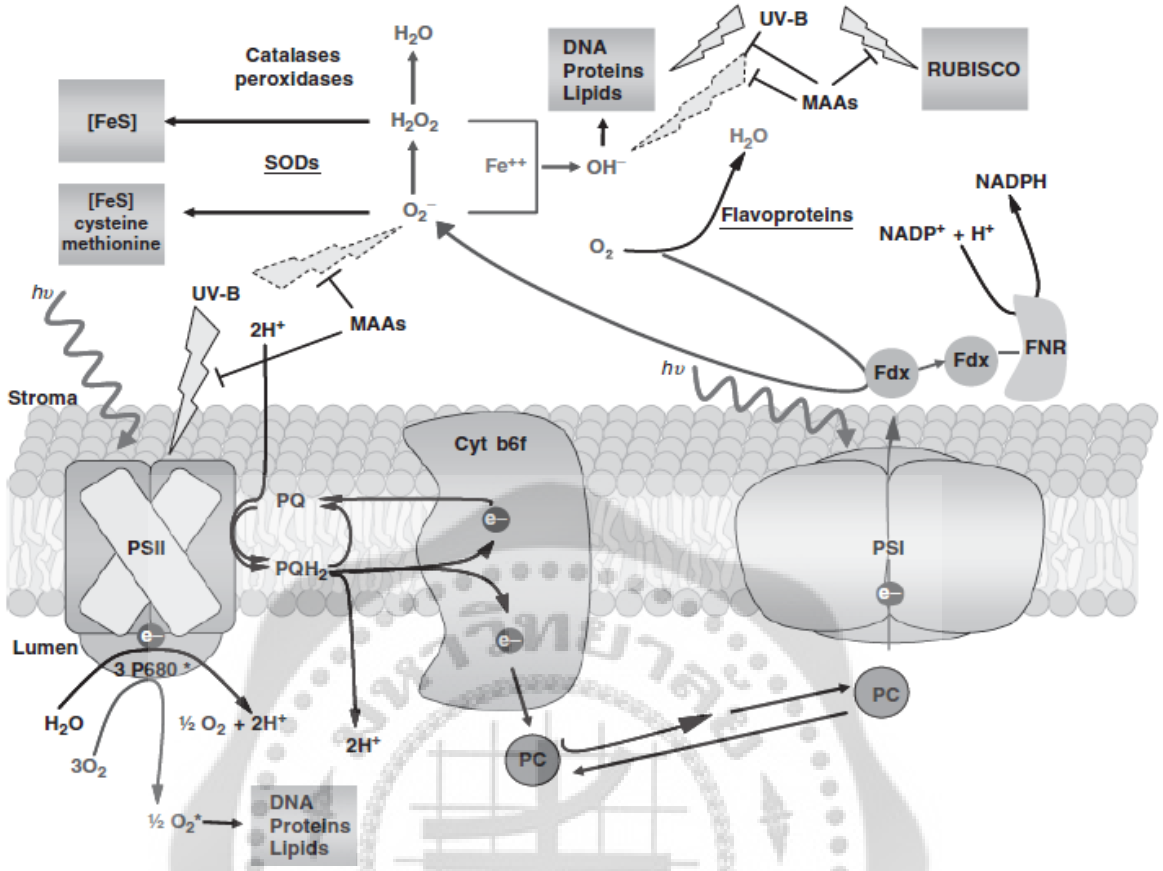
Family Oscillatoriaceae

Genus *Oscillatoria*

Oscillatoria sp. เป็นไซยาโนแบคทีเรียมีเซลล์สีเขียว เขียวแกมน้ำเงิน ดำ และน้ำตาล เซลล์เรียงต่อกันเป็นไทรโคมทรงกระบอก มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous) หรืออาจรวมกันเป็นกลุ่ม แต่ละสายไม่มีแขนง (ภาพประกอบ 2) *Oscillatoria* sp. เคลื่อนที่ได้ทั้งแบบการไหล (gliding movement) และการแกว่ง (oscillating) สร้างฮอร์โมโกเนียมเพื่อใช้ในการสืบพันธุ์ (ยุวดี พีรพรพิศาล. 2548) *Oscillatoria* sp. เป็นไซยาโนแบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ประกอบด้วยรงควัตถุหลายชนิด ได้แก่ คลอโรฟิลล์เอ ไฟโคบิลิน และแคโรทีนอยด์ ซึ่งประกอบด้วย มิกโซแซนโทฟิลล์ (myxoxanthophyll) และเอไคนิโนน (echinenone) พบได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม (Stewart. 2011) มีรายงานว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria willei* BDU 130511 สามารถสร้างอาหารได้จากการสังเคราะห์ด้วยแสง และสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) และเพอร์ออกซิเดส เพื่อช่วยในการดำรงชีพ ในภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน *O. wellei* BDU 130511 จะลดการสังเคราะห์แสงและแอคทิวิทีของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (Nitrate reductase) มีการสร้างไขมัน การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน และผลิตเอนไซม์กลูตามีน ซินเทเทส (glutamine synthetase) และเพอร์ออกซิเดสเพื่อกำจัด H_2O_2 ที่มีปริมาณมากขึ้น (Saha; et al. 2003) เช่นเดียวกับการปรับสภาพของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria princeps Oscillatoria limosa Anabaena* sp. และ *Phormidium laminosum* ในภาวะที่เป็นพิษจากสารหนู พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียมีปริมาณกลูตาไทโอนและแคโรทีนอยลดลง และสร้างเอนไซม์ แคทาเลส ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (SOD) และแอสคอร์บิกเพอร์ออกซิเดส (APX) เพื่อช่วยลดความเป็นพิษจากสารหนูได้ (Panchali; & Ruma. 2011)



ภาพประกอบ 2 ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.



ภาพประกอบ 3 กระบวนการผลิต ROS ในไซยาโนแบคทีเรีย (Latifi; et al. 2008)

โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์ และคณะ (2554) พบว่า *Oscillatoria* sp. สามารถเจริญได้ภายใต้ภาวะที่ความเค็ม 0 – 1 M NaCl และเจริญได้ดีที่สุดที่ความเค็มเท่ากับ 0.25 M NaCl โดยในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงจะทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งมีผลต่อกระบวนการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน (electron transport chain) โดยมีการสร้างและเก็บสารอนุมูลอิสระไว้ในเซลล์ และเปลี่ยนเป็น reaction oxygen species (ROS) เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยเมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็ก (Fe^{2+}) จะได้อนุมูลไฮดรอกซิล (OH^-) ซึ่งสามารถไปทำลายดีเอ็นเอ ลิพิดบนเยื่อหุ้มเซลล์ และโปรตีน (Takeda; et al. 1998; Becana; & Lotassa. 2007)

ในภาวะความเครียดออกซิเดชัน ไซยาโนแบคทีเรียตอบสนองด้วยกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative enzyme) เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส แคทาเลส และเพอร์ออกซิเดส โดยซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส กำจัด oxygen anion (O_2^-) ให้อยู่ในรูปไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จากนั้นจะใช้แคทาเลสและเพอร์ออกซิเดส เพื่อช่วยในการกำจัด H_2O_2 ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์อยู่ในรูปของน้ำ (H_2O) แสดงดังภาพประกอบ 3 (Latifi; et al. 2008)

การนำไปใช้ประโยชน์

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์ และศักดิ์ชัย ชูโชติ (2550) ศึกษาการกำจัดตะกั่วจากน้ำเสียโดยใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria jasorvensis* และ *Microcystis aeruginosa* พบว่า ความสามารถสูงสุดในการดูดซับตะกั่วของ *O. jasorvensis* และ *M. aeruginosa* เท่ากับ 114.94 และ 98.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง จากการใช้เซลล์ไซยาโนแบคทีเรียที่มีชีวิตดูดซับตะกั่วแบบระยะยาว พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้งสองชนิดดูดซับตะกั่วได้อย่างรวดเร็วในวันแรกและมีการดูดซับอย่างช้า ๆ ต่อเนื่องไปจนสิ้นสุดการทดลองที่ 15 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง *O. jasorvensis* และ *M. aeruginosa* สามารถกำจัดตะกั่วจากน้ำเสียได้ร้อยละ 95.5 ± 0.2 และ 75.1 ± 0.7 ตามลำดับ

ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria deflexa* เป็นแหล่งสารอาหารหลายชนิด ได้แก่ โปรตีน (ร้อยละ 54.5) ลิพิด (ร้อยละ13.8) คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ 10.0) กรดอะมิโน (ร้อยละ 27.43) วิตามิน เช่น วิตามิน B1 B2 และ E และแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Zn) นอกจากนี้พบกรดไขมันจำเป็นต่อร่างกาย (Gribovakaya; et al. 2009)

การทำปุ๋ยชีวภาพจากกากมะพร้าวโดยหมักไซยาโนแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Phormidium* sp. BDU – 2, *Oscillatoria* sp. BDU – 5 และ *Anabaena azollae* พบว่า *Phormidium* sp. สามารถย่อยสลายกากมะพร้าวได้ดีที่สุด โดยปุ๋ยที่ได้มีแร่ธาตุและสารอาหารสำหรับพืชหลายชนิด เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม โซเดียมและแมงกานีส (Anbuselvi. 2009)

จากข้อมูลการวิจัยสรุปได้ว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น เป็นแหล่งที่อุดมด้วยสารอาหารต่าง ๆ ทั้ง โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ลิพิด วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการกำจัดสารพิษในน้ำเสียได้อีกด้วย

เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

ความหมายของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

เพอร์ออกซิเดส (E.C.1.11.1.7) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron accepter) (ชื่นสุมณ ยิ้มถิน. 2548) และออกซิไดซ์ซับสเทรตที่ให้อิเล็กตรอน เช่น ฟีนอล (phenol) แอโรมาทิกเอมีน (aromatic amine) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และสารประกอบอนินทรีย์ (Vernwal; et al. 2006)

กลไกการเกิดปฏิกิริยา คือ เพอร์ออกซิเดสที่อยู่ในระยะพัก (E, ferric state) ให้ 2 อิเล็กตรอนกับ H_2O_2 ปฏิกิริยาให้สารสีเขียว และเพอร์ออกซิเดสจะอยู่ในรูป Compound I จากนั้นออกซิไดซ์ซับสเทรต (AH) และเปลี่ยนสภาพอยู่ในรูป Compound II และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำและสารประกอบควินีน (quinine) สีแดง (A) โดยที่เอนไซม์ในรูป Compound II จะรับ 1 อิเล็กตรอนทำให้อยู่ในระยะ E และสามารถกลับมาทำปฏิกิริยาใหม่ได้ (Smith; & Veitch. 1998) แสดงดังภาพประกอบ 4

$$E(Fe^{3+}, R) + H_2O_2 \longrightarrow E(Fe^{4+}=O, R^{o+}) + H_2O \quad (1)$$

Native enzyme — Compound I

$$\text{Compound I} + AH \longrightarrow E(Fe^{4+}=O, R) + A \quad (2)$$

Compound II

$$\text{Compound II} + AH \longrightarrow E(Fe^{3+}, R) + A + H_2O \quad (3)$$

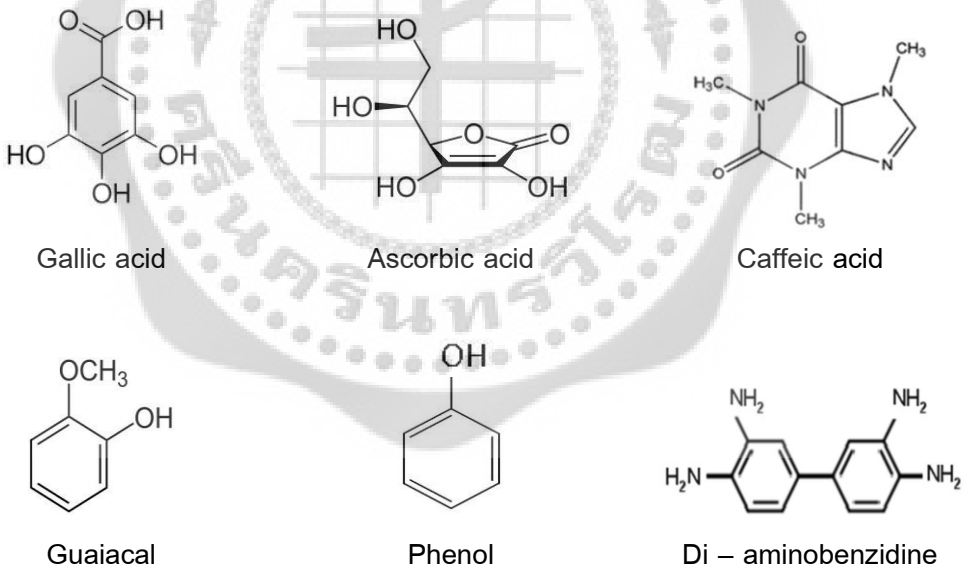
Native enzyme

สรุปได้ดังนี้

$$2AH + H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxidase}} 2H_2O + 2A \text{ (A ให้สี)}$$

ภาพประกอบ 4 กลไกการเกิดปฏิกิริยาของเพอร์ออกซิเดส

เพอร์ออกซิเดสออกซิไดซ์ซับสเทรต เช่น phenol, gallic acid, ascorbic acid, caffeic acid, guaiacal และ diaminobenzidine (DAB) ซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดสแสดงดังภาพประกอบ 5 ในสภาวะที่มี H_2O_2 (Kongwithtaya; et al. 2010; Quinn; & Graybiel. 1996)



ภาพประกอบ 5 ซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดส

ประเภทของเพอร์ออกซิเดส

เพอร์ออกซิเดสพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเพอร์ออกซิเดสจากพืชและจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 300 หน่วย ในขณะที่เพอร์ออกซิเดสที่ได้จากสัตว์ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 576 – 738 หน่วย และจับกับฮีมด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent bond) เพอร์ออกซิเดสจำแนกตามการเรียงลำดับกรดอะมิโนได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้ (O'Brien. 2000)

1. เพอร์ออกซิเดสของโพรแคริโอต (prokaryotic peroxidase) เช่น แอสคอเบสเพอร์-ออกซิเดส (ascorbate peroxidase) ไซโทโครมซีเพอร์ออกซิเดส (cytochrome C peroxidase, CCP) จากยีสต์ มีรายงานว่า แบคทีเรียสร้างเพอร์ออกซิเดสขึ้นมาเพื่อใช้ในการปกป้องเซลล์จากภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ไซยาโนแบคทีเรียผลิตไฮโดรเพอร์ออกซิเดส (hydroperoxidase) เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ให้เป็นน้ำ (Regelsberger; et al. 2002) เช่นเดียวกับพืชที่ผลิตเพอร์ออกซิเดสและแคทาเลส เพื่อใช้กำจัดไฮโดรเจนเพอร์-ออกไซด์ออกจากคลอโรพลาสต์และไซโทซอล (Shigeoka; et al. 2002) สอดคล้องกับรายงานในพืชทนเค็มที่มีกลไกในการป้องกันภาวะความเครียดออกซิเดชันจากความเค็มโดยพืชจะสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative enzymes) ขึ้นมาเพื่อช่วยกำจัด H_2O_2 เช่น แคทาเลส เพอร์ออกซิเดส จากการศึกษาแอคทิวิทีของเอนไซม์แคทาเลสและเพอร์ออกซิเดส จากสาหร่ายหางกระรอก (*Hydrilla verticillata*) สาหร่ายหนาม (*Najas indica*) และสาหร่ายเส้นด้าย (*Najas gramenia*) พบว่า ในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือสูงขึ้น สาหร่ายเส้นด้าย สาหร่ายหนาม และสาหร่ายหางกระรอกมีแอคทิวิทีเพอร์ออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้น โดยแอคทิวิทีของแอสคอเบสเพอร์ออกซิเดสจากสาหร่ายหางกระรอกเพิ่มขึ้น ในขณะที่แอคทิวิทีของแอสคอเบสเพอร์ออกซิเดส ในสาหร่ายหนามและสาหร่ายเส้นด้ายลดลง (Rout; & Shaw. 2001)

2. เพอร์ออกซิเดสของสารที่หลั่งจากเชื้อรา (secretory fungal peroxidases) เช่น ลิกนินเพอร์ออกซิเดส (Lignin peroxidase) และ แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (Manganese per-oxidase) ซึ่งก่อให้เกิดโรครากขาวในพืช ซึ่งผลิตจากเชื้อราเช่น *Phanerochaete chrysosporium* (Conesa; et al. 2002) เพอร์ออกซิเดสในกลุ่ม secretory fungal peroxidases จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bridges) 4 ตำแหน่ง ที่เชื่อมด้วย Ca^{2+} 2 ตำแหน่ง (ชื่นสุมณ ยิ้มถิ่น. 2548)

3. เพอร์ออกซิเดสของสารที่หลั่งจากพืช (secretory plant peroxidases) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อแต่ละชนิด เช่น การตอบสนองโรคจากบาดแผล สร้างและซ่อมแซมผนังเซลล์และอวัยวะต่างๆ และยังช่วยออกซิไดซ์สารที่เป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ ฟีนอล แอโนมาทิกเอมีน และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Sisecioglu; et al. 2010) กระบวนการสลาย indole– 3–acetic acid การสร้างเอทธิลีน เพอร์ออกซิเดสในกลุ่มนี้โมโนเมอร์ไกลโคโปรตีน (monomeric glycoproteins)

ประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์และ Ca^{2+} เช่นเดียวกับประเภทที่ 2 แต่แตกต่างกันที่ตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ (ชื่นสุมณ ยิ้มถิ่น. 2548)

แหล่งผลิตเพอร์ออกซิเดส

เพอร์ออกซิเดสสามารถผลิตได้ทั้งใน สัตว์ พืช และแบคทีเรีย มีรายงานว่า *Steptomyces viridosporus* T7A สามารถปล่อยลิกนินเพอร์ออกซิเดส (extracellular lignin peroxidase) เพื่อออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอล, vanillic acid (4–hydroxyl–3 methoxybenzoic acid) และ syringic acid (4–hydroxyl–3,5–dimethoxybenzoic acid) โดยใช้ 4–aminoantipyrine (4–AAP) ซึ่งถ้ามีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจะได้สารประกอบควินีนที่ให้สีแดง (Spiker; et al. 1992) เช่นเดียวกับเพอร์ออกซิเดสของเชื้อราในอาหารวุ้นแข็งที่มีสารสกัดจากมอลต์ (malt extract agar) พบว่า *Trichoderma harzianum* SIWT 25 สามารถผลิตเพอร์ออกซิเดสซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของ *Scytalidium lacrymans*, *Coniophora puteana* และตัวเอง โดยวัดแอคทิวิทีจากพื้นที่ของโคโลนีของเชื้อรา และยังพบว่า *S. lacrymans* สามารถสร้างเส้นใย (mycelia fans) รอบโคโลนีของ *T. viride* อีกด้วย (Score; et al. 1997)

เสาวณี สุริยาภณานนท์ และคณะ (2537) รายงานว่า เพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการจำแนกพันธุ์มะขาม (*Tamarindus indica* L., Leguminosae) จากการศึกษาพบว่ามีการสะสมเพอร์ออกซิเดสอยู่ในผนังเซลล์ผิว (epidermis) พบในไซโทซอลของเซลล์แพลิเซด (palisade) เซลล์สปันจี (spongy) และเซลล์ที่ทำหน้าที่ลำเลียงน้ำและอาหารของเซลล์เนื้อเยื่อลำเลียงน้ำและอาหาร เช่นเดียวกับเพอร์ออกซิเดสในกระหล่ำปลี (*Brassica oleracea*) (Yazdi; et al. 2002) ลือชัย อารยะรังสฤษฎ์ และ สุภาพร จันทร์บัวทอง (2553) พบว่า ข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี 1 ดอกพะยอม หางยี 71 และสุพรรณบุรี 90 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสปอร์เชื้อรา *Pyricularia grisea* มีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นจากต้นที่ไม่ได้รับการกระตุ้น

วสันต์ ตั้งโภคานนท์ และคณะ (2548) รายงานพบ แอทิวิทีของกลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ในเม็ดเลือดของสุนัข ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย H_2O_2 ให้กลายเป็นโมเลกุลของน้ำ ในภาวะความเครียดออกซิเดชัน เช่นเดียวกับ สุวิตา เจริญศรี และคณะ (2551) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของกลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดสในประชาชนที่ได้รับพิษจากสารหนู ซึ่งพบว่า ในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสารหนูจะมีแอคทิวิทีของกลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดสต่ำลง โครงสร้างของเพอร์-ออกซิเดสจากยุง (*Aedes aegypti*) มีลักษณะเป็นฮีโมโปรตีนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 5 ตำแหน่ง และมี Ca^{2+} เช่นเดียวกับโครงสร้างของเพอร์ออกซิเดสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และพบโปรตีนของ *Ae*Pox ในยุงทุกวัย (Zhoa; et al. 2001)

การใช้ประโยชน์ของเพอร์ออกซิเดส

เพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกเดชันกับซับสเทรต เช่น ฟีนอล และสารประกอบอะโรมาติกเอมีน ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์อย่างมากมาย ดังนี้

1. การบำบัดน้ำเสีย

น้ำเสียจากอุตสาหกรรมพลาสติก กระดาษ ปิโตรเคมี และอุตสาหกรรมเคมี จะมีสารประกอบฟีนอลและสารประกอบอะโรมาติกเอมีน ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม (Nicell; et al. 1993) จึงต้องกำจัดสารเหล่านี้ก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ เพอร์ออกซิเดสจากรา *Coprinus cinereus* สามารถบำบัดน้ำเสียที่มีความเข้มข้นของฟีนอล 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ร้อยละ 65 พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในกรณีที่มีเอนไซม์จำกัดเท่ากับ 9 และที่พีเอชในช่วง 5 – 9 ในสภาวะที่มีเอนไซม์เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา (Massuda; et al. 2001) เช่นเดียวกับเพอร์ออกซิเดสจากถั่วเหลือง สามารถกำจัด 2,4-dichlorophenol ได้ร้อยละ 90 และทำงานในสภาวะที่เป็นกรดได้ เช่นเดียวกับฮอร์ทเรดิชเพอร์ออกซิเดส (Kennedy; et al. 2002)

2. การกำจัดสีย้อมสังเคราะห์

เพอร์ออกซิเดสจาก *Pleurotus odtreatus* สามารถกำจัดสี Remazol brilliant blue ได้และยังสามารถกำจัด bromophenol blue ได้ถึงร้อยละ 98 ในขณะที่ heterocyclic dyes, methylene blue และ toluidine blue O สามารถกำจัดได้เพียงร้อยละ 10 เท่านั้น (Shin; et al. 1997) เช่นเดียวกับ ฮอร์ทเรดิชเพอร์ออกซิเดส (HRP) มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมที่ปล่อยออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรม พบว่า HRP ทำงานได้ดีในสภาวะที่พีเอชต่ำกว่า 6 สามารถกำจัดฟีนอลได้ดีที่สุดและรองลงมาคือ ramazol blue และ Cibacron red ตามลำดับ (Bhunia; et al. 2002) ยังมีรายงานการกำจัดสีย้อมด้วยยีสต์ *Debaryomyces polymorphus* และ *Candida tropicalis* และในรา *Umbelopsis isabellina* และ *Penicillium geastrivorus* ที่สามารถกำจัดสีย้อม reactive black 5 ได้ (Yang; et al. 2003)

3. การสังเคราะห์พอลิเมอร์

ฮอร์ทเรดิชเพอร์ออกซิเดสสังเคราะห์สายพอลิเมอร์อะโรมาติก โดยทำปฏิกิริยากับสารประกอบฟีนอล และอะโรมาติกเอมีน ในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เพอร์ออกซิเดสจากปาล์มน้ำมัน (African oil palm) สามารถสังเคราะห์ polyaniline และ sulfonated polystyrene โดยใช้ aniline เป็นต้นแบบในบัฟเฟอร์ที่พีเอช 3.5 สามารถตรวจสอบ polyaniline sulfonated polystyrene ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Sakharov; et al. 2003)

4. การวิเคราะห์ enzyme – linked immunosorbant assay (ELISA)

ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ELISA เป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูงในระดับจีนัสและมีความไวในการทดสอบร้อยละ 85 – 94 และความจำเพาะใช้ในการตรวจสอบเป้าหมายในตัวอย่างโดยใช้แอนติบอดี 2 ชนิด โดยชนิดแรกมีความจำเพาะกับสารเป้าหมายซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติเจน ชนิดที่ 2 จะจับเอนไซม์เพื่อบอกตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างครั้งละมากๆ (ฐากรณ์ สอนวัฒนา. 2544) มีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการวินิจฉัยโรคและในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเฮพาแรนซัลเฟตโปรติโอกลัยแคนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ HRP โดยใช้ glutaraldehyde เพื่อสร้างหมู่ aldehyde และจับกับ primary amine ของโมโนโคลนอลแอนตีบอดี จากการตรวจสอบด้วย SDS – PAGE พบแถบขนาด 194 KDa จากการศึกษาพบว่าสามารถติดฉลากแอนติบอดีโคลน 1E4-1C2 ด้วย HRP ได้และยังสามารถทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจำเพาะในการตรวจหาแอนติเจนด้วยเทคนิค direct และ sandwich ELISA ได้ (นิตยา จันซิว; และคณะ. 2551)

5. การเกษตร

ความสัมพันธ์ของข้าวต่อโรคไหม้จากเชื้อรา *Pyricularia grisea* พบว่า ข้าวสายพันธุ์ปทุมธานี1, ดอกพะยอม, หางยี 71 และสุพรรณบุรี 90 ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยสปอร์เชื้อรา *Pyricularia grisea* มีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการกระตุ้น ซึ่งเกิดจากกลไกการป้องกันตนเองของพืช (ลือชัย อารยะรังสฤษฎ์; และ สุภาพร จันทร์บัวทอง. 2553) และรายงานของ ธนวัชน์ ธนศรีสถิต (2546) พบว่า เกลือ NaCl มีผลต่อปริมาณ Ascorbate peroxidase (APX) ในไซยาโนแบคทีเรีย *Aphanothece halophytica* ที่ความเข้มข้นของเกลือ Nacl 0.5 M และ 2.0 M มีแอคทิวิทีจำเพาะของ APX เท่ากับ 0.52 และ 0.48 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl เท่ากับ 50 – 300 mM พบว่า APX ทำงานได้ดีซึ่งสามารถสรุปได้ว่า APX จาก *A. halophytica* สามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีความเค็ม

การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเพอร์ออกซิเดส

การทำให้เพอร์ออกซิเดสมีความบริสุทธิ์สามารถทำได้โดยอาศัยหลักการแยกตามลักษณะทางกายภาพและชีวภาพ ซึ่งมีผู้ทำการศึกษาดังนี้

เพอร์ออกซิเดสจากมันสำปะหลังทำให้บริสุทธิ์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 40 – 80 จากนั้นทำโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะโดยใช้คอลัมน์ concanavalin A และโครมาโทกราฟีแบบแยกขนาดบนคอลัมน์ sephadex G – 200 ตามลำดับ พบว่า เพอร์ออกซิเดสมีความบริสุทธิ์ขึ้น 16 เท่า และมีแอคทิวิทีจำเพาะ 560 U/mg protein มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 105 KDa และเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS – PAGE พบว่าโปรตีนมีน้ำหนัก 54 KDa มีคุณลักษณะเป็นไกลโคโปรตีน พบว่า 3% TFMS สามารถลดปริมาณคาร์โบไฮเดรตได้ลดลงร้อยละ 50 ซึ่งทำให้ค่า K_m ใน

การเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของ H_2O_2 DAB guaiacol *o*–dianisidine pyrogallol ลดลง (ฐากรณ์ สอนวัฒนา. 2544)

เพอร์ออกซิเดสจากกระหล่ำปลีทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 60 – 80 ให้แอคทิวิทีสูงสุดเท่ากับ 1432.65 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นจึงทำการตกตะกอนในช่วง 20 – 80 พบว่าเพอร์ออกซิเดสที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 3.82 เท่า และให้ผลผลิตร้อยละ 58.50 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ เพอร์ออกซิเดสมีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 125 µM และ 17.2 µmol/min·mg protein ตามลำดับ (ชะอรทิพย์ แย้มด้วง; และคณะ. 2553)

เพอร์ออกซิเดสจาก Tartary buckwheat bran ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้คอลัมน์ DEAE–sepharose CL 6B และทำโครมาโทกราฟีแบบแยกขนาดโดยใช้คอลัมน์ sephacrayl S–200 บริสุทธิ์ขึ้น 53.8 เท่า และพบว่าเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34 KDa โดยมีแอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 656.6 U/mg protein พบว่า แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลงร้อยละ 56 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งสูงกว่าฮอร์ทเรดิชเพอร์ออกซิเดส (HRP) ในภาวะทดลองเดียวกัน (Zhang; et al. 1999)

เพอร์ออกซิเดสจากผลมะกอก (*Olea europaea* L.) เป็นเพอร์ออกซิเดสชนิด cationic และ anion อย่างละ 4 ตัวอย่าง พบว่า เพอร์ออกซิเดสชนิด anionic มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20 KDa ประกอบด้วยอะราบิโนส (arabinose) 39 mol% และกรดแกแลกทูโลนิก (galacturomic acid) 38 mol% ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสายพอลิเมอร์เพกทิน มีค่า *pI* เท่ากับ 4.4 อุณหภูมิและพีเอชที่ให้แอคทิวิทีดีที่สุดเท่ากับ 34.7 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ ค่า K_m ของ phenol และ H_2O_2 เท่ากับ 41.0 และ 0.53 ตามลำดับ พลังงานที่ POD_{a4} ใช้ออกซิไดซ์ phenol เท่ากับ 99.1 kJ/mol เอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพที่อุณหภูมิ 36.5 องศาเซลเซียส (Saraiva; et al. 2007)

เพอร์ออกซิเดสจากเรดบีท (*Beta vulgaris* L.) และทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE–cellulose พบว่า เพอร์ออกซิเดสที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 15 เท่า มีแอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 10,500 U/mg protein จากการทำ SDS–PAGE พบว่า โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 45 KDa เพอร์ออกซิเดสเสถียรที่พีเอช 5.0 และลดเหลือร้อยละ 70 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพอร์ออกซิเดสมีความจำเพาะต่อออร์โทไดอะนิซิดีน (orthodianisidine) โดยถูกยับแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสด้วย periodate (HIO_6^-) และโซเดียมเอไซด์ (sodium azide, NaN_3) (Rudrappa; et al. 2007)

เพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย *Anabaena* sp. PCC 7120 เป็นฮีมเพอร์ออกซิเดส (heme peroxidase) ทำให้บริสุทธิ์โดยทำโครมาโทรกราฟีโดยใช้คอลัมน์ Toyopearl DEAE–650M ตามด้วยคอลัมน์ Toyopearl Butyl–650M และคอลัมน์ Hypatite C พบว่า เพอร์ออกซิเดสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 50.5 เท่า แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 283 U/mg protein มีลักษณะเป็น tetrameric

protein มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 53 KDa และค่า Isoelectic point (*pI*) เท่ากับ 3.68 ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 4.0 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ค่า K_m และค่า k_{cat}/K_m ของ H_2O_2 เท่ากับ 5.8 M และ 6.6 $\times 10^6$ $M^{-1}s^{-1}$ ตามลำดับ และยังมีคุณสมบัติในการกำจัดสีย้อมได้ดีเช่นเดียวกับฮอร์ท-เรดิชเพอร์ออกซิเดส และ fungal DyPs อีกด้วย (Yoshihiro; et al. 2009)

เพอร์ออกซิเดสจากตำลึงมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 17.45 เท่า มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45 KDa ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 7.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยเอนไซม์จะถูกกระตุ้นด้วย Cu^{2+} และ Ca^{2+} และถูกยับยั้งด้วย Cr^{3+} และ Hg^{2+} ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ (Kongwithtaya; et al. 2010)

เพอร์ออกซิเดสจากเห็ดนางรมหลวง (*Pleurotus eryngii* Quel.) ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุและแบบแยกขนาด พบว่า เพอร์ออกซิเดสมีน้ำหนักโมเลกุลและค่า Isoelectic point (*pI*) เท่ากับ 40 KDa และ 4.1 ตามลำดับ ซับสเทรตที่ใช้คือ 2, 2–azino–bis–(3–ethylbenzothaizoline–6–sulphonic acid) พบว่า พีเอชและอุณหภูมิที่ให้แอคทิวิทีที่ดีที่สุดเท่ากับ 3.0 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ค่า V_{max} และ K_m เท่ากับ 188.68 U/mg protein และ 203.09 µmol/L (Chen; et al. 2010)

เพอร์ออกซิเดสจากหัวไชเท้าดำ (*Raphanus sativus* L.) โดยการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ร้อยละ 20 – 60 แล้วทำไดอะไลซีส พบว่า เพอร์ออกซิเดสมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 1.8 เท่า จากนั้นทำโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้คอลัมน์ CM–sephadex พบว่า เพอร์ออกซิเดสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.7 เท่า และผลผลิตสุดท้ายคิดเป็นร้อยละ 2 จากการวิเคราะห์ด้วย Native–PAGE และ SDS–PAGE พบโปรตีน 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66 kDa ให้ K_m และ V_{max} โดยคำนวณจาก Lineweaver–Burk โดยใช้ guaiacol (2–methoxyphenol) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นซับสเทรตมีค่าเท่ากับ 0.036±0.08 mM และ 0.0084±0.003 mM ตามลำดับ เพอร์ออกซิเดสให้แอคทิวิทีได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 ที่อุณภูมิ 45 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ 1.0 M (Sisecioglu; et al. 2010)

แอนไอออนิกเพอร์ออกซิเดส (anionic peroxidase) จากรากฮอร์ทเรดิช (POIII) โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ร้อยละ 75 ไดอะไลซีส และโคมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้คอลัมน์ DEAE–sepharose CL–6B และแบบแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephacryl S–200 พบว่า POIII มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 29.3 เท่า โดยมีแอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 26,805 U/mg protein จากวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS–PAGE พบโปรตีน 1 แถบขนาด 56 KDa เอนไซม์ให้แอคทิวิทีสูงใน *o*–phenylenediamine และ guaiacol ในขณะที่ให้แอคทิวิทีปานกลางใน *o*–diaisidine และให้แอคทิวิทีต่ำใน pyrogallol และ ρ–aminoantipyrine จากการศึกษาพบว่า POIII ให้แอคทิวิทีที่ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และแอคทิวิทีลดลงร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอช 4 – 8 โดย POIII ให้

แอคทิวิทีมากกว่าร้อยละ 50 ที่พีเอช 5.5 POIII ให้แอคทิวิทีที่ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 5 mM Fe^{3+} ให้แอคทิวิทีเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 160 ในขณะที่แอคทิวิทีถูกยับยั้งในโลหะต่างๆ (Mohamed. 2011)

เพอร์ออกซิเดสจากกระถิน (*Leucaena leucephala*) สามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 89.3 เท่า โดยมีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 KDa โดยทำงานได้ดีที่พีเอช 5.0 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยแอคทิวิทีของเอนไซม์จะถูกกระตุ้นด้วย Na^{+} และถูกยับยั้งด้วย Ca^{2+} และ Mn^{2+} ที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 mM โดยที่ sodium azide ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Veda; & Dwivedi. 2011)

เพอร์ออกซิเดสจากผักขม (*Spinacia oleracea* L.) ทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้คอลัมน์ CM–sephadex A–50 พบว่า เพอร์ออกซิเดสมีความบริสุทธิ์ขึ้น 22.6 เท่า ให้แอคทิวิทีที่ดีที่สุดที่พีเอช 5.2 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นของอิออน 75 mM จลศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสโดยใช้ Guaiacol และ Catechol เป็นซับสเทรต พบว่า ค่า K_m เท่ากับ 17.35 และ 1234 mM และ V_{max} เท่ากับ 1234 และ 645 EUmLmin^{-1} ตามลำดับ (Koksal. 2011)

เพอร์ออกซิเดสจากใบอินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.) โดยทำโครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้คอลัมน์ DEAE–Sepharose และแบบแยกขนาดโดยใช้คอลัมน์ Superdex 200 พบว่า เพอร์ออกซิเดสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 15 เท่า ผลผลิตสุดท้ายคิดเป็นร้อยละ 5.8 ทำ native–PAGE และ SDS–PAGE พบโปรตีน 1 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 55 KDa เพอร์ออกซิเดสให้แอคทิวิทีที่ดีที่สุดที่พีเอชในช่วง 5 – 6 อุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสแอคทิวิทีลดลงร้อยละ 42 ค่า K_m ของ guaiacol และ H_2O_2 เท่ากับ 0.77 และ 0.045 ตามลำดับ เอนไซม์มีแอคทิวิทีสูงขึ้นใน Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} และ Fe^{2+} และถูกยับยั้งด้วย Cd^{2+} (Al–Senaidy; & Ismael. 2011)

จากงานวิจัยเกี่ยวกับการทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเพอร์ออกซิเดส สามารถสรุปได้ว่าขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์และในการศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจะขึ้นอยู่กับการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ โดยมีขั้นตอนที่แตกต่างกันออกไป แสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 แหล่งผลิตพอร์ออกซิเดส และสมบัติบางประการ

แหล่ง	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	Native KDa	SDS KDa	K_m	pH	Temperature (C°)	ตัวเร่ง	ตัวยับยั้ง	อ้างอิง
1. มันสำปะหลัง (Manihot *esculenta Crantz*)	1.ตกตะกอนด้วย $NH_2(SO)_4$ 2.Concanavalin 3.Sephadex G – 200	105	54	-	5	50	-	-	ฐากรณ์ สอนวัฒนา 2544
2.กะหล่ำปลี	ตกตะกอนด้วย $NH_2(SO)_4$	-	-	125	7.0	40	-	-	ชะอรทิพย์ แย้มด้วง และคณะ 2553
3.Tartary buckwheat bran	1.ตกตะกอนด้วย $NH_2(SO)_4$ 2.DEAE – Sepharose CL6B	34	34	-	6.5	-	-	-	Zhang; et al. 1999
4.ผลมะกอก (*Olea europaea* L.)	-		20	41.0	7.0	34.7	-	-	Saraiva; et al. 2007
5.เรดบีท (*Beta vulgaris* L.)	1.ตกตะกอนด้วย $NH_2(SO)_4$ 2.DEAE – Cellulose	-	45	-	5.0	-	-	1.periodate 2.sodium azide	Rudrappa; et al. 2007

ตาราง 1 (ต่อ)

แหล่ง	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	Native KDa	SDS KDa	K_m	pH	Temperature (C°)	ตัวเร่ง	ตัวยับยั้ง	อ้างอิง
6. *Anabaena* sp. PCC 7120	1. Toyopearl DEAE – 650M 2. Toyopearl Butyl – 650M 3. Hypatite C	-	53	5.8	4	35	-	-	Yoshihiro; et al. 2009
7. ผักตำลึง (Ivy groun)	1.ตกตะกอนด้วย $NH_2(SO)_4$ 2. DEAE – Cellulose 3.Sephadex G – 100	45	45	93	7.0	40	Cu^{2+},Ca^{2+}	Cr^{3+},Hg^{2+}	Kongwithtaya; et al. 2010
8. เห็ดนางรมหลวง *Pleurotus eryngii*	1.ตกตะกอนด้วย $NH_2(SO)_4$ 2.DEAE 3. S – 200I 4. S - 200II	40	-	203.09	3.0	50	-	-	Chen; et al. 2010
9.หัวไชเท้าดำ (*Raphanus sativus* L.)	1.ตกตะกอนด้วย $NH_2(SO)_4$ 2. CM - Sephadex	66	66	36	6.0	45	-	-	Sisecioglu; et al. 2010
10.ฮอร์ทเรดิช (Horseradish root)	1.ตกตะกอนด้วย $NH_2(SO)_4$ 2.DEAE – sepharose CL – 6B 3.Sephacryl S – 200	56	56	-	5.5	40	Fe^{3+}	Metal ion	Mohamed. 2011

ตาราง 1 (ต่อ)

แหล่ง	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	Native KDa	SDS KDa	K_m	pH	Temperature (C°)	ตัวเร่ง	ตัวยับยั้ง	อ้างอิง
11. ผักกระถิน (*Leucaenal eucephala*)	1.ตกตะกอนด้วย $NH_2(SO)_4$ 2. DEAE – Cellulose 3.Sephadex G – 200 4. Concanavallin-A	200	66 และ 58	2.9	5.0	55	Na^{+}	Ca^{2+}, Mn^{2+}	Veda; & Dwivedi. 2011
12. ผักขม (*Spinacia oleracea* L.)	1.ตกตะกอนด้วย $NH_2(SO)_4$ 2. CM – sephadex A – 50	-	-	17.35	5.2	60	-	-	Koksal. 2011
13.ใบอินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.)	1. DEAE – Sepharose 2. Superdex 200	55	55	0.77	5.5	55	Ca^{2+}, Mg^{2+} Mn^{2+}, Zn^{2+} Fe^{2+}	Cd^{2+}	Al – Senaidy; & Ismael. 2011

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา

1.*Nostoc* sp. จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2.*Tolypothrix* sp.จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.*Oscillatoria* sp. จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

4.*Synechocystis* sp. PCC 6803 จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.*Synechococcus* sp. PCC 7942 จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจสอบแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสและหาปริมาณโปรตีน

ตรวจหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Nostoc* sp. *Tolypothrix* sp. *Oscillatoria* sp. *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *Synechococcus* sp. PCC 7942 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Kongwithtaya (2010) โดยผสมสารละลาย 50 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0, 2 mM 4 – AAP, 2mM gallic acid, 4mM hydrogenperoxide ปริมาตรสุทธิ 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะทดลอง และหาปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Bradford (1976) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) จากนั้นคัดแยกไซยาโนแบคทีเรียที่ให้แอคทิวิทีจำเพาสูงสุดทำการศึกษาต่อไป คือ *Oscillatoria* sp.

การทำให้เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์

นำไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria sp.* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร BG_{11} อายุ 15 วัน มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 × *g* เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใสและตะกอน จากนั้นล้างตะกอนด้วย 50 mM Tris–HCl buffer, pH 8.0 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 × *g* เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนน้ำหนัก 15 กรัม เติม 50 mM Tris–HCl buffer, pH 9.0 ที่ผสม 0.1 mM EDTA ปริมาณ 50 มิลลิลิตร แตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) ที่ 30% amplitude เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 × *g* เป็นเวลา 20 นาที แยกตะกอน และเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นสารสกัดหยาบเอนไซม์ นำสารสกัดหยาบเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 0 – 20, 20 – 40,

40 – 60, 60 – 80 และ 80 – 100 ตามลำดับ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 × *g* เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใส และล้างตะกอนด้วย 50 mM Tris–HCl buffer, pH 9.0 ทำไดอะไลซีสโดยใช้เยื่อเซลลูโลสในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl buffer, pH 9.0 ทิ้งไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง นำสารละลายมาทำโครมาโตรกราฟฟีแบบแลก-เปลี่ยนประจุโดยเตรียมคอลัมน์ DEAE–cellulose (3 x 42 เซนติเมตร) ปรับสมดุลคอลัมน์ (equilibrate) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris–HCl, pH 7.5 และชะสารตัวอย่างอย่างต่อเนื่องด้วย 0.0 – 0.5 M NaCl ใน 0.05 M Tris–HCl buffer, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร วัดปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm และหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส นำตัวอย่างที่ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงที่สุดมาทำโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G–100 (1.7 × 90 เซนติเมตร) ปรับสมดุลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris–HCl, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร วัดปริมาณโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 nm และหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส ทำ Native–PAGE เพื่อตรวจหาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ และหาน้ำหนักโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสโดยใช้ SDS–PAGE และวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Bradford (1976) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA)

การศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดส

ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

ศึกษาแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ที่ pH 7.0 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส นำค่าที่ได้มาคำนวนและเขียนกราฟแสดงแอคทิวิทีสัมพัทธ์ของเพอร์ออกซิเดสที่อุณหภูมิต่างๆ

ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

ศึกษาแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 50mM ที่มีค่าพีเอชต่างๆ ดังนี้ pH 4 – 5 (Acetate buffer) pH 6 – 7 (Phosphate buffer) pH 8 – 11 (Tris–HCl buffer) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส นำค่าที่ได้มาคำนวนและเขียนกราฟแสดงแอคทิวิทีสัมพัทธ์ของเพอร์ออกซิเดสที่พีเอชต่างๆ

จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดส

ศึกษาจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดส โดยหาค่า K_m และ V_{max} ของเพอร์ออกซิเดสโดยใช้สารละลาย H_2O_2 และ Gallic acid เป็นซับสเทรต จากนั้นนำค่า K_m และ V_{max} ที่ได้มาเขียนกราฟ Linewaver–Burk plot

ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดส

ศึกษาความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดส โดยใช้ gallic acid, phenol caffein และ ascorbic acid วัดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส นำค่าที่ได้มาคำนวนและเขียนกราฟแสดงความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดส

ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

ศึกษาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสภายใต้สภาวะที่มีไอออนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยโดยบ่มเอนไซม์ภาวะที่มี Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}, Cr^{3+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Mg^{2+}, Hg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} Na^{+} และ K^{+} เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดแอคทิวิที แล้วเปรียบเทียบแอคทิวิทีสัมพัทธ์กับแอคทิวิทีของตัวควบคุม

ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ศึกษาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสภายใต้สภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ ยูเรีย (urea) และ sodium dodecyl sulphate (SDS) และในภาวะที่มีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) โดยบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดแอคทิวิที แล้วเปรียบเทียบแอคทิวิทีสัมพัทธ์กับแอคทิวิทีของตัวควบคุม

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรียแสดงดังภาพประกอบ 6

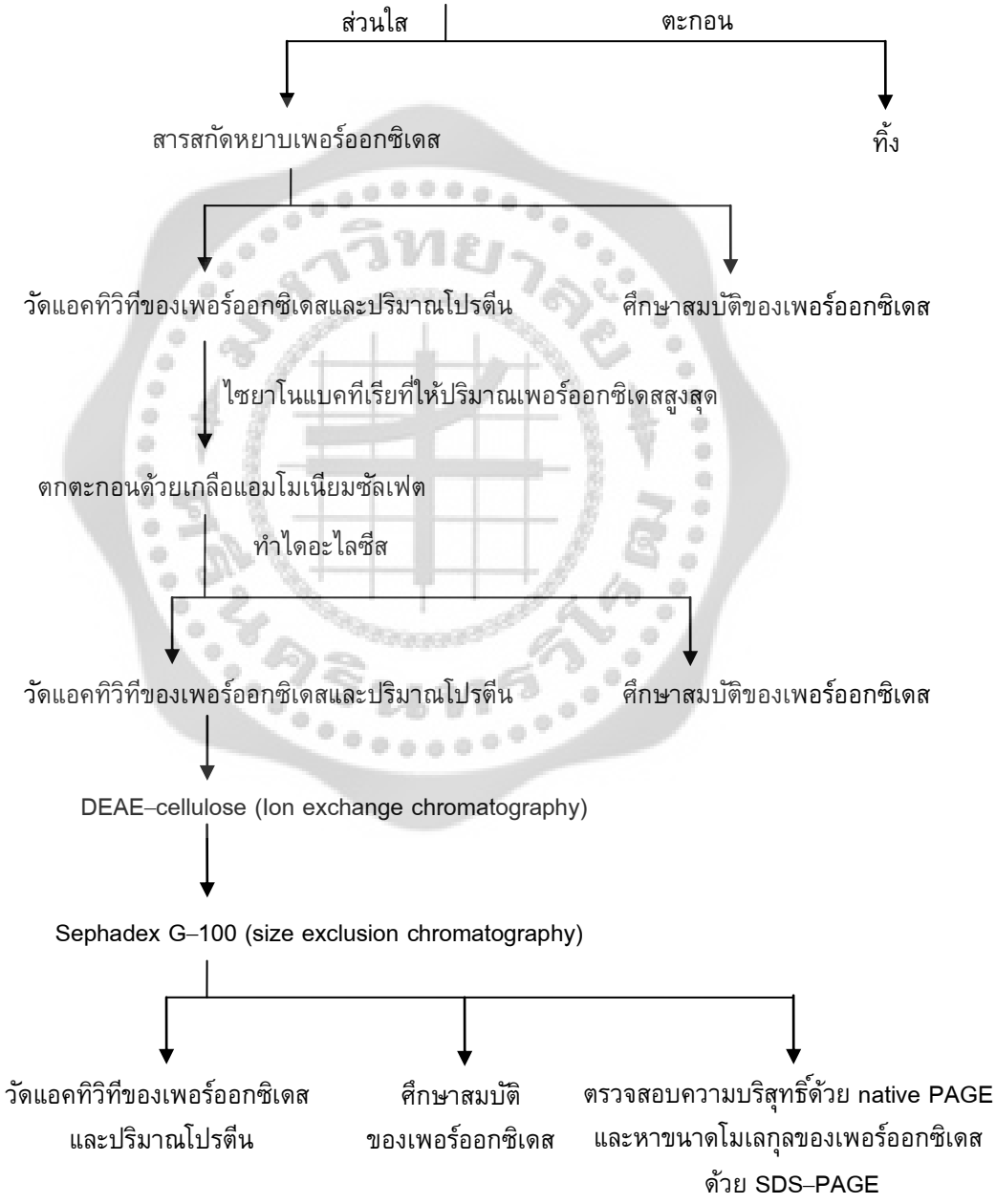
เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Nostoc* sp. *Tolypothrix* sp. *Oscillatoria* sp. *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *Synechococcus* sp. PCC 7942 ในอาหารเลี้ยงชนิด BG_{11} พีเอช 7.6 เวลา 12 – 18 วัน

↓

เก็บเซลล์ด้วยการเซนตริฟิวก์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

↓

นำตะกอนเซลล์ 15 g เติม 50 mM Tris–HCl buffer, pH 9.0 ที่ผสม 0.1 mM EDTA ปริมาณ 50 ml แตกเซลล์ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่ 30% amplitude นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 *x g* เป็นเวลา 20 นาที



ภาพประกอบ 6 ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การศึกษาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *Synechococcus* sp. PCC 7942 ในอาหารเลี้ยงชนิด BG_{11} พีเอช 7.6 ภายใต้แสงขาวเป็นเวลา 12 – 18 วัน จากนั้นเก็บเซลล์ด้วยการเซนตริฟิวก์ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนเซลล์กระจายตัวในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl buffer (pH 9.0) แล้วสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด จากนั้นวัดแอคทิวิทีของสารสกัดหยาบเพอร์ออกซิเดส โดยใช้ 50 mM Tris – HCl buffer (pH 9.0), 2 mM 4 – aminoantipyrine (4 – AAP), 2 mM gallic acid และ 4 mM hydrogen peroxide บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซสเซียส) เป็นเวลา 10 นาที ปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการเติมสารสกัดหยาบเอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV/VIS – spectrophotometer Model Jenway 6405 (Jenway, UK) แสดงผลดังตาราง 2

ตาราง 2 แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด

ไซยาโนแบคทีเรีย	แอคทิวิที (μmol/min/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg protein/ml)	แอคทิวิทีจำเพาะ (Units/mg protein)
Tris – HCl buffer (Negative control)	-	-	-
Oscillatoria sp.	37.68	0.16	235.49
Nostoc sp.	30.85	0.14	220.32
Tolypothrix sp.	21.83	0.11	198.42
Synechocystis sp. PCC 6803	19.71	0.10	197.11
Synechococcus sp. PCC 7942	19.56	0.10	195.56

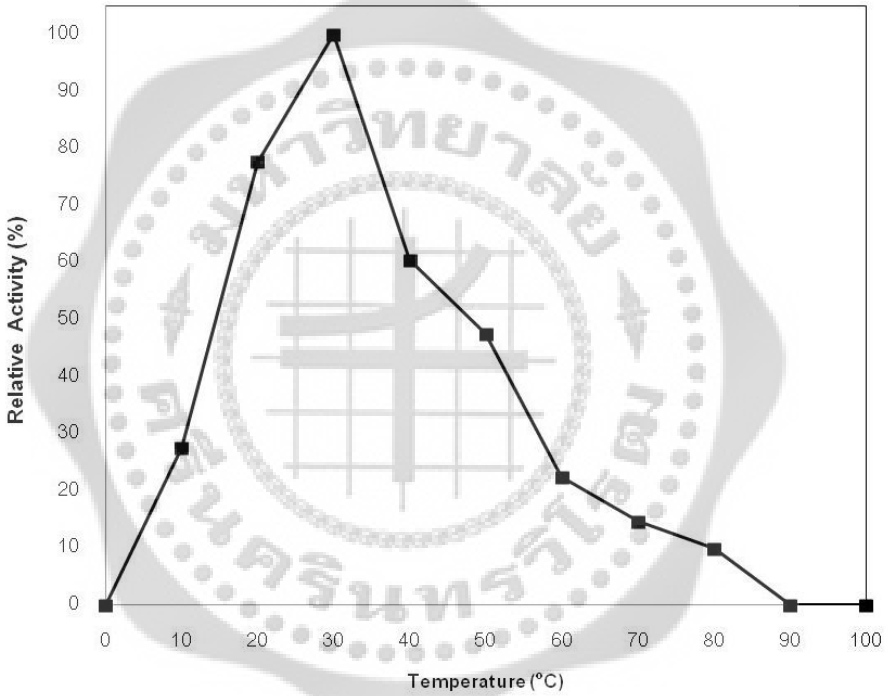
จากตาราง 2 พบว่าไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 235.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาได้แก่ *Nostoc* sp. แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 220.32 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน *Tolypothrix* sp. แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 198.42 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน *Synechocystis* sp. PCC 6803 แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 197.11 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ *Synechococcus* sp. PCC 7942 แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 195.56 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยใช้

สารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl (pH 9.0) เป็นตัวควบคุมที่ไม่มีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส จากการศึกษา พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีจำเพาะของเพอร์ออกซ์เดสสูงสุด จึงเลือกเพื่อทำการศึกษาขั้นตอนต่อไป

สมบัติของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบ บ่มที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl, pH 9.0 เป็นเวลา 30 นาที แล้วหาแอคทิวิที แสดงผลดังภาพประกอบ 7

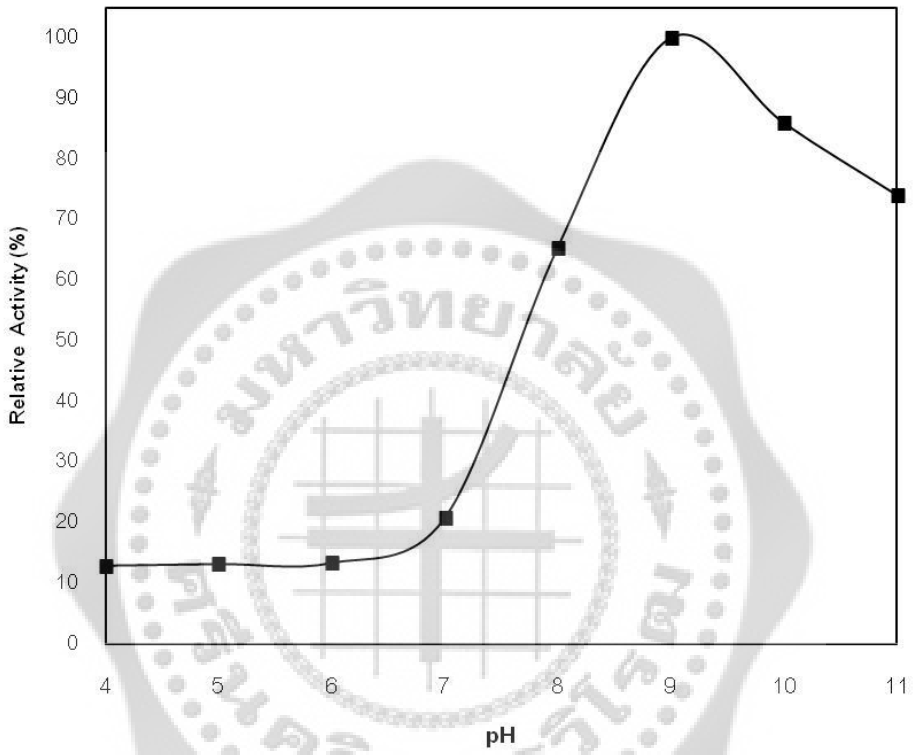


ภาพประกอบ 7 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

จากภาพประกอบ 7 แสดงให้เห็นเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 0 – 90 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นหรือลดลงจาก 30 องศาเซลเซียส แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลง ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิมากกว่า 90 องศาเซลเซียส ไม่มีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบ บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 mM ที่มีค่าพีเอชในช่วง 4 – 11 ดังนี้ พีเอช 4 – 5 (Acetate buffer) พีเอช 6 – 7 (Phosphate buffer) และพีเอช 8 – 11 (Tris – HCl buffer) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส แสดงผลดังภาพประกอบ 8

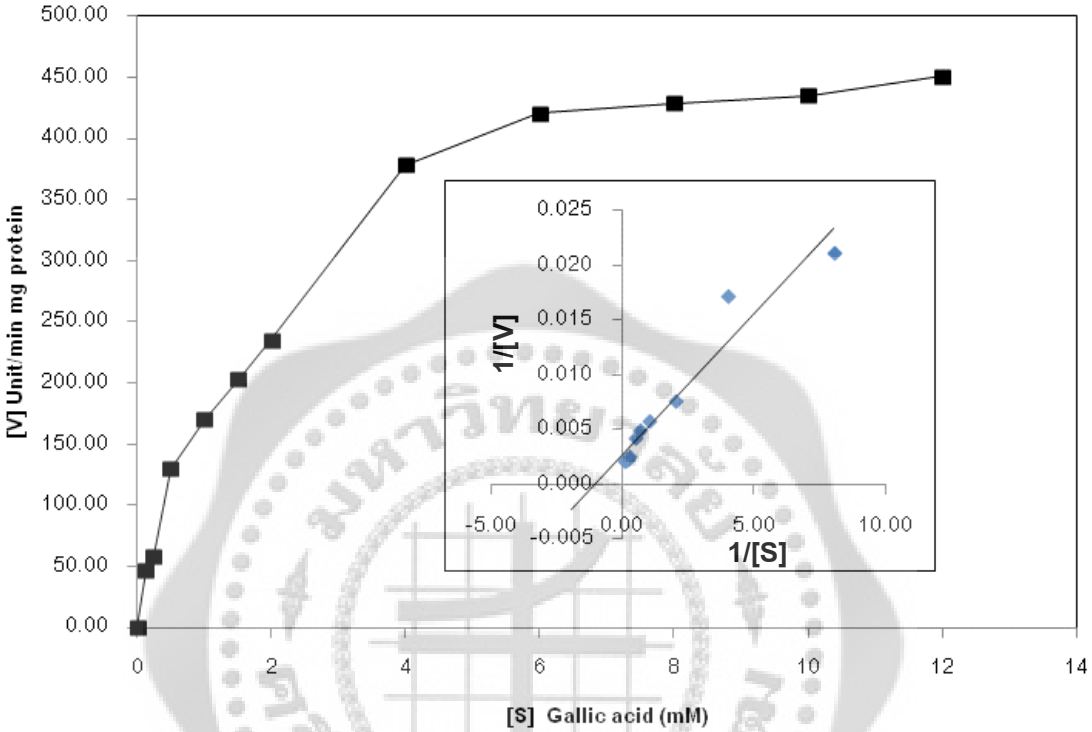


ภาพประกอบ 8 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

จากภาพประกอบ 8 อธิบายได้ว่าเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีทุกช่วงพีเอชที่ทำการศึกษา โดยค่าพีเอชที่ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบสูงที่สุดเท่ากับ 9.0 ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 235.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบเท่ากับพีเอช 9.0 และพบว่าที่พีเอชสูงกว่าหรือน้อยกว่าเพอร์ออกซิเดสมีแอคทิวิทีลดลง โดยแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลงร้อยละ 30 ที่พีเอช เท่ากับ 11.0 และพีเอชน้อยกว่า 7.0 ทำให้แอคทิวิทีลดลงร้อยละ 90 จากการศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. แสดงดังภาพประกอบ 6 และ 7 ทำให้การศึกษาขั้นต่อไปใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl พีเอช 9 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส โดยใช้ gallic acid เป็นซับสเทรต

การศึกษาค่าจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

ศึกษาจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดส หาค่า K_m และ V_{max} โดยใช้ Gallic acid เป็นซับสเทรตที่ความเข้มข้น 0 – 12 mM แล้วหาค่า K_m และ V_{max} แสดงดังภาพประกอบ 9



ภาพประกอบ 9 จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ Gallic acid เป็นซับสเทรต

จากภาพประกอบ 9 พบว่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเทรตสูงที่ความเข้มข้นของ Gallic acid เท่ากับ 0.25 – 4.0 mM โดยมีค่า K_m เท่ากับ 0.96 มิลลิโมลลาร์ และค่า V_{max} เท่ากับ 370.37 ไมโครโมลต่อนาทีมิลลิกรัมโปรตีน

ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตทของเพอร์ออกซิเดส โดยใช้ซับสเทรตเป็น Gallic acid, Phenol, Caffeic acid, และ Ascorbic acid และวัดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส แสดงผลดังตาราง 3

ตาราง 3 ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

ซับสเทรต	ความเข้มข้น (mM)	ค่าดูดกลืนแสง (nm)	แอคทิวิทีจำเพาะ (Units/mg protein)	K_m	V_{max}
Gallic acid	2	400	235.49	0.96	370.37
Caffeic acid	2	400	39.61	0.54	56.18
Ascorbic acid	2	500	41.59	0.68	57.80
Phenol	2	500	55.85	1.00	75.19

จากตาราง 3 พบว่า เมื่อใช้ Gallic acid และ Caffeic acide เป็นซับสเทรต สารละลายดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และเมื่อใช้ Phenol และ Ascorbic cid เป็นซับสเทรตสารละลายดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบมีความจำเพาะต่อ Gallic acid โดยให้แอคทิวิทีจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 235.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาได้แก่ Phenol มีแอคทิวิทีเท่ากับ 55.85 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน Ascorbic acid มีแอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 41.59 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ Caffeic acid มีแอคทิวิทีเท่ากับ 39.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า K_m พบว่า เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบมีความจำเพาะต่อ Caffeic acid สูงสุด เท่ากับ 0.54 มิลลิโมลาร์ รองลงมา ได้แก่ Ascorbic acid, Gallic acid และ phenol ตามลำดับ

ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบ บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl (pH 9.0) ที่เติม 5 50 และ 500 ไมโครโมลาร์ ของ Cr^{3+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Hg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} Na^{+} และ K^{+} แล้วหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสแสดงผลดังตาราง 4

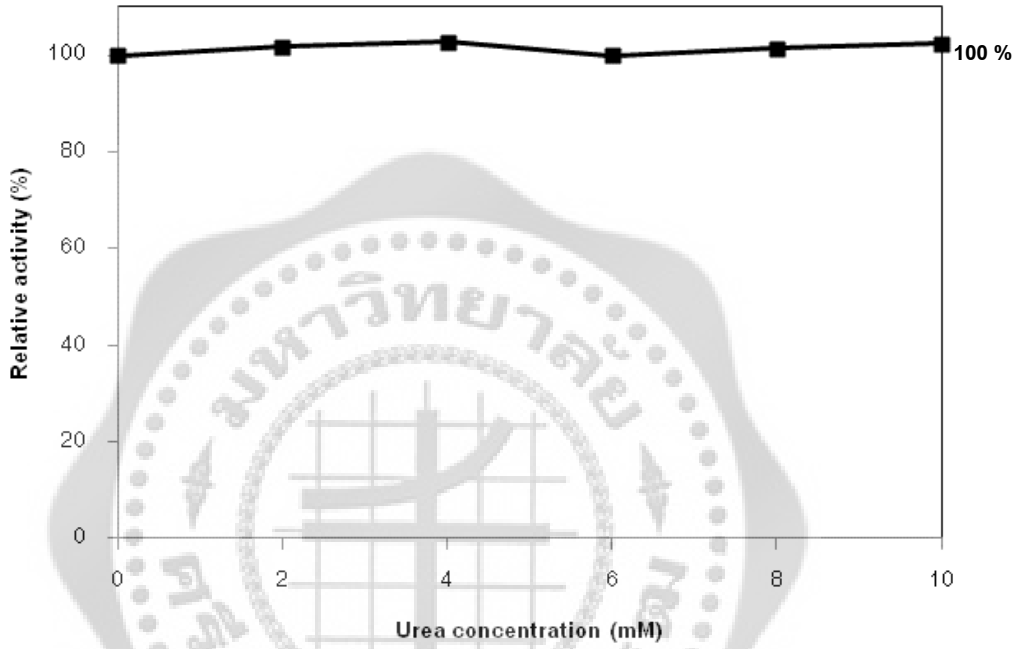
ตาราง 4 ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

ชนิดไอออน	แอคทิวิทีสัมพัทธ์ที่ความเข้มข้นไอออน (%)		
	5 μM	50 μM	500 μM
Na^{+}	138	224	253
K^{+}	102	108	117
Mg^{2+}	227	221	218
Ca^{2+}	104	136	154
Mn^{2+}	112	125	157
Fe^{2+}	100	100	85
Ni^{2+}	137	153	186
Cu^{2+}	100	103	105
Zn^{2+}	66	64	60
Cd^{2+}	100	100	35
Hg^{2+}	81	56	48
Cr^{3+}	98	82	44
Fe^{3+}	123	145	194

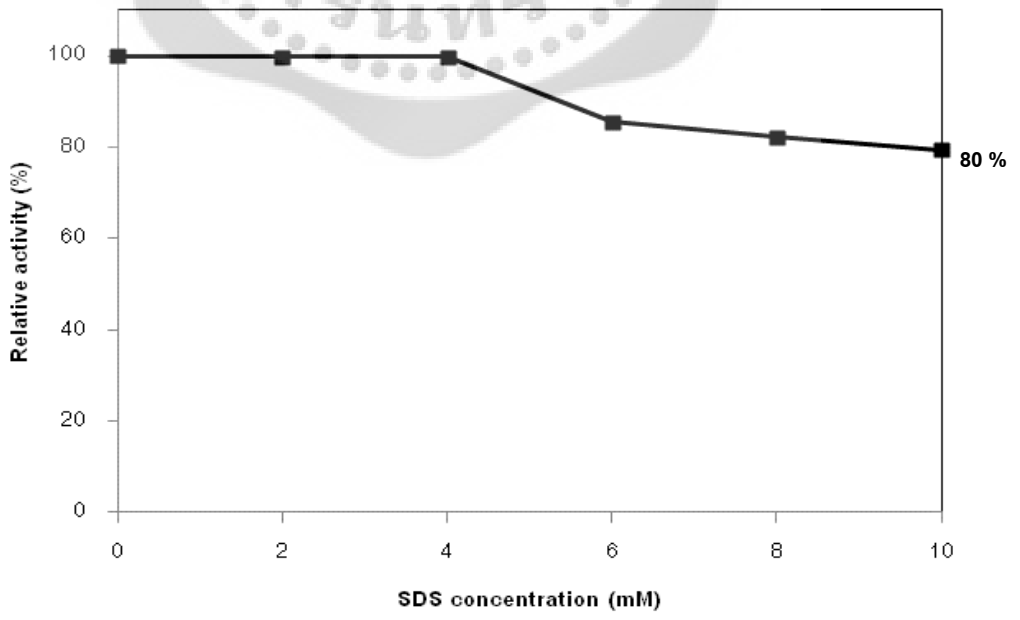
จากตาราง 4 พบว่า เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบถูกกระตุ้นแอคทิวิทีโดย Mg^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, K^{+} และ Cu^{2+} โดย Fe^{2+} และ Cd^{2+} ยับยั้งแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่ความเข้มข้น 5 mM ของ Cr^{3+} Hg^{2+} และ Zn^{2+} ยับยั้งแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่อแอคทิวิทีของเพอร์อกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

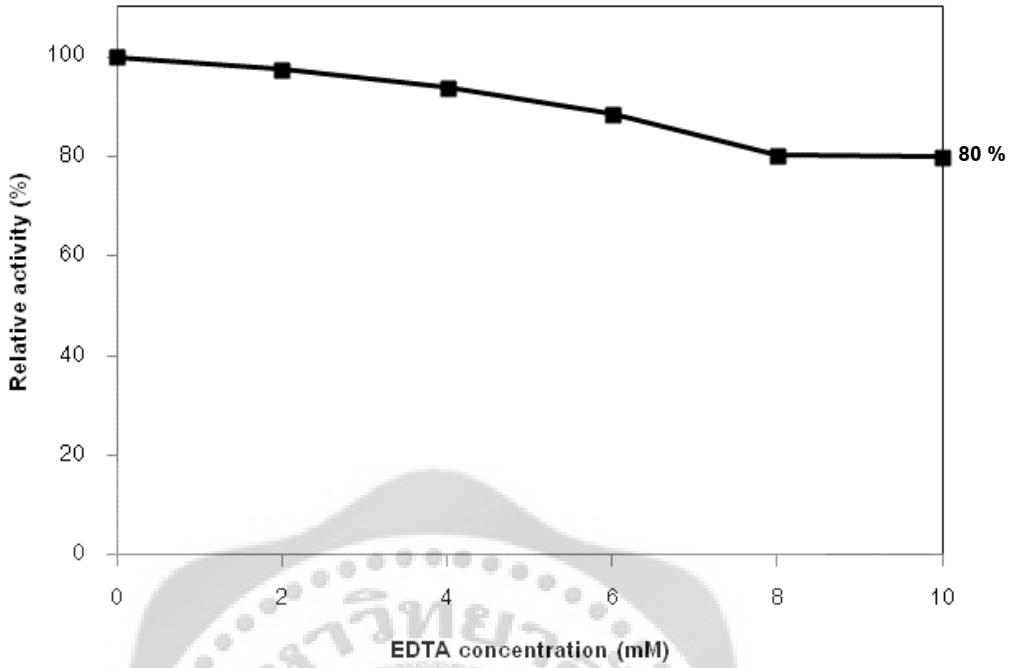
นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบ บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl (pH 9.0) ที่เติม ยูเรีย(Urea) และ Sodium dodecyl sulphate (SDS) และ Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) ความเข้มข้นในช่วง 0 – 10 mM แล้วหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส แสดงผลดังภาพประกอบ 10 – 12



ภาพประกอบ 10 ผลของยูเรียต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.



ภาพประกอบ 11 ผลของ SDS ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.



ภาพประกอบ 12 ผลของ EDTA ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp.

จากภาพประกอบ 10 – 12 ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเพอร์ออกซิเดสโดยใช้ Urea SDS และ EDTA ที่มีความเข้มข้น 0 – 10 mM พบว่า Urea ไม่มีผลต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส ในขณะที่ SDS และ EDTA มีผลต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส โดยที่ความเข้มข้นของ SDS และ EDTA 10 mM ทำให้แอคทิวิทีลดลงเหลือร้อยละ 80

การทำให้เพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรียบริสุทธิ์

การตกตะกอนเอนไซม์สกัดหยาบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Fisher Scientific, USA) เป็นช่วง 0 – 20, 20 – 40, 40 – 60, 60 – 80, และ 80 – 100 แล้วนำมาคำนวนหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสแสดงดังตาราง 5

ตาราง 5 การตกตะกอนเพอร์ออกซิเดสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

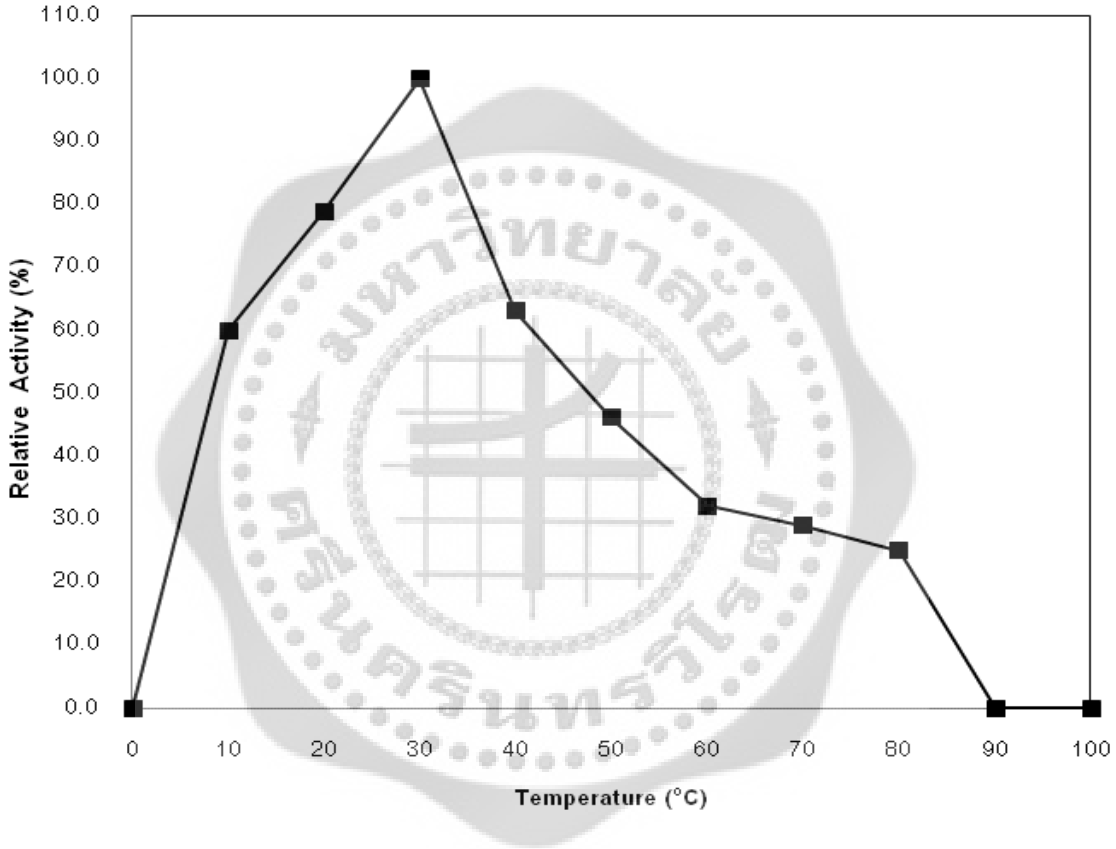
ร้อยละความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต	แอคทิวิทีจำเพาะ (units/mg protein)	ร้อยละผลผลิต (%)	ความบริสุทธิ์ (fold)
เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบ	235.49	100	1.00
0 – 20	105.97	6.23	0.45
20 – 40	310.85	21.36	1.32
40 – 60	581.66	32.21	2.47
60 – 80	828.92	28.64	3.52
80 – 100	61.23	5.49	0.26
0 – 80	755.92	57.98	3.21

จากตาราง 5 พบว่า ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตสูงที่สุดที่ใช้ตกตะกอนเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเท่ากับร้อยละ 80 โดยให้แอคทิวิทีจำเพาะสูงที่สุดที่ร้อยละความอิ่มตัว 60 – 80 ของแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 828.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นในการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจึงเลือกตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 0 – 80 จากนั้นทำการไดอะไลซีส แล้วหาแอคทิวิทีจำเพาะ พบว่าเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 755.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 57.98 และความบริสุทธิ์ 3.21 เท่า จากนั้นศึกษาสมบัติของเอนไซม์ดังนี้

สมบัติของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl, pH 9.0 เป็นเวลา 30 นาที แล้วหาแอคทิวิที แสดงผลดังภาพประกอบ 13

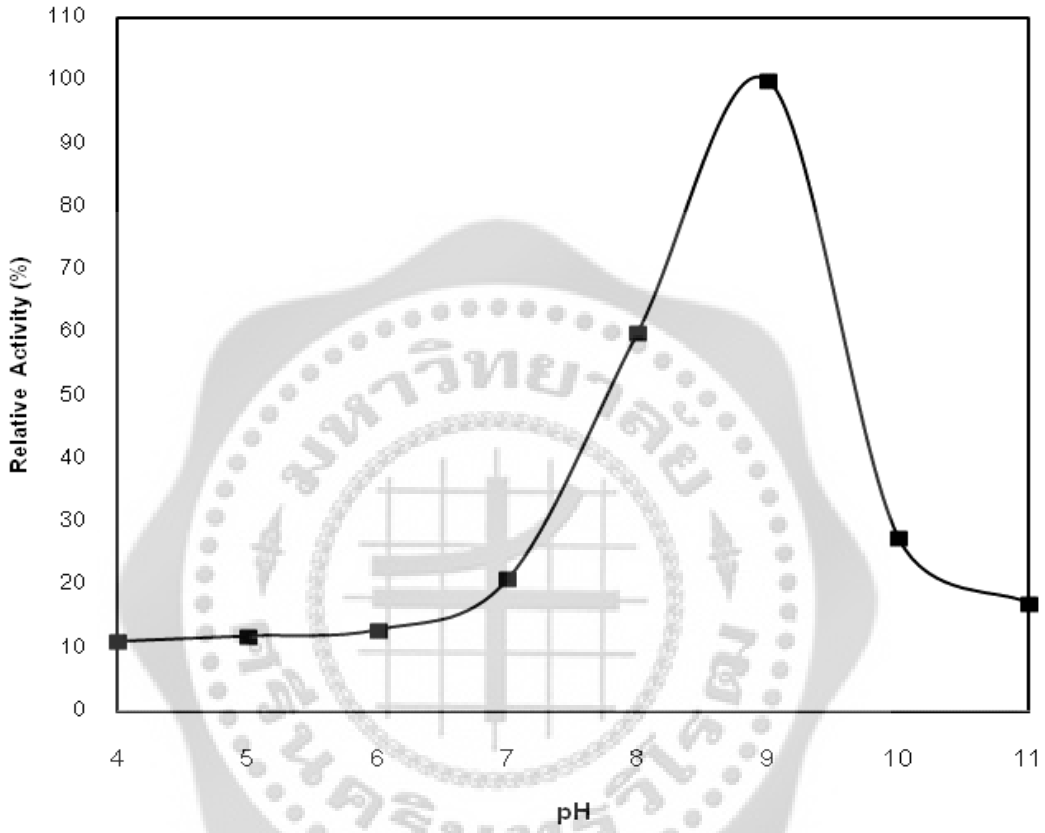


ภาพประกอบ 13 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

จากภาพประกอบ 13 แสดงให้เห็นว่า เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 0 – 90 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส สูงที่สุดเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นหรือลดลงจาก 30 องศาเซลเซียส แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลง ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิมากกว่า 90 องศาเซลเซียส ไม่มีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 mM ที่มีค่าพีเอช ในช่วง 4 – 11 ดังนี้ พีเอช 4 – 5 (Acetate buffer) พีเอช 6 – 7 (Phosphate buffer) และพีเอช 8 – 11 (Tris – HCl buffer) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส แสดงผลดังภาพประกอบ 14



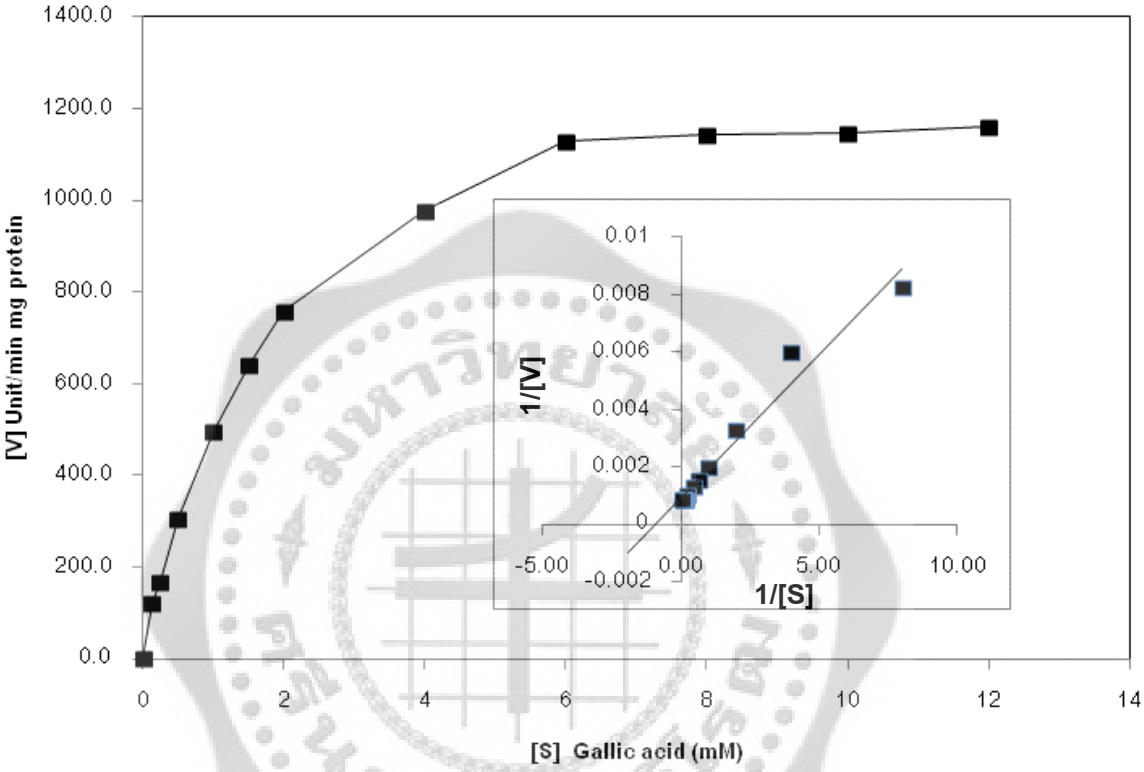
ภาพประกอบ 14 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

จากภาพประกอบ 14 อธิบายได้ว่า เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีทุกช่วงพีเอชที่ทำการศึกษา โดยค่าพีเอชที่ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 9.0 ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 755.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเท่ากับพีเอช 9.0 และพบว่าที่พีเอชสูงกว่าหรือน้อยกว่าพีเอช 9.0 เพอร์ออกซิเดสมีแอคทิวิทีลดลง โดยแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลงร้อยละ 70 ที่พีเอชเท่ากับ 10.0 และพีเอชน้อยกว่า 7 ทำให้แอคทิวิทีลดลงร้อยละ 90

จากการศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. แสดงดังภาพประกอบ 13 – 14 ทำให้การศึกษาขั้นต่อไปใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl พีเอช 9 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส โดยใช้ gallic acid เป็นซับสเทรต

การศึกษาค่าจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

ศึกษาจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน โดยคำนวนหาค่า K_m และ V_{max} โดยใช้ Gallic acid เป็นซับสเทรตที่ความเข้มข้น 0 – 12 mM แล้วหาค่า K_m และ V_{max} แสดงดังภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ Gallic acid เป็นซับสเทรต

จากภาพประกอบ 15 พบว่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเทรตสูงที่ความเข้มข้นของ Gallic acid เท่ากับ 0.5 – 4.0 mM โดยมีค่า K_m เท่ากับ 1.11 มิลลิโมลลาร์ และค่า V_{max} เท่ากับ 1111.11 ไมโครโมลต่อนาทีมิลลิกรัมโปรตีน

ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตทของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน โดยใช้ซับสเทรตเป็น Gallic acid, Phenol, Caffeic acid, และ Ascorbic acid และวัดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส แสดงผลดังตาราง 6

ตาราง 6 ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

ซับสเทรต	ความเข้มข้น (mM)	ค่าดูดกลืนแสง (nm)	แอคทิวิทีจำเพาะ (Units/mg protein)	K_m	V_{max}
Gallic acid	2	400	755.92	1.11	1111.11
Caffeic acid	2	400	391.73	0.737	526.32
Ascorbic acid	2	500	565.62	0.692	769.23
Phenol	2	500	532.82	0.643	714.29

จากตาราง 6 พบว่า เมื่อใช้ Gallic acid และ Caffeic acide เป็นซับสเทรต สารละลายดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และเมื่อใช้ Phenol และ Ascorbic cid เป็นซับสเทรต สารละลายดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนมีความจำเพาะต่อ Gallic acid ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 755.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาได้แก่ Ascorbic acid มีแอคทิวิทีเท่ากับ 565.62 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน Phenol มีแอคทิวิทีเท่ากับ 532.82 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ Caffeic acid มีแอคทิวิทีเท่ากับ 391.74 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl (pH 9.0) ที่เติม 5 50 และ 500 ไมโครโมลาร์ ของ Cr^{3+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Hg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} Na^{+} และ K^{+} แล้วหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส แสดงผลดังตาราง 7

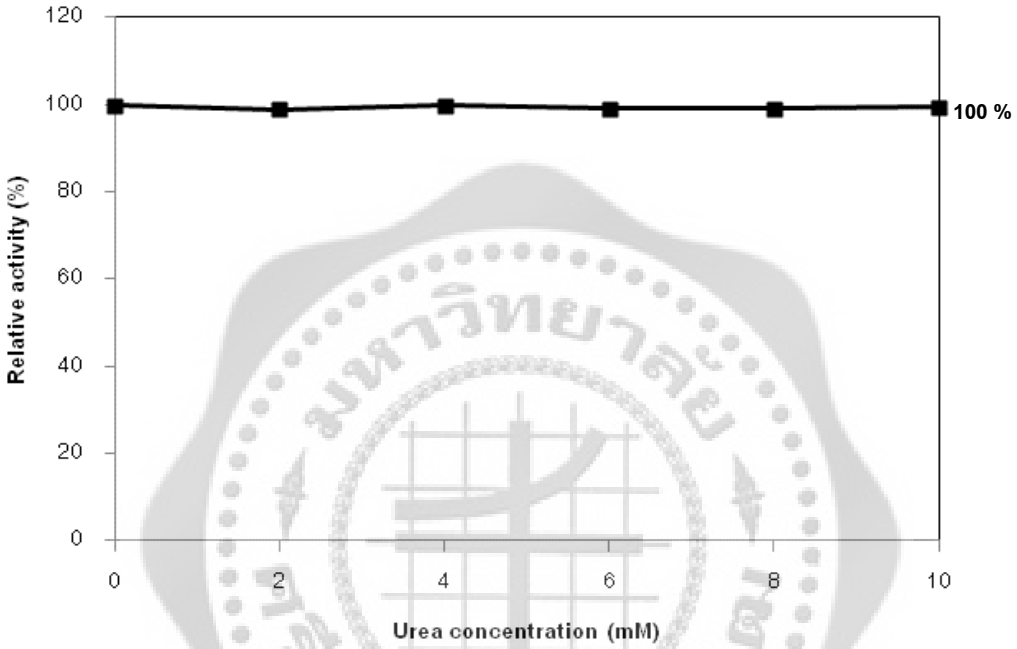
ตาราง 7 ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

ชนิดไอออน	แอคทิวิทีสัมพัทธ์ที่ความเข้มข้นไอออน (%)		
	5 µM	50 µM	500 µM
Na^{+}	130	220	225
K^{+}	100	98	95
Mg^{2+}	107	210	221
Ca^{2+}	107	116	124
Mn^{2+}	207	100	95
Fe^{2+}	110	110	85
Ni^{2+}	103	110	201
Cu^{2+}	95	80	45
Zn^{2+}	100	70	60
Cd^{2+}	100	90	55
Hg^{2+}	80	62	15
Cr^{3+}	100	85	65
Fe^{3+}	186	205	207

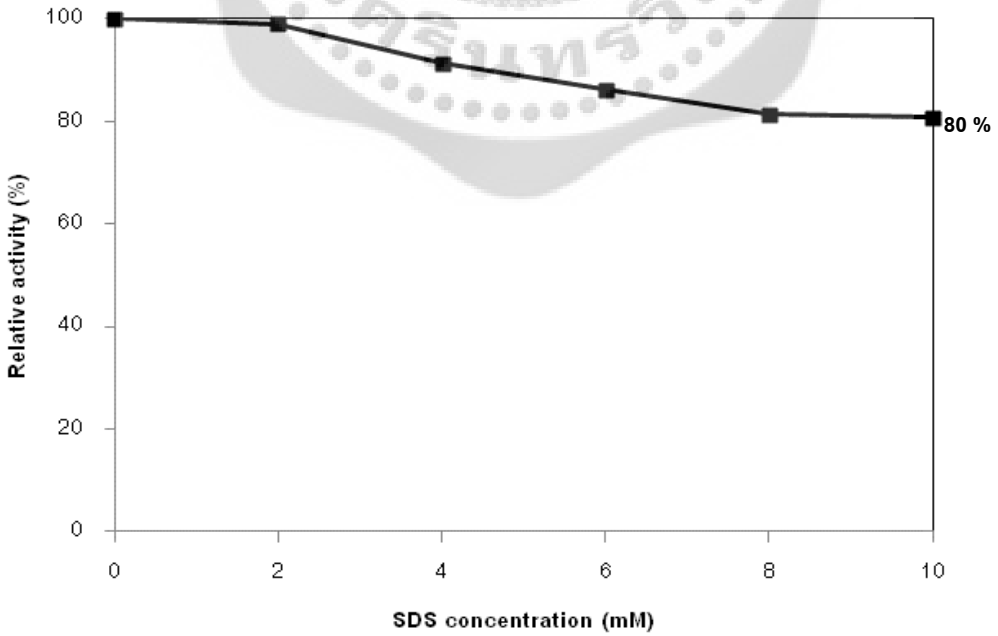
จากตาราง 7 พบว่า เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนถูกกระตุ้นแอคทิวิทีโดย Mn^{2+}, Fe^{3+}, Na^{+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} และ Ni^{2+} โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ของ Mn^{2+} และ Fe^{2+} แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลง ในขณะที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ของ Cd^{2+} แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลงร้อยละ 50 และเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย Cr^{3+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Hg^{2+} ที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครโมลาร์

ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

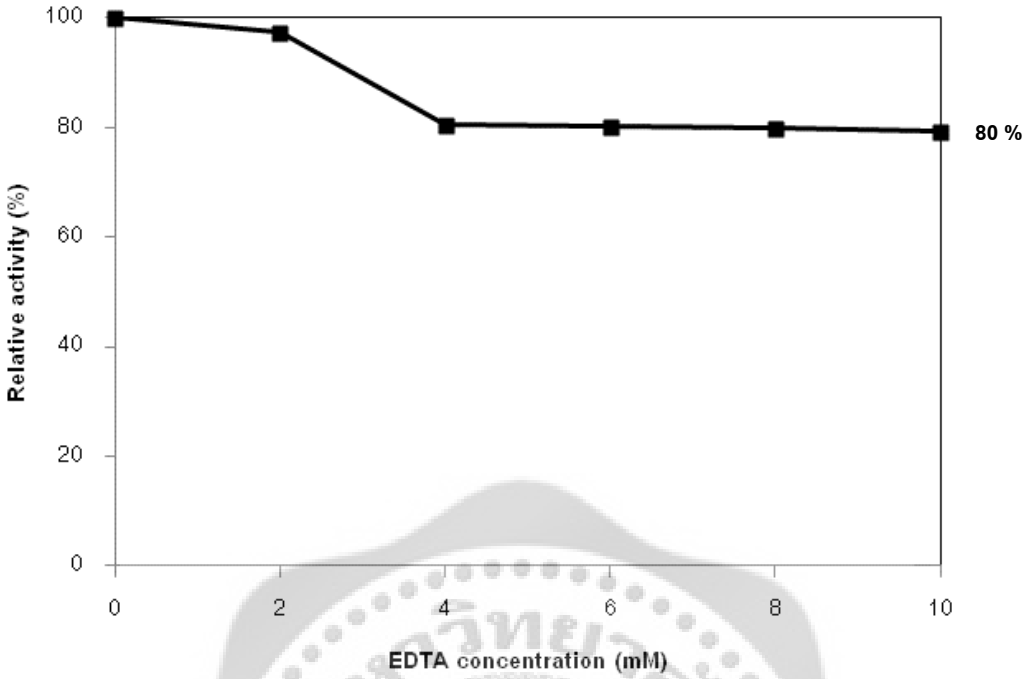
นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl (pH 9.0) ที่เติม ยูเรีย(Urea) และ Sodium dodecyl sulphate (SDS) และ Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) ความเข้มข้นในช่วง 0 – 10 mM แล้วหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสแสดงผลดังภาพประกอบ 16 – 18



ภาพประกอบ 16 ผลของยูเรียต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.



ภาพประกอบ 17 ผลของ SDS ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

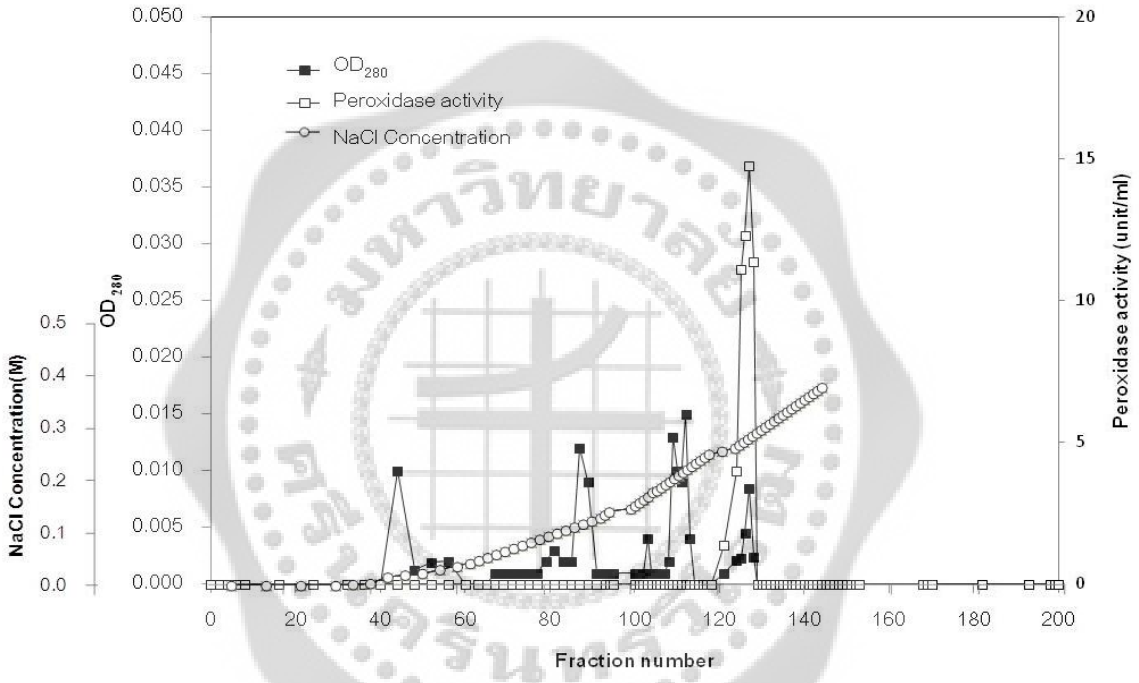


ภาพประกอบ 18 ผลของ EDTA ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp.

จากภาพประกอบ 16 – 18 ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเพอร์ออกซิเดสโดยใช้ Urea SDS และ EDTA ที่มีความเข้มข้น 0 – 10 mM พบว่า Urea ไม่มีผลต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส ในขณะที่ SDS และ EDTA มีผลต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส โดยที่ความเข้มข้นของ SDS และ EDTA 10 mM ทำให้แอคทิวิทีลดลงเหลือร้อยละ 80

การทำให้เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. บริสุทธิ์ด้วยการทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนที่ได้จากการตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 0 – 80 และทำไดอะไลซีสในสารละลายบัฟเฟอร์ 50mM Tris – HCl, pH 9.0 มาทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้คอลัมน์ DEAE – Cellulose ปรับสมดุลคอลัมน์ ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris – HCl, pH 7.5 และชะสารตัวอย่างอย่างต่อเนื่องด้วย 0.0 – 0.5 M NaCl ใน 0.05 M Tris – HCl buffer, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร แสดงผลดังภาพประกอบ 19

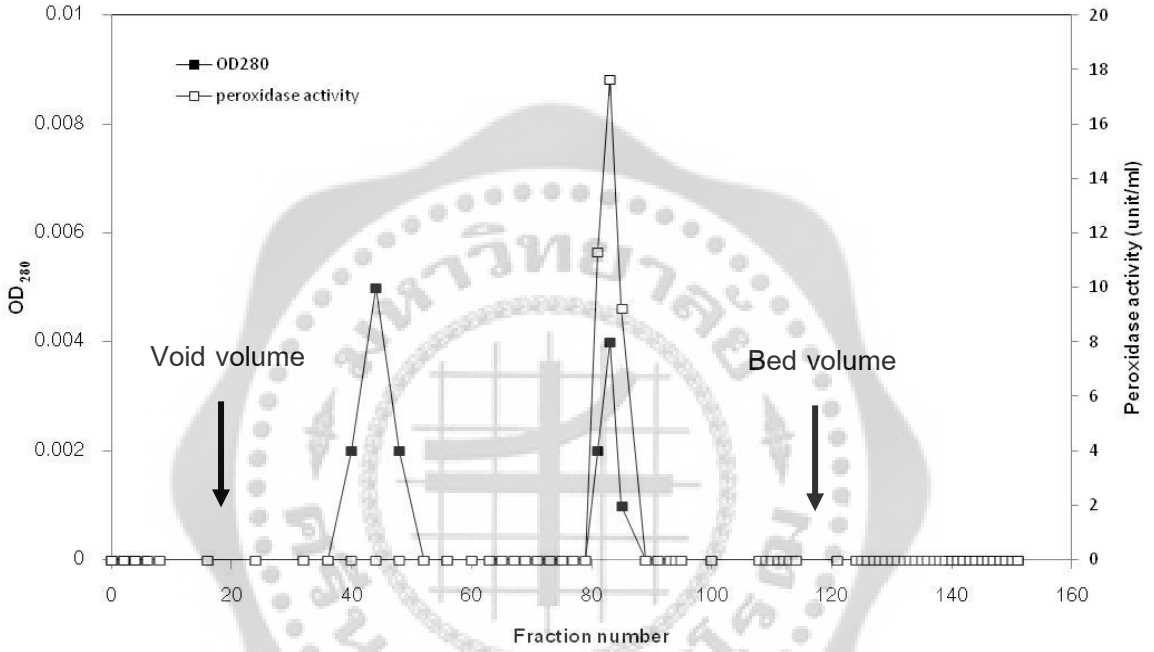


ภาพประกอบ 19 การทำให้เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ให้บริสุทธิ์ โดยทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE – Cellulose ชะด้วยสารละลาย 50 mM Tris – HCl pH 7.5 อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร

จากภาพประกอบ 19 พบว่า มีโปรตีนออกมา 4 ช่วง ได้แก่ 44 – 48, 87 – 89, 109 – 112 และ 125 – 128 จากนั้นหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกวิเดส พบว่า ช่วงที่ 4 สารละลายในหลอดที่ 125 – 128 ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูง และหลอดที่ 127 ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุดเท่ากับ 14.76 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.009 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร คิดเป็นแอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 1736.47 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นรวมหลอดที่ 125 – 128 แล้วทำไดอะไลซีสด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl พีเอช 9.0 เพื่อนำทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นต่อไป ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส 49.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็นแอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 2914.71 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

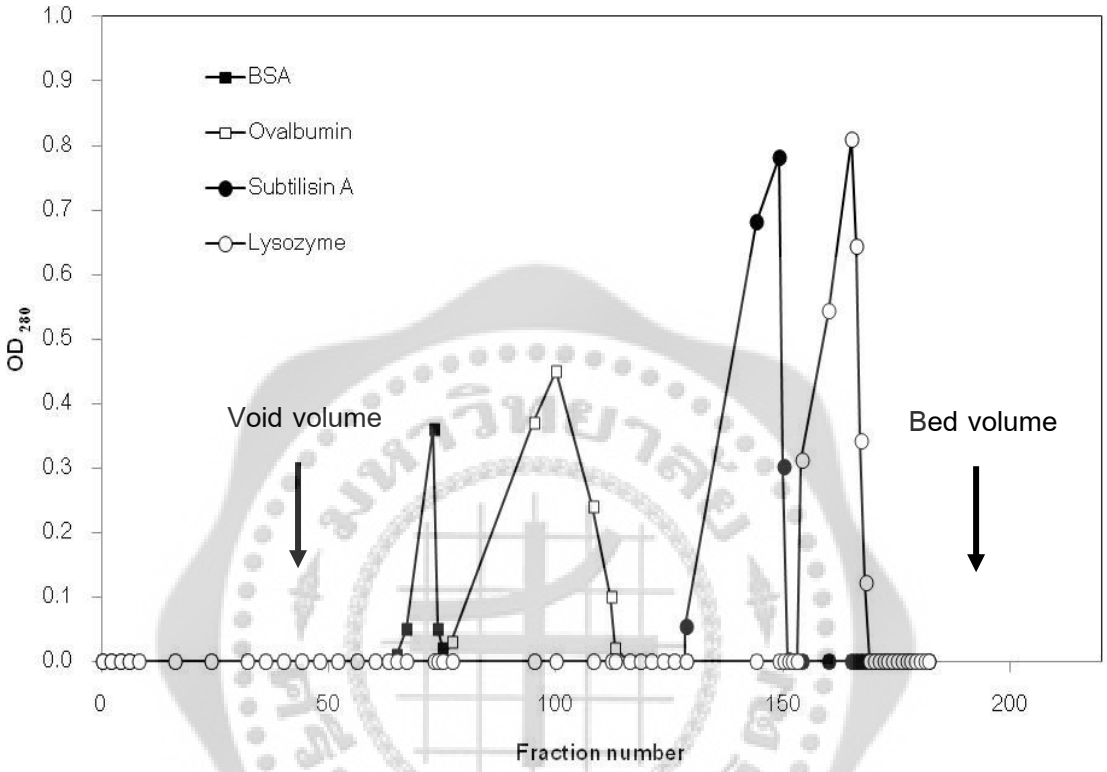
การทำให้เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. บริสุทธิ์ด้วยการทำโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาด

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์จากโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G – 100 ปรับสมดุลคอลัมน์ และชะสารตัวอย่างอย่างต่อเนื่องด้วย 0.05 M Tris – HCl buffer, pH 7.5 ด้วยอัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร แสดงผลดังภาพประกอบ 20



ภาพประกอบ 20 การทำให้เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ให้บริสุทธิ์ โดยทำโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex G – 100 ชะด้วยสารละลาย 50 mM Tris – HCl, pH 7.5 อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร

จากภาพประกอบ 20 พบว่า มีโปรตีนออกมา 2 ช่วง ได้แก่ 40 – 48 และ 81 – 83 จากนั้นหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกวิเดส พบว่า ช่วงที่ 2 สารละลายในหลอดที่ 81 – 83 ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูง และหลอดที่ 82 ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุดเท่ากับ 17.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.004 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร คิดเป็นแอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 4410.00 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นรวมหลอดที่ 81 – 83 ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส 36.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คิดเป็นแอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 5170.00 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำไปศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ต่อไป



ภาพประกอบ 21 โปรตีนมาตรฐาน ที่แยกด้วยโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex G – 100 ชะด้วยสารละลาย 50 mM Tris – HCl, pH 7.5 อัตราการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร

ความบริสุทธิ์ของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.

เพอร์ออกซิเดสจากสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. ทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 0 – 80 ทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE – Cellulose และทำโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex G – 100 คำนวนหาความบริสุทธิ์แสดงดังตาราง 8

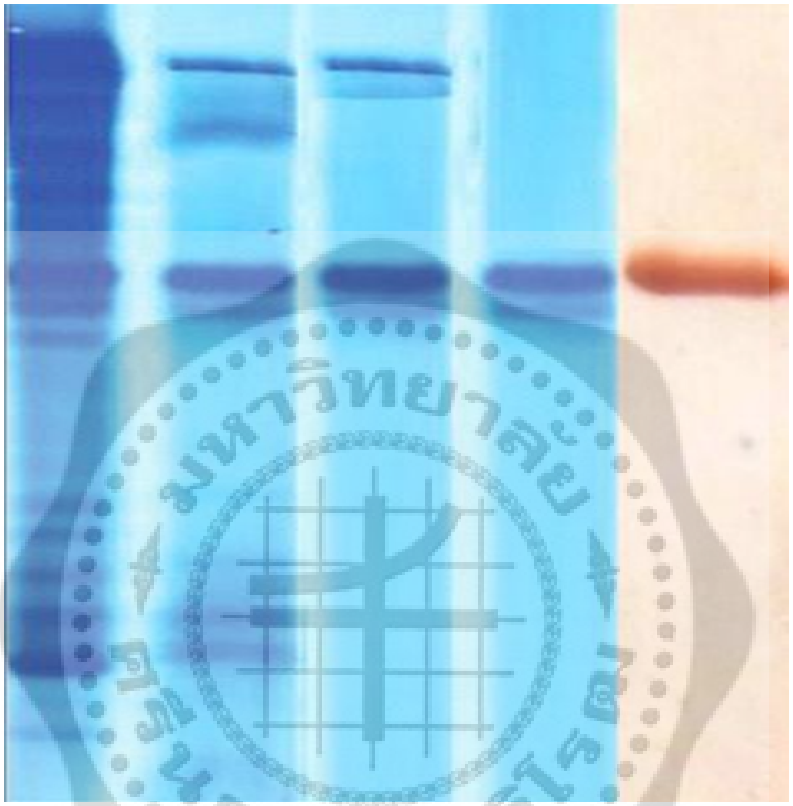
ตาราง 8 การทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.

ขั้นตอน	แอคทิวิทีจำเพาะ (units/mg protein)	ร้อยละผลผลิต (%)	ความบริสุทธิ์ (fold)
เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบ	235.49	100	1.00
0 – 80% $(NH_4)_2SO_4$	755.92	57.98	3.21
DEAE – Cellulose	2914.71	26.30	12.38
Sephadex G – 100	5170.00	14.41	21.95

จากตาราง 8 พบว่า เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 235.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0 – 80 พบว่าให้ผลผลิตร้อยละ 57.98 และความบริสุทธิ์ 3.21 เท่า นำเอนไซม์ที่ได้ไปทำไดอะไลซีส แล้วทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้คอลัมน์ DEAE – Cellulose พบว่า ให้ผลผลิตร้อยละ 26.30 และความบริสุทธิ์ 12.38 เท่า จากนั้นทำโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex G – 100 พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 21.95 เท่า และให้ผลผลิตร้อยละ 14.41 ตามลำดับ

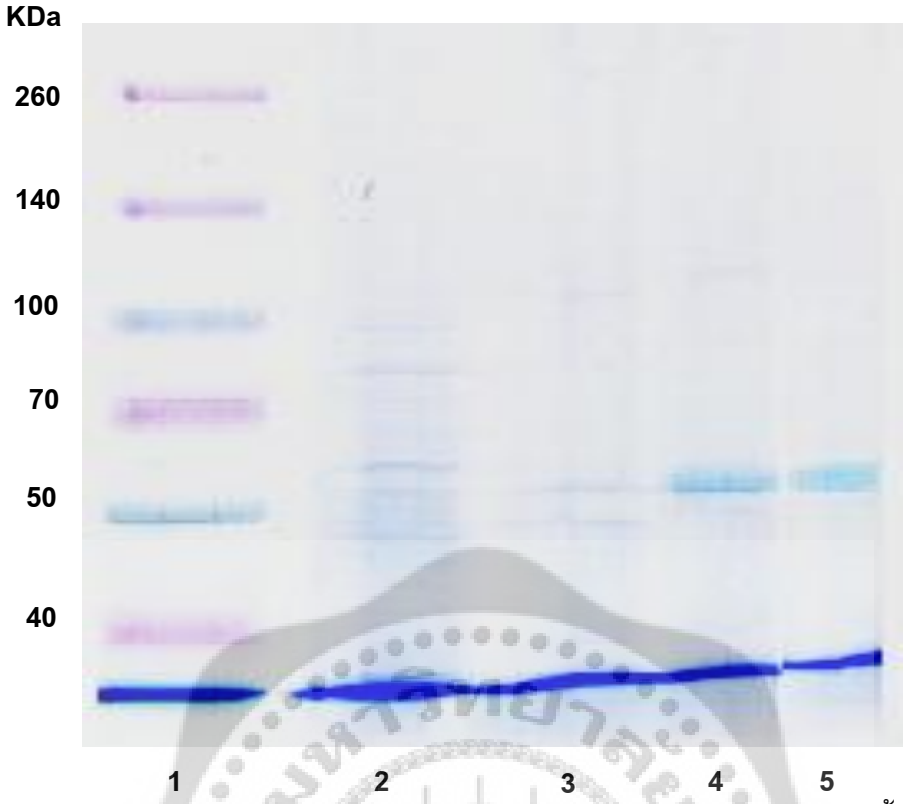
การตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่างๆ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยทำโพลีอะคริละไมด์เจลแบบไม่เสียสภาพ (Native – PAGE) และหาขนาดโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสแบบเสียสภาพด้วย SDS – PAGE แสดงผลดังภาพประกอบ 22 – 24



ภาพประกอบ 22 Native – PAGE ของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ดังนี้ 1. เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบ (20 µg)

2. ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 – 80 % (5 µg)
3. DEAE – Cellulose (2 µg)
4. Sephadex G – 100 (1 µg)
5. การย้อมแอคทิวิทีเพอร์ออกซิเดสโดยใช้ Phenol เป็นซับสเทรต



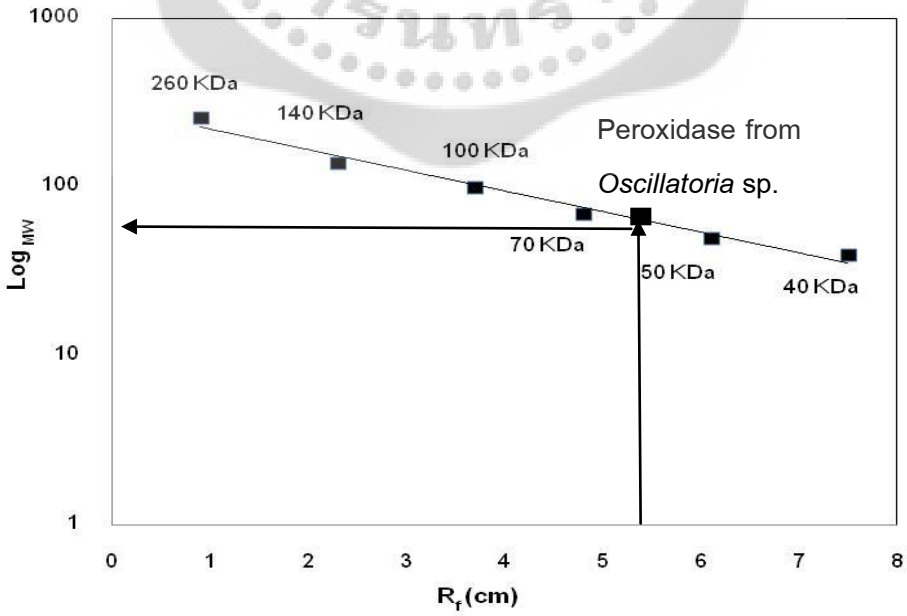
ภาพประกอบ 23 SDS – PGAE ของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ดังนี้ 1.Spectra Muticolor Broad Range Protein ladder 10 – 260 KDa

2.เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบ (20 µg)

3.ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (5 µg)

3.DEAE – Cellulose (2 µg)

4.Sephadex G – 100 (1 µg)



ภาพประกอบ 24 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (40 – 260 KDa)

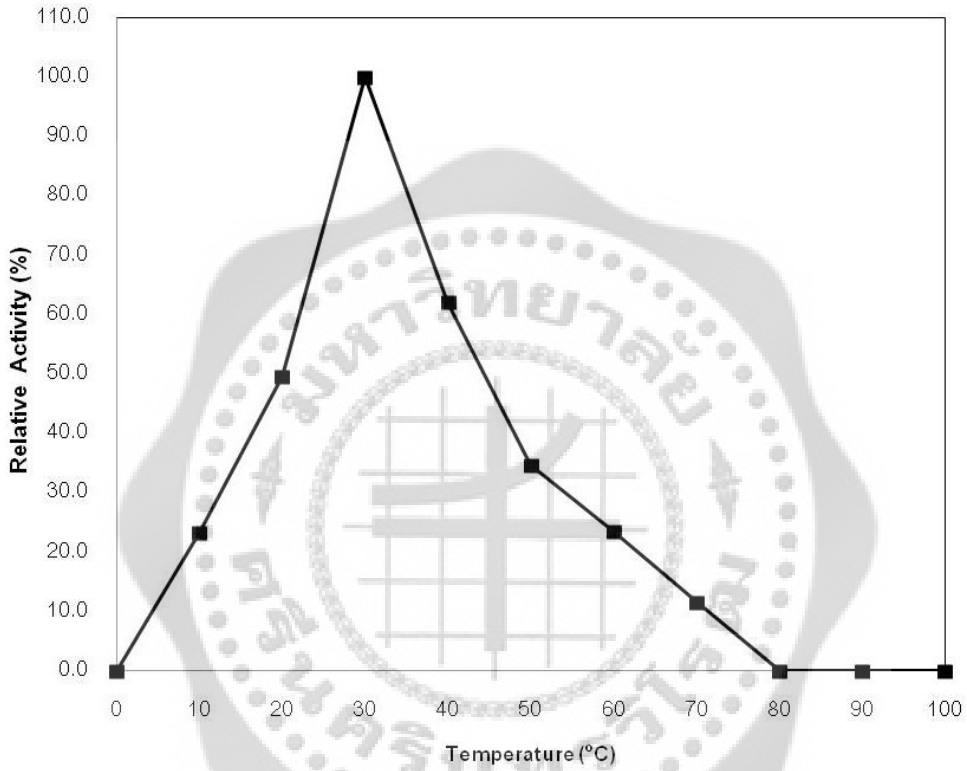
ภาพประกอบ 22 แสดงลักษณะแถบโปรตีนของเพอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นต่างๆ ดังนี้ แถวที่ 1 พบลักษณะแถบโปรตีนของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบ มีหลายแถบเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีนที่ได้มีลักษณะชัดเจนขึ้น โดยพบแถบโปรตีนจำนวน 4 แถบ เพอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE – Cellulose พบโปรตีนมีจำนวนแถบลดลงเหลือ 2 แถบ เพอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex G – 100 พบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ทำการย้อมแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสโดยใช้ Phenol เป็นซับสเทรตกับตัวอย่างที่บริสุทธิ์ พบบริเวณแถบโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เกิดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเห็นเป็นแถบสีแดง

ภาพประกอบ 23 แสดงความบริสุทธิ์ของเพอร์ออกซิเดส พบว่า เพอร์ออกซิเดสที่แยกได้ในแต่ละขั้นตอนมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น แถวที่ 1 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนมาตราฐาน พบว่า สามารถแยกขนาดโปรตีนได้ในช่วง 40 – 260 KDa ได้แก่ 40 50 70 100 140 และ 260 KDa เพอร์ออกซิ-เดสสกัดหยาบมีลักษณะแถบโปรตีนหลายแถบต่อกัน เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบแถบโปรตีนจำนวน 4 แถบ เพอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE – Cellulose พบโปรตีนเพียง 1 แถบ เพอร์ออกซิเดสที่ทำให้บริสุทธิ์โดยทำโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex G – 100 พบโปรตีนเพียง 1 แถบ จากนั้นคำนวนหาขนาดโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ 1 โดยเทียบกับกราฟขนาดโมเลกุลของโปรตีนมาตราฐาน (ภาพประกอบ 24) เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 54 KDa

สมบัติของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.

ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ *Oscillatoria* sp.

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ บ่มที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl, pH 9.0 เป็นเวลา 30 นาที แล้วหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส แสดงผลดังภาพประกอบ 25

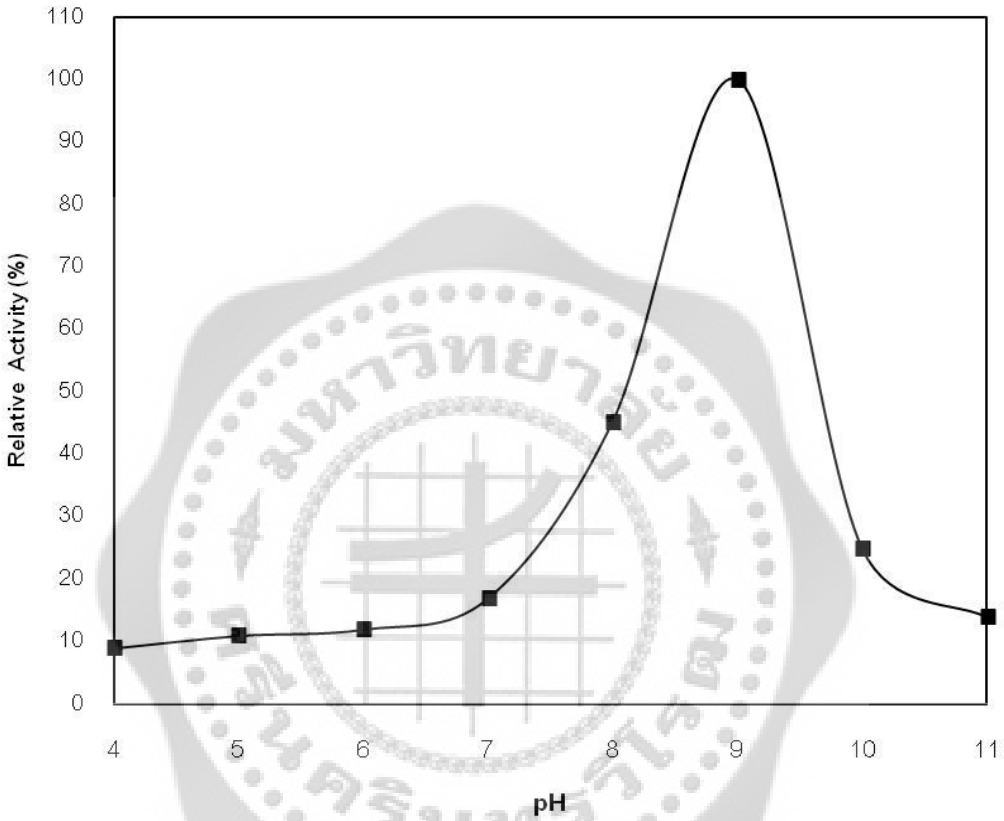


ภาพประกอบ 25 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.

จากภาพประกอบ 25 แสดงให้เห็นเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีในช่วงอุณหภูมิระว่าง 0 – 80 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส สูงที่สุดเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีเพอร์ออก-ซิเดสเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นหรือลดลงจาก 30 องศาเซลเซียส แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลง ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียสไม่มีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 mM ที่มีค่าพีเอชในช่วง 4 – 11 ดังนี้ พีเอช 4 – 5 (Acetate buffer) พีเอช 6 – 7 (Phosphate buffer) และพีเอช 8 – 11 (Tris – HCl buffer) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสแสดงผลดังภาพประกอบ 26



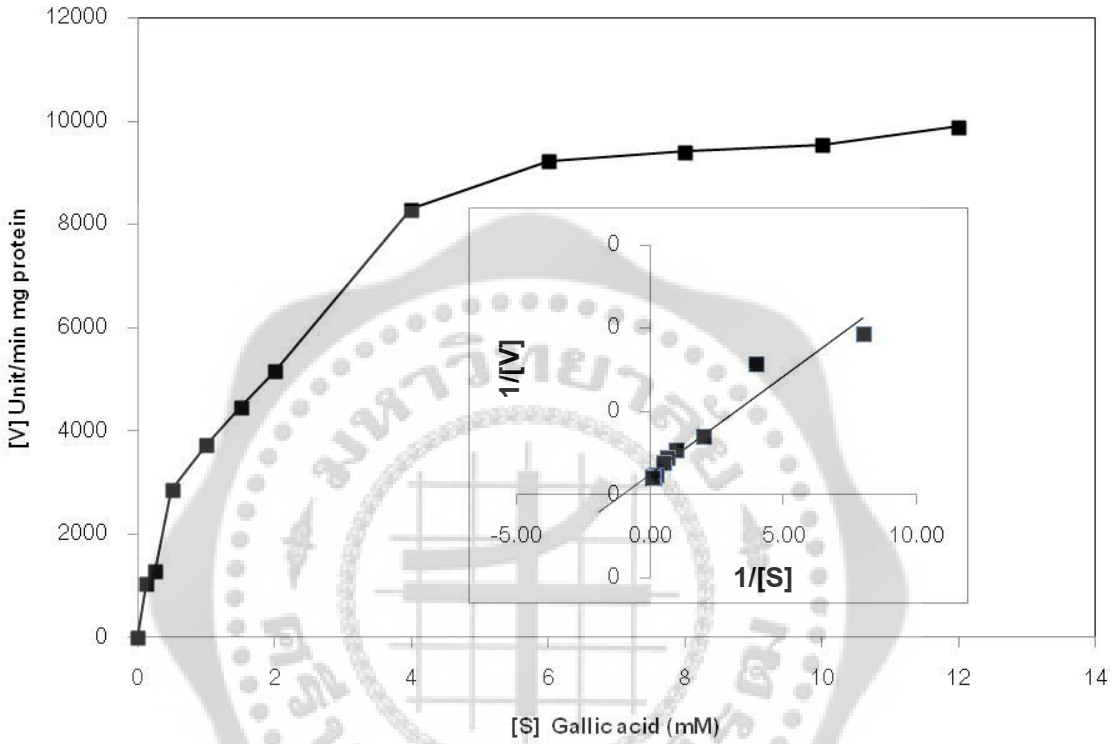
ภาพประกอบ 26 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.

จากภาพประกอบ 26 อธิบายได้ว่าเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีทุกช่วงพีเอชที่ทำการศึกษา โดยค่าพีเอชที่ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 9.0 ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 755.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบเท่ากับพีเอช 9.0 และพบว่าที่พีเอชสูงกว่าหรือน้อยกว่าพีเอช 9 แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลง โดยแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลงมากกว่าร้อยละ 70 ในช่วงพีเอช 10.0 และพีเอชน้อยกว่า 7 ทำให้แอคทิวิทีลดลงร้อยละ 90

จากการศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. แสดงดังภาพประกอบ 25 และ 26 ทำให้การศึกษาขั้นต่อไปใช้ สารละลายบัฟเฟอร์ Tris – HCl พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อหาแอคทิวิทีของเพอร์อกซิเดสโดยใช้ gallic acid เป็นซับสเทรต

การศึกษาค่าจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.

ศึกษาจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ โดยคำนวนหาค่า K_m และ V_{max} โดยใช้ Gallic acid เป็นซับสเทรต ที่ความเข้มข้น 0 – 12 mM แล้วหาค่า K_m และ V_{max} แสดงดังภาพประกอบ 27



ภาพประกอบ 27 จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ Gallic acid เป็นซับสเทรต

จากภาพประกอบ 27 พบว่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเทรตสูงที่ความเข้มข้นของ Gallic acid เท่ากับ 0.5 – 4 mM โดยมีค่า K_m เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลลาร์ และค่า V_{max} เท่ากับ 10000.00 ไมโครโมลต่อนาทีมิลลิกรัมโปรตีน

ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.

ศึกษาความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ โดยใช้ซับสเทรตเป็น Gallic acid, Phenol, Caffeic acid, และ Ascorbic acid เป็นซับสเทรต จากนั้นวัดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส แสดงผลดังตาราง 9

ตาราง 9 ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์

ซับสเทรต	ความเข้มข้น (mM)	ค่าดูดกลืนแสง (nm)	แอคทิวิทีจำเพาะ (Units/mg protein)	K_m	V_{max}
Gallic acid	2	400	5170.00	1.00	10000.00
Caffeic acid	2	400	2679.24	1.87	3389.98
Ascorbic acid	2	500	3868.52	1.30	5478.42
Phenol	2	500	3644.13	0.64	6490.75

จากตาราง 9 พบว่า เมื่อใช้ Gallic acid และ Caffeic acide เป็นซับสเทรต สารละลายดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และเมื่อใช้ Phenol และ Ascorbic cid เป็นซับสเทรต สารละลายดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนมีความจำเพาะต่อ Gallic acid เป็นซับสเทรตสูงที่สุดมีแอคทิวิทีเท่ากับ 5170.00 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาได้แก่ Ascorbic acid มีแอคทิวิทีเท่ากับ 3868.52 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน Phenol มีแอคทิวิทีเท่ากับ 3644.13 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ Caffeic acid มีแอคทิวิทีเท่ากับ 2679.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่า K_m พบว่า เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบมีความจำเพาะต่อ Phenol สูงสุด เท่ากับ 0.64 มิลลิโมลาร์ รองลงมา ได้แก่ Gallic acid, Ascorbic acid และ Caffeic acid ตามลำดับ

ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.

นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl (pH 9.0) ที่เติม 5 50 และ 500 ไมโครโมลาร์ ของ Cr^{3+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Hg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} Na^{+} และ K^{+} แสดงผลดังตาราง 10

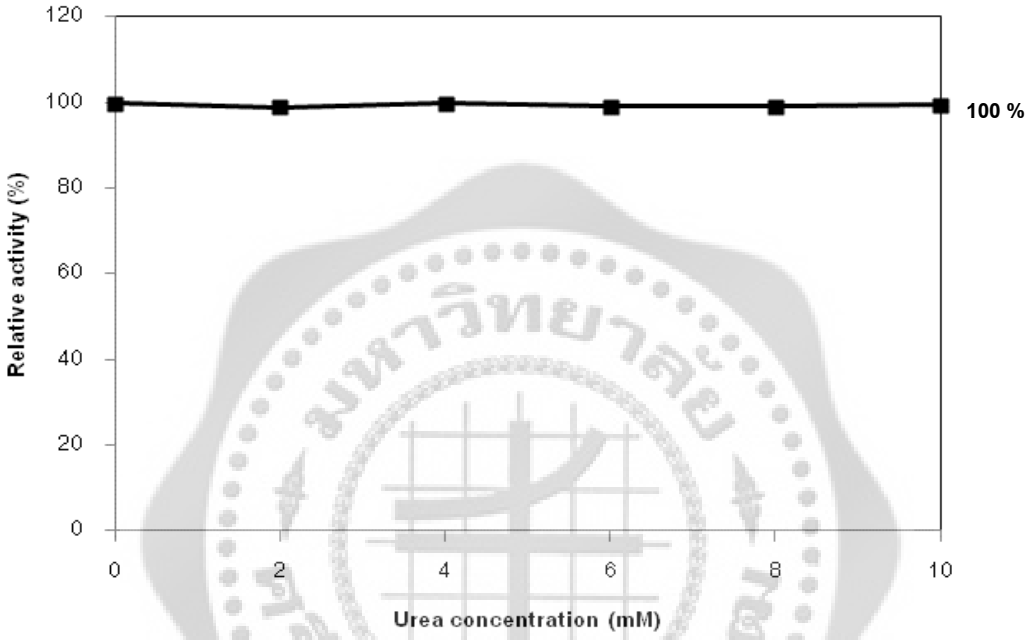
ตาราง 10 ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์**จาก *Oscillatoria* sp.**

ชนิดไอออน	แอคทิวิทีสัมพัทธ์ที่ความเข้มข้นไอออน (%)		
	5 μM	50 μM	500 μM
Na^{+}	120	150	180
K^{+}	98	94	87
Mg^{2+}	107	210	221
Ca^{2+}	107	116	124
Mn^{2+}	207	100	95
Fe^{2+}	110	110	85
Ni^{2+}	103	110	201
Cu^{2+}	95	80	45
Zn^{2+}	100	70	60
Cd^{2+}	100	90	55
Hg^{2+}	80	62	15
Cr^{3+}	100	85	65
Fe^{3+}	156	185	207

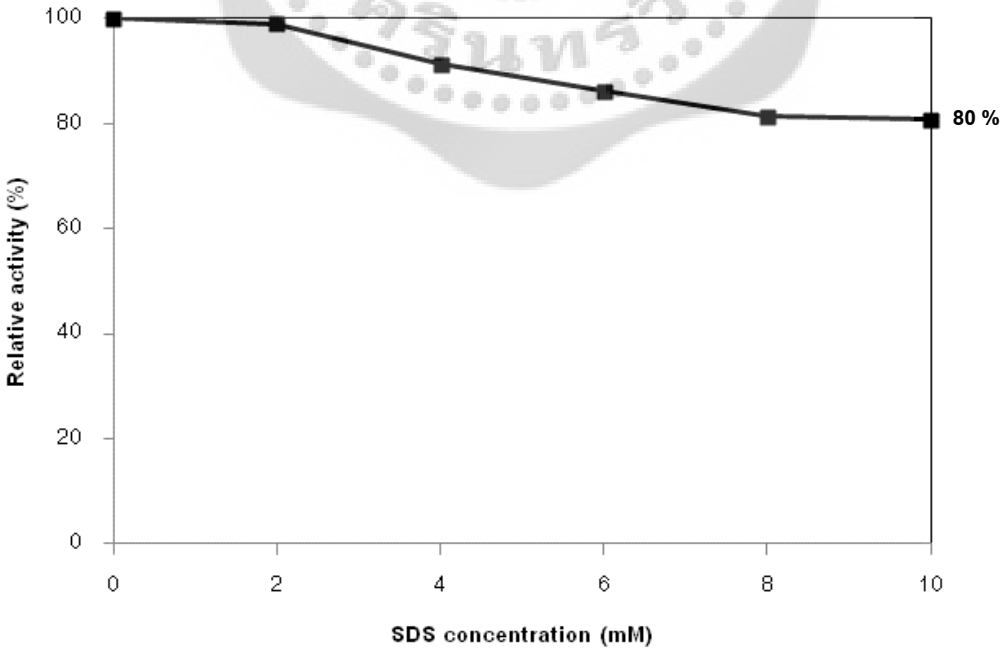
จากตาราง 10 พบว่า เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ถูกกระตุ้นแอคทิวิทีโดย Fe^{3+}, Na^{+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} Mn^{2+} และ Ni^{2+} โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ของ Mn^{2+} และ Fe^{2+} แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลง ในขณะที่ความเข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ ของ Cd^{2+} แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลงร้อยละ 50 และเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย Cr^{3+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Hg^{2+} ที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครโมลาร์

ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.

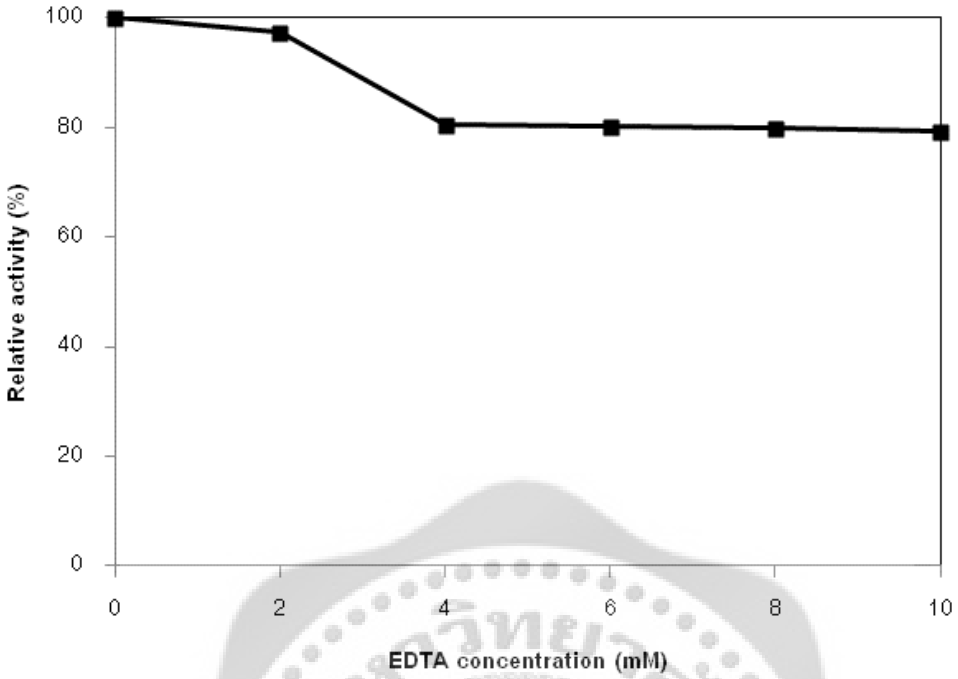
นำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ บ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ 50 mM Tris – HCl (pH 9.0) ที่เติม ยูเรีย(Urea) และ Sodium dodecyl sulphate (SDS) และ Ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) ความเข้มข้นในช่วง 0 – 10 mM แล้วหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส แสดงผลดังภาพประกอบ 28 – 30



ภาพประกอบ 28 ผลของยูเรียต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.



ภาพประกอบ 29 ผลของ SDS ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.



ภาพประกอบ 30 ผลของ EDTA ต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp.

จากภาพประกอบ 28 – 30 ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเพอร์ออกซิเดสโดยใช้ Urea SDS และ EDTA ที่มีความเข้มข้น 0 – 10 mM พบว่า Urea ไม่มีผลต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส ในขณะที่ SDS และ EDTA มีผลต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส โดยที่ความเข้มข้นของ SDS และ EDTA 10 mM ทำให้แอคทิวิทีลดลงเหลือร้อยละ 80

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกไซยาโนแบคทีเรียที่ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสที่ดีที่สุด จากนั้นทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต นำไปทำโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE – Cellulose และทำโครมาโตรกราฟีแบบแยกขนาดด้วยคอลัมน์ Sephadex G – 100 และศึกษาสมบัติของเพอร์ออกซิเดส ซึ่งสามารถสรุปและอภิปรายผลได้ดังนี้

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย

แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบของไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ *Synechococcus* sp. PCC 7942 พบว่าไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส โดย *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีจำเพาะสูงที่สุด เท่ากับ 235.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาได้แก่ *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Synechocystis* sp. PCC 6803 และ*Synechococcus* sp. PCC 7942 ตามลำดับ มีรายงานว่าเพอร์ออกซิเดสพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น สุนัข (วสันต์ ตั้งโภคานนท์; และคณะ. 2548) *Steptomyces viridosporus* T7A (Score; et al. 1997) ยุง (*Aedes aegypti*) (Zhoa; et al. 2001) และกระหล่ำปลี (*Brassica olerace*s) (Yazdi; et al. 2002) ซึ่งสอดคล้องกับ ชะอรทิพย์ แย้มด้วง และคณะ (2553) ได้ทำการคัดแยกแหล่งผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ มะเขือเทศ ผักกาดขาว แตงกว่า บร็อกคอลี่ มะเขือเปราะ แครอท ผักบุ้ง ฟักทอง ถั่วฝักยาว และกะหล่ำปลี พบว่าผักทุกชนิดที่นำมาทดลองให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส โดยกะหล่ำปลีให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับ สมบัติ คงวิทยา และคณะ (2554) ได้ตรวจหาแหล่งที่ให้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในผลเงาะโดยศึกษา ในส่วนเปลือก เนื้อ และเมล็ด พบว่าสารสกัดหยาบจากเงาะทุกตัวส่วนที่ศึกษาให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส โดยพบว่าในส่วนของเมล็ดให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงที่สุด

ความเครียดออกซิเดชันจะส่งผลต่อกระบวนการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน จำทำให้เกิดการสร้างและเก็บสารอนุมูลอิสระไว้ในเซล์เป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็น Reaction Oxygen Species (ROS) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ เซลล์จึงมีการสร้างกลไกเพื่อกำจัดอนุมุลอิสระดังกล่าว ดังรายงานงานของ Veda และ คณะ (2011) พบว่าสิ่งมีชีวิตจะสร้างเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส แคทาเลส และเพอร์ออกซิเดส เพื่อใช้ในการกำจัดอนุมูล ROS ที่เกิดขึ้นในเซลล์ เมื่อทำปฏิกิริยากับเหล็กจะได้อนุมูลไฮดรอกซิล ซึ่งสามารถทำลายดีเอ็นเอ ลิปิดเมมเบรน และโปรตีนได้ (Becana; & Lotassa. 2007) ซึ่งสอดคล้องกับ Latifi และคณะ (2008) รายงานว่าใน

ภาวะความเครียดอกซิเดชัน ไซยาโนแบคทีเรียจะตอบสนองด้วยกลไกในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยใช้เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส กำจัดอนุมูลของออกซิเจน (O_2^-) ให้อยู่ในรูปของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และออกซิเจน จากนั้นแคทาเลส และเพอร์ออกซิเดส กำจัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ให้อยู่ในรูปของน้ำ ดังรายงานของ Saha และคณะ (2003) พบว่า *Oscillatoria willei* สร้างลิกนินเพอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นในภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน สอดคล้องกับ Yoshihiro และคณะ (2009) รายงานว่าเพอร์ออกซิเดสที่พบใน *Ananaena* sp. PCC 7120 มีลักษณะเป็น heme peroxidase มีสมบัติในการกำจัดสีย้อมได้ดี เช่นเดียวกับ Panchali และ Ruma (2011) พบว่าในภาวะที่เป็นพิษจากสารหนูไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria pronceps*, *Oscillatoria Limosa*, *Anabaena* sp. และ *Phormidium laminosum* จะสร้างเอนไซม์ซุปเปอร์ออก-ไซด์ดิสมิวเทส แคทาเลส และแอสคอร์บิกเพอร์ออกซิเดส เพื่อลดความเป็นพิษจากสารหนู

การทำให้เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. บริสุทธิ์

สารสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 235.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำสารสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 0 – 20, 20 – 40, 40 – 60, 60 – 80 และ 80 – 100 ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 60 – 80 ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุด 828.92 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ใช้การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 0 – 80 จากนั้นทำไดอะไลซีส พบว่าให้ผลผลิตร้อยละ 57.98 และความบริสุทธิ์ 3.21 เท่า นำไปผ่านคอลัมน์ DEAE – Cellulose เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ขึ้น 12.38 เท่า และได้ผลผลิตร้อยละ 26.30 จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G – 100 พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 21.95 เท่า และได้ผลผลิตร้อยละ 14.41 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yoshihiro และคณะ (2009) เพอร์ออกซิเดสจาก *Anabaena* sp. มีความบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Toyopearl DEAE – 650M, คอลัมน์ Toyopeearl Butyl – 650M และ Hypatite C เพิ่มขึ้น 50.5 เท่า และให้ผลผลิตร้อยละ 48 เช่นเดียวกับ Vede และคณะ (2010) พบว่า เพอร์ออกซิเดสจากผักกระถิน (*Leucaena leucocephala*) ที่ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 50 นำไปผ่านคอลัมน์ DEAE – Cellulose, คอลัมน์ Sephadex G – 200 และคอลัมน์ Con – A ความความบริสุทธิ์ขึ้น 89.3 เท่า และให้ผลผลิตร้อยละ 26.09 ซึ่งสอดคล้องกับ Sisecioglu และคณะ (2010) พบว่า เพอร์ออกซิเดสจาก (*Raphanus sativus* L.) ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 20 – 80 จากนั้นทำไดอะไลซีส และนำไปผ่านคอลัมน์ CM – Sephadex ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.7 เท่า และให้ผลผลิตร้อยละ 2

การตรวจสอบสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วผ่านคอลัมน์ DEAE – Cellulose และคอลัมน์ Sephadex G – 100 โดยการทำพอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟไลซีสแบบไม่เสียสภาพ (native PAGE) และทำการย้อมแอคทิวิทีโดยใช้ Phenol เป็นซับสเทรต พบว่าเพอร์ออกซิเดสในขั้นต่างๆ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยเพอร์-ออกซิเดสสกัดหยาบเกิดแถบโปรตีนจำนวนมาก เมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตพบแถบโปรตีนจำนวน 4 แถบ เพอร์ออกซิเดสที่ผ่านคอลัมน์ DEAE – Cellulose พบแถบโปรตีน 2 แถบ และเพอร์ออกซิเดสที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G – 100 พบแถบโปรตีน 1 แถบ ทำการย้อมแอคทิวิที พบว่าเกิดแอคทิวิทีบริเวณที่พบโปรตีน หาขนาดโมเลกุลของเพอร์ออกซิ-เดสโดยทำพอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟไลซีสแบบเสียสภาพ (SDS – PAGE) พบแถบโปรตีนจำนวน 1 แถบ ขนาดโมเลกุลเท่ากับ 54 KDa สอดคล้องกับ ฐากรณ์ สอนวัฒนา (2544) พบว่าขนาดโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสจากมันสำปะหลังมีขนาด 54 KDa เช่นเดียวกับ Yoshihiro และคณะ (2009) พบว่าขนาดโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสจาก *Anabaena* sp. PCC 7120 มีขนาด 53 KDa ซึ่งสอดคล้องกับ Mohamed (2011) รายงานว่าขนาดโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสจากรากฮอร์ทเรดิช มีขนาด 56 KDa เช่นเดียวกับ Al – Senaidy และ Ismael (2011) พบว่าขนาดโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสจากใบอินทผลัม มีขนาด 55 KDa

สมบัติของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.

ผลของอุณภูมิต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.

เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีในช่วงอุณหภูมิ 10 – 80 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นหรือลดลงจาก 30 องศาเซลเซียส แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลง ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิมากกว่า 90 องศาเซลเซียส ไม่มีแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส ทั้งนี้อาจเกิดจากเอนไซม์เสียสภาพเนื่องจากอุณหภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับเพอร์ออกซิเดสจาก *Anabaena* sp. PCC 7120 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส และพบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลงครึ่งหนึ่ง (Yoshihiro; et al. 2009) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Saraiva และคณะ (2007) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากผลมะกอก (*Olea europaea* L.) เท่ากับ 34.7 องศาเซลเซียส ในขณะที่เพอร์ออกซิเดสจากมะเขือม่วง (*Solanum melongena*) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 84 องศาเซลเซียส (Verwal; et al. 2006) และรายงานของ Al-Senaidy และ Ismael (2011) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากใบอินทผลัมเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส

ผลของพีเอชต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.

เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีทุกช่วงพีเอชที่ทำการศึกษา ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. เท่ากับพีเอช 9.0 และพบว่าที่พีเอชสูงกว่าหรือน้อยกว่าพีเอช 9.0 เพอร์ออกซิเดสมีแอคทิวิทีลดลง โดยแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสลดลงร้อยละ 30 ที่พีเอช เท่ากับ 11.0 และพีเอชน้อยกว่า 7.0 ทำให้แอคทิวิทีลดลงร้อยละ 90 ซึ่งสอดคล้องกับ Ogawa และคณะ (2004) พบว่าเพอร์ออกซิเดสจาก *Bacillus* sp. No.13 มีสมบัติเป็น alkaline peroxidase พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 10.0 ซึ่งสอดคล้องกับ Susuki และคณะ (2006) พบว่าเพอร์ออกซิเดสจากเมล็ด buckwheat มีพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 8.0 ในขณะที่ Rudrappa และคณะ (2007) รายงานว่าเพอร์ออกซิเดสจากเรดบีท มีพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 5.0 เช่นเดียวกับ เพอร์ออกซิเดสจากผักขม (*Spinacia oleeracea* L.) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 5.2 (Koksal. 2011) Chen และคณะ (2010) รายงานว่าเพอร์ออกซิเดสจากเห็ด *Pleurotus eryngii* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 3.0

ค่าจลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.

เพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบมีความจำเพาะต่อซับสเทรตสูงที่ความเข้มข้นของ Gallic acid เท่ากับ 0.25 – 4.0 mM โดยมีค่า K_m เท่ากับ 0.96 มิลลิโมลลาร์ และค่า V_{max} เท่ากับ 370.37 ไมโครโมลต่อนาทีมิลลิกรัมโปรตีน

เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนมีความจำเพาะต่อซับสเทรตสูงที่ความเข้มข้นของ Gallic acid เท่ากับ 0.5 – 4.0 mM โดยมีค่า K_m เท่ากับ 1.11 มิลลิโมลลาร์ และค่า V_{max} เท่ากับ 1111.11 ไมโครโมลต่อนาทีมิลลิกรัมโปรตีน

เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์มีความจำเพาะต่อซับสเทรตสูงที่ความเข้มข้นของ gallic acid เท่ากับ 0.5 – 4 mM โดยมีค่า K_m เท่ากับ 1.0 มิลลิโมลลาร์ และค่า V_{max} เท่ากับ 10000.00 ไมโครโมลต่อนาทีมิลลิกรัมโปรตีน

จากข้อมูลสรุปได้ว่า เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. มีความจำเพาะต่อแอคทิวิทีที่ใช้ Gallic acid เป็นซับสเทรต

ความจำเพาะต่อซับสเทรตของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.

เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. มีความจำเพาะต่อซับสเทรต gallic acid สูงที่สุด รองลงมาได้แก่ phenol ascorbic acid และ caffeic acid ตามลำดับ เมื่อใช้ gallic acid และ caffeine เป็นซับสเทรต สารละลายดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และเมื่อใช้ phenol และ ascorbic cid เป็นซับสเทรต สารละลายดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับ Kongwithtaya และคณะ (2010) รายงานว่า เพอร์ออกซิเดสจากผักตำลึง (Ivy gourd) มี

ความจำเพาะต่อสารประกอบฟีนอลิกเรียงลำดับดังนี้ gallic acid, chthechin, ascorbic acid และ caffeic acid ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าเพอร์ออกซิเดสมีความจำเพาะต่อซับสเทรตที่มีลักษณะเหมือนกับ gallic acid และ phenol และไม่จำเพาะต่อซับสเทรตที่มีโครงสร้างคล้ายกับ caffain มีรายงานความจำเพาะต่อซับสเทรตของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสต่างกันไปตามแหล่งที่พบ เช่น Mohamed และคณะ (2011) พบว่าเพอร์ออกซิเดสจากรากฮอร์ทเรดิส มีความจำเพาะต่อซับสเทรต Guaiacol, *O* – Phenylenediamine และเมื่อใช้ *O* – Dianiaidine, Pyrogallol และ *p* – Aminoantipyrine เป็นซับสเทรตพบว่า เพอร์ออกซิเดสให้แอคทิวิทีลดลงเป็นครึ่งหนึ่ง

ผลของไอออนต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.

เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ถูกกระตุ้นแอคทิวิทีโดย Mg^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, K^{+} และ Cu^{2+} โดย Fe^{2+} และ Cd^{2+} ยับยั้งแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้น 0.5 mM ในขณะที่ความเข้มข้น 5 mM ของ Cr^{3+} Hg^{2+} และ Zn^{2+} ยับยั้งแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส มีรายงานว่าเพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่จับกับโลหะ (metalloproteins) จึงทำให้เสถียรในภาวะที่มีไอออนของโลหะบางชนิด เช่น Ca^{2+} (Almagro; et al. 2009) มีรายงานว่าแอคทิวิทีของเพอร์ออก-ซิเดสถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+}, Mn^{2+} (Al – Senaidy; & Ismael. 2011) และ Na^{+} (Veda; & Dwivedi. 2011) ซึ่งสอดคล้องกับ Kongwithtaya และคณะ (2010) รายงานว่า เพอร์ออกซิเดสจากผักตำลึง (Ivy gourd) ถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย Cu^{2+} และ Ca^{2+} และถูกยับยั้งแอคทิวิทีด้วย Cr^{3+} Hg^{2+}

ผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่อแอคทิวิทีของเพอร์อกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.

ศึกษาการยับยั้งการทำงานของเพอร์ออกซิเดสโดยใช้ Urea SDS และ EDTA ที่มีความเข้มข้น 0 – 10 mM พบว่า Urea ไม่มีผลต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส ในขณะที่ SDS และ EDTA มีผลต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส โดยที่ความเข้มข้นของ SDS และ EDTA 10 mM ทำให้แอคทิวิทีลดลงเหลือร้อยละ 80 ซึ่งสอดคล้องกับ Rao และ Ajila (2009) รายงานว่าที่ความเข้มข้น 20 mM EDTA แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากถั่วเขียวผิวดำลดลงร้อยละ 33 เนื่องจาก EDTA ไม่สามารถไปจับกับไอออน Fe^{2+} ในโมเลกุลของเพอร์ออกซิเดสจึงทำให้บริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ยังคงสภาพได้ และ Kongwithtaya และคณะ (2010) พบว่า เพอร์ออกซิเดสจากตำลึงจะเสถียรเมื่ออยู่ในสารละลายยูเรีย Urae ในขณะที่ความเข้มข้น 3 mM SDS แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิ-เดสลดลงครึ่งหนึ่ง

จากผลการทดลองข้างต้นสามารถสรุปการทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. แสดงดังตาราง 11

ตาราง 11 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp.

Step	Purity (fold)	Optimum Temperature (C°)	Optimum pH	K_m (mM)	V_{max} (U/mg protein)	Catalyst	Inhibitor
Clude peroxidase	1.00	30	9.0	0.96	370.37	Mg^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, K^{+} และ Cu^{2+}	Cr^{3+} Hg^{2+} และ Zn^{2+}, SDS และ EDTA
0 – 80% $(NH_4)_2SO_4$	3.21	30	9.0	1.11	1111.11	Mn^{2+}, Fe^{3+}, Na^{+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} และ Ni^{2+}	Cr^{3+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Hg^{2+}, SDS และ EDTA
Purified peroxidase	21.95	30	9.0	1.0	10000.00	Fe^{3+}, Na^{+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+} Mn^{2+} และ Ni^{2+}	Cr^{3+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Hg^{2+}, SDS และ EDTA

จากตาราง 11 พบว่า เพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. ที่ทำให้บริสุทธิ์ทุกขั้นตอน มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 9.0 ดังนั้นเพอร์ออกซิเดสจาก *Oscillatoria* sp. จึงมีคุณสมบัติเป็นอัลคาไลน์เพอร์ออกซิเดส (alkaline perxidase) แอคทิวิทีเพอร์ออกซิเดสถูกกระตุ้นด้วย Mg^{2+}, Na^{+}, Ni^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, K^{+} และ Cu^{2+} และแอคทิวิทีถูกยับยั้งด้วย Cr^{3+}, Hg^{2+} และ Zn^{2+} ค่า K_m ของเพอร์ออกซิเดสที่ไม่บริสุทธิ์ เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจากการตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE – Cellulose และ Sephadex G – 100 เท่ากับ 0.96 1.11 และ 1.0 mM ตามลำดับ และค่า V_{max} ของเพอร์ออกซิเดสที่ไม่บริสุทธิ์ เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจากการตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE – Cellulose และ Sephadex G – 100 เท่ากับ 370.37 1111.11 และ 10000.00 U/mg protein ตามลำดับ จากข้อมูลพบว่าสมบัติของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบ เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วน และเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ มีสมบัติใกล้เคียงกัน ดังนั้นการนำไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมอาจจะใช้ในรูปเอนไซม์สกัดหยาบ เพื่อลดขั้นตอนการผลิตได้

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กมลชัย ชะเอม. (2546). *การคัดแยกเห็ดราที่ผลิตเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส*. วิทยานิพนธ์ วท.ม.. กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

จารุ สังขนุกิจ. (2547*). การเพาะเลี้ยงสาหร่าย Spirulina sp. ในอาหารจากเศษเหลือการเกษตร*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (วาริชศาสตร์). สงขลา: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชะอรทิพย์ แย้มด้วง; และคณะ. (2553). การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจากกระหล่ำปลี. *วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้*. 1(1): 28 – 34.

ชื่นสุมณ ยิ้มถิน. (2548). *การกำจัดสารประกอบฟีนอลโดยเปอร์ออกซิเดสที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร*. วิทยานิพนธ์ วท.ม.(ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

ฐากรณ์ สอนวัฒนา. (2544). *ลักษณะสมบัติของเปอร์ออกซิเดสในหัวมันสำปะหลัง Manihot esculenta Crantz หลังการเก็บเกี่ยว*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีทางชีวภาพ). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

ณัฏฐา เสนีวาส; ศรีสม สุวรรณวงศ์; ลิลลี่ กาวีต๊ะ; สรัญญา วัชโรทัย; และ รวีวรรณ ตัณฑวณิช. (2553). *การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไซยาโนแบคทีเรีย Hapalosiphon sp. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 : สาขาพืช*, 3 – 5 กุมพาพันธ์ 2553; กรุงเทพ: 446 – 455.

ธนวัชน์ ธนศรีสถิต. (2546). *บทบาทของเอนไซม์ catalase และ ascorbate peroxidase ต่อการทนเค็มของ Aphanothece halophytica*. รายงานวิจัย วท.บ. (ชีวเคมี). กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

นิตยา จันชิว; จตุรพร พรศิลปะทิพย์; และ ปรียานาถ วงศ์จันทร์. (2551,กันยายน). การผลิตโมโนโคนอล แอนติบอดีจำเพาะต่อเฮพาแรนซัลเฟตโปรติโอกลัยแคนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ออร์สราดิชเปอร์ออกซิเดสสำหรับงานตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา. *วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่*. 41(3): 167 - 174.

ประเสริฐ อะมริต. (2554). *สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในดินเค็ม*. สืบค้นเมื่อ 8 กันยายน 2554, จาก http://www.tistr.or.th/t/publication/page_area_show_bc.asp?i1=83&i2=8

ปาริชาติ สมพิมาย. (2543). *ชนิดและความหนาแน่นของประชากรแพลงก์ตอนพืชในบังสีฐาน มหาวิทยาลัยขอนแก่น*. รายงานวิจัย วท.บ. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม). ขอนแก่น: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิมพ์ภาพ มณีธร. (2553). *ผลของแสงสีต่างๆ และการเพาะเลี้ยงในสภาวะเฮเทอโรโทรฟิกที่มีต่อการเจริญเติบโตและปริมาณไฟดคบิลิโปรตีนของไซยาโนแบคทีเรีย Oscillatoria* sp. KC 45. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

โพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์; และคณะ. (2554). ผลของความเค็มต่อการเจริญ รงควัตถุ และสารออสโมโพรเทคแทนต์ในไซยาโนแบคทีเรีย Oscillatoria sp.. *รายงานการประชุมวิชาการสาหร่ายและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 5.* สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

มาลินี ฉัตรมงคลกุล. (2554). *โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช : แพลงก์ตอนพืชจุดกำเนิดสิ่งมีชีวิตบนโลก*. สืบค้นเมื่อ 2 สิงหาคม 2554, จาก http://www.rspg.or.th/articles/series1/plankton1.htm.

ยุวดี พีรพรพิศาล. (2548). *สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน : สาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย*. เชียงใหม่: โชตนาพริ้นท์ จำกัด

----------. (2549). *สาหร่ายวิทยา*. พิมพ์ครั้งที่ 2. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ลือชัย อารยะรังสฤษฎ์; และ สุภาพร จันทร์บัวทอง. (2553). *รายงานวิจัย เรื่อง กิจกรรมของเอ็นไซม์ peroxidase กับปฏิกิริยาต่อโรคไหม้ของข้าวบางพันธุ์*. ปทุมธานี: ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี. ถ่ายเอกสาร.

วสันต์ ตั้งโภคานนท์; และคณะ. (2548). ความสัมพันธ์ของกลูตาไธโอน, กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสกับค่าทางโลหิตวิทยา และค่าเคมีคลินิกในสุนัขโตเต็มวัย และสุนัขสูงอายุ. *เชียงใหม่สัตวแพทยสาร.* 3: 21 – 29.

วีรานุช ปลื้มทรัพย์; มาโนชน์ เจริญหงษ์ทอง; จิระศักดิ์ ภู่รุ่งเจริญ; และ ธเนศ วงศ์ยะรา. (2544). การกระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จังหวัดสุพรรณบุรี. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39: สาขาวิทยาศาสตร์* : 161 – 167.

สมบัติ คงวิทยา; และคณะ. (2011). การตรวจหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในผลเงาะ. *วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อพัฒนาการเรียนรู้.* 2(2): 97 – 103.

สมพร เกษแก้ว; และ สุพร นุชดำรง. (2552). *เอกสารประกอบการสอน วิชา 318 312 เทคนิคทางชีวเคมี ภาคต้น ปีการศึกษา 2552 เรื่อง: Ion Exchange Chromatography*. ขอนแก่น: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์. (2543). การควบคุมการเจริญเติบโตของแพลงค์ตอนพืช (*Oscillatoria* sp.) โดยใช้ฟอร์มาลินและคลอรีน. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.* 18(3): 30 – 37.

สุนีรัตน์ เรืองสมบูรณ์; และ ศักดิ์ชัย ชูโชติ. (2550). การกำจัดตะกั่วจากน้ำเสียสังเคราะห์โดยใช้ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria jasorvensis* และ *Microcystis aeruginosa*. *วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง*. 14(1): 46 – 54.

สุวิตา เจริญศรี; และคณะ. (2551). การลดลงของระดับ Glutathione peroxidase activites ในประชากรอำเภอร่อนพิบูลย์. *รายงานการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 33*. กรุงเทพ: 1 – 5.

เสาวณี สุริยาภณานนท์; และคณะ. (2537). การศึกษากายวิภาควิทยา วิญชเคมีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส เอสเทอเรส และเอซิคฟอสฟาเตสของใบมะขาม. *รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32 สาขาพืช*. 541- 553.

เสาวนิตย์ ชอบบุญ; และ พัชรี หลุ่งหม่าน. (2553). ความหลากหลายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน และสาหร่ายสีเขียวในมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา*. 3(1): 71 – 83.

Al – Senaidy A.; & Ismael M. (2011). Purification and characterization of membrane – bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences.* 18(3): 293 – 298.

Alberto Vitali; et al. (1998). Purification and partial characterization of a peroxidase from plant cell cultures of C*assia didymobotrya* and biotransformation studies. *Biochem. J.* (331) : 513 – 519.

Almagro L.; et al. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany.* 60(2): 377 – 390.

Anbuselvi S. (2009). *Study on biodegradation of coir waste by cyanobacteria and comparing its efficiency with different organic manures on blackgram varieties*. Thesis (Ph.D.). Chennai, India: Faculty of Science and Humanities, Bharath university.

Becana M.; & Lotassa C. (2007). Oxidative stress as a response to salinity and aluminum. *Lotus Newsletter*. 37(3): 98.

Bhunia A.; Durani S.; & Wangikar P. (2002). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and bioengineering.* 72: 562 – 567.

Bradford M. (1976). A rapid method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein – dye binding, Anal. *Biochem*. 72: 248 – 254.

Chen M.; Yao S.; Zhang H.; & Liang X. (2010). Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii. Chinese Journal of Chemical Engineering.* 18(5): 824 – 829.

Conesa A.; Punt A.; & Hondel C. (2002). Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*. 93: 143 – 158.

Dittman E.; & Wiegand C. (2006). Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact o human affairs. *Mol Nutr Food Res.* 50: 7 – 17.

Flores E.; & Herrero A. (2010). Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature Reviews Microbiology.* 8: 39 – 50. Retrieved September 8, 2011, from http://www.nature.com/nrmicro/journal/v8/n1/fig_tab/nrmicro2242_F1.html

Graham; & Wilcox. (2000). *Cyanobacteria Gallery #1*. Retrieved September 1, 2011, from http://www.keweenawalgae.mtu.edu/gallery_pages/cyanobacteria1.htm

Gribovakaya; et al. (2009). Physiology – Biochemical Properties of the Cyanobacterium *Oscillatoria deflexa*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 45(3): 285 – 290.

Incharoensakdi A.; & Laloknam S. (2005). Nitrate uptake in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* is energy-dependent driven by ΔpH. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38(4): 468 - 473

Kennedy K.; Alemany K.; & Warith M. (2002). Optimization of soybean peroxidase treatment of 2,4-dichlorephenol. *Water Research*. 28: 149 – 158.

Koksal E. (2011). Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*): Purification and some biochemical properties. *International Journal of Pharmacology.* 7(1): 135 – 139.

Kongwithtaya S.; Laloknam S.; and Chairote G. (2010). Characterization of ammonium precipitatant peroxidase from Ivy gourd. *Proceedings of Pure and Applied chemistry international Conference 2010.* Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani university.

Latifi A.; Ruiz M.; & Zhang CC. (2009). Oxidative stress in cyanobacteria. *Federation of European Microbiological Societies.* 33(2): 258 – 278.

Massuda M.; Sakurai A.; & Sakakibara M. (2001). Effect of reaction conditions on Phenol removal by polymerization and precipitation using *Coprius cinereus* peroxidase. *Enzyme and Microbiol Technol.* 28: 295 – 300.

Mohamed S.; et al. (2011). Characterisation of an anionic peroxidase from horseradish cv. Balady. *Food Chemistry.* 128: 725 – 730.

Nicell A.; et al. (1993). Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from waste water. *Water Research*. 27: 1629 – 1639.

O'Brien P. (2000). Peroxidases. *Chemico – Biological Interactions.* 129: 113 – 139.

Ogawa J.; et al. (2004). Two extracellular proteins with alkaline peroxidase activity, a novel cytochrome c and a catalase-peroxidase, from *Bacillus* sp. No.13. *Biochim Biophys Acta.* 1699(1 – 2): 65 – 75.

Oguchi T.; Tawaki S.; Uyama H.; & Kobayashi S. (1999). Soluble polyphenol. *Macromolecular Rapid Communication.* 20: 401 – 403.

Osswald J.; Rellan S.; Gago A.; & Vasconcelos V. (2007). Toxicology and detection methods of the alkaloid neurotoxin produced by cyanobacteria, anatoxin – a. *Environment International.* 33: 1070 – 1089.

Panchali B.; & Ruma P. (2011). Response of cyanobacteria to arsenic toxicity. *Journal of Applied Phycology*. 23: 293 – 299.

Passardi F.; et al. (2007). PeroxiBase : The peroxidase database. *Phytochemistry*. 68: 1605 – 1611.

Quinn B.; & Graybiel A. (1996). A differentiated silver intensification procedure for the peroxidase – diaminobenzidine reaction. *The journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 44(1): 71 – 74.

Rao P.; & Ajila C. (2009). Purification and characterization of black gram (*Vigna mngo*) husk peroxidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymaatic*. 60: 36 – 44.

Regelsberger G.; et al. (2002). Occurrence and biochemistry of hydoperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (Cyanobacteria). *Plant Physiol. Biochem*. 40: 479 – 490.

Rout N.; & Shaw B. (2001). Salt tolerance in aquatic macrophytes: Possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Science.* 160: 415-423.

Rudrappa T.; Venkatachalam L.; Kaunain R.; Simgara N.; & Neelwarne B. (2007). Purification and characterization of an intracellular peroxidase from genetically transformed root of red beet (*Beta vulgaris* L.). *Food Chemistry.* 105: 1312 – 1320.

Saha S.; et al. (2010). Ligninolytic and antioxidative enzymes of a marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511 during Poly R – 478 decolourization. *Bioresource Technology.* 101: 3076 – 3084.

Saha S.; Uma L.; & Subramanian G. (2003). Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. *FEMS Microbiology Ecology.* 45: 263 – 272.

Sakharov I.; Vorobiev A.; & Leon J. (2003). Synthesis of polyelectrolyte complexes of polyaniline and sulfonated polystyrene by palm tree peroxidase. *Enzyme Microbiology and Technology.* 33: 661 – 667.

Saraiva J.; Nunes C.; & Coimbra M. (2007). Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry.* 101: 1571 – 1579.

Score A.; Palfreyman J.; & White N. (1997) Extracellular phenoloxidase and peroxidase enzyme production during interspecific fungal interaction. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 39(2-3): 225 – 233.

Shannon L.; Kay E.; & Lew J. (1965). Peroxidase isozymes from Horseadish roots. *The Journal of biological chemistry.* 241(9): 2166 – 2172.

Shigeoka S.; et al. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany.* 53(372): 1305 – 1319.

Shin K.; Oh I.; & Kim C. (1997). Production and purification of Remazol brilliant blue R decolorizing peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus. Applied and Environmental Microbiology.* 63: 1744 – 1748.

Singh J.; Dubey A.; Diwakar S.; Rawat S.; Batra N.; & Joshi A. (2010). Biochemical Characterization of peroxidase from the fruits of *Mullus pumilus. International Research Journal of Biotechnology.* 1(4): 050 – 058.

Sisecioglu M.; et al. (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Ra*phanus sativus L.). *Journal of Medicinal Plants Research.* 4(12): 1187 – 1196.

Smith T.; & Veitch C. (1998). Substrate binding and catalysis in heme peroxidase. *Chemical Biology.* 2: 269 – 278.

Spiker J.; Crawford D.; & Thiel E. (1992). Oxidation of phenolic and non – phenolic substrates by the lignin peroxidase of *Streptomyces viridosporus* T7A. *Apply Microbiol Biotechnol.* 37: 518 – 523.

Stewart K. (2011). Oscillatoria. Retrieved September 1, 2011, from http://filebox.vt.edu/users/chagedor/biol_4684/Microbes/Oscillatoria.htm.

Suzuki T.; et al. (2006). Characterization of peroxidase in buckwheat seed. *Phytochemistry.* 67(3): 219 – 224.

Takeda T.; et al. (1998). Purification and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris. Biochimie.* 80: 295 – 301.

Tognolli, M.; et al. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana. Gene*. 288: 129 – 138.

Veda P.; & Upendra N. (2011). Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68: 168 – 173.

Vernwal S; Yadav R.; & Yadav K. (2006). Purification of a peroxidase from Solanum melongena fruit juice. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 43. 239 – 243.

Wagner R. (2006). *chroococcus turgidus.* Retrieved September 1, 2011, from http://www.dr-ralf-wagner.de/Bilder/Chroococcus_turgidus.jpg

Yang Q.; et al. (2003). Decolourization of synthetic dyes and production of manganese dependent peroxidase by new fungal isolates. *Biotechnology Letters.* 25: 709 – 713.

Yazdi M.; Khaleghparast sh.; & Monsef H.R. (2002). Purification and some partial characterization of peroxidase isoenzyme from *Brassica oleracea capitata* L.. *Journal of science, Islamic Republic of Iran.* 13(2): 107 – 112.

Yoshihiro S.; et al. (2009). Molecular characterization of a novel peroxidase from the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *Applied and Environmental microbiology.* 75(23): 7509 – 7518.

Zhang Z.; Wang Z.; & Lin R. (1999). Purification and some properties of a peroxidase from Tartary buckwheat bran. *Fagopyrum.* 16: 57 – 60.

Zhao X.; et al. (2001). *Aedes aegypti* peroxidase gene characterization and developmental expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31: 481 – 490.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย BG_{11}

อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย BG_{11}

การเตรียม Stock Solution

Stock Solution I (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

K_2HPO_4	6.27 g

Stock Solution II (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

$MgSO_4 . 7 H_2O$	1.50 g

Stock Solution III (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

$CaCl_2 . 2 H_2O$	7.20 g

Stock Solution IV (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

$NaCl_2CO_3$	4.00 g

Stock Solution V (ปริมาตร 200 มิลลิลิตร)

EDTA	0.20 g
Citric acid	1.20 g
Ferric ammonium citrate	1.20 g

Stock Solution VI (Trace element A5 + Co ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

H_3BO_3	2.86 g
$MnCl_2 . 4 H_2O$	1.81 g
$ZnSO_4 . 7 H_2O$	0.22 g
$Na_2MoO_4 . 2 H_2O$	0.39 g
$CuSO_4 . 5 H_2O$	0.079 g
$Co(NO_3)_2 . 6 H_2O$	0.049 g

อาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย BG_{11} (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารเคมี

$NaNO_3$	1.50 g
KCl	0.67 g
$MnSo_4 . 7 H_2O$	6.92 g
$MgCl_2 . 6 H_2O$	5.50 g
$CaCl_2 . 2 H_2O$	1.47 g
Solution I	1.00 ml
Solution II	1.00 ml
Solution III	1.00 ml

Solution IV	1.00 ml
Solution V	1.00 ml
Solution VI	1.00 ml

ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 7.6 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งแรงดันไอน้ำ (Autoclave)

ภาคผนวก ข

การเตรียม Polyacrylamide gel electrophoresis

Polyacrylamide gel electrophoresis

Stock reagents

30% Acrylmide 0.8% bis stock solution

Acrylamide	30.00g
N,N'-methylene – bis acrylamide	0.80g

Adjust volume to 100 ml with distilled water

1.5 M Tris – HCl, pH 8.8

Tris(Hydroxymethyl)- aminomethane	18.17g

Adjust pH to 8.8 with 1 N HCl and final volume to 100 ml with distilled water

1.25 M Tris – HCl, pH 6.8

Tris(Hydroxymethyl)- aminomethane	15.14g

Adjust pH to 6.8 with 1 N HCl and final volume to 100 ml with distilled water

0.5 M Tris – HCl pH 6.8

Tris(Hydroxymethyl)- aminomethane	6.06g

Adjust pH to 6.8 with 1 N HCl and final volume to 100 ml with distilled water

Tris – Glycine electrode buffer stock – solution x5 (25 mM Tris, 192mM Glycine, pH 8.1)

Tris(Hydroxymethyl)- aminomethane	3.03g
Glycine	14.40g

Dissolve in distilled water to 200 ml to give final pH to be 8.1

Non denaturing PAGE

7.5% separating gel

30%acrylmide solution	5.0ml
1.5M Tris – HCl pH 8.8	5.0ml
Distilled water	10.0ml
TEMED	7.5µl
10% $(NH_4)_2S_2O_8$	50µl
Total volume	20ml

3% stacking gel

30%acrylmide solution	2.5ml
0.5M Tris – HCl pH 6.8	2.5ml
Distilled water	7.5ml
TEMED	7.5µl
10% $(NH_4)_2S_2O_8$	50µl
Total volume	10.0ml

Sample buffer

1.25 M Tris – HCl pH 6.8: glycerol: distilled water = 1: 2: 2 (v/v) were added with race amoun of bromophenol blue. For loading, sample was mixed withone part of sample buffer.

SDS – PAGE

7.5% separating gel

30%acrylmide solution	5.0ml
1.5M Tris – HCl pH 8.8	5.0ml
10% SDS	0.2ml
Distilled water	9.4ml
TEMED	10.0µl
10% $(NH_4)_2S_2O_8$	50µl
Total volume	20ml

3.0**% stackting gel**

30%acrylmide solution	1.0ml
0.5M Tris – HCl pH 6.8	2.5ml
10% SDS	0.1ml
0.2 M EDTA	0.1ml
Distilled water	7.5ml
TEMED	5.0µl
10% $(NH_4)_2S_2O_8$	50µl
Total volume	10ml

Solubilizing medium

Glycerol	2.0ml
1.25M Tris – HCl pH 6.8	1.0ml
20% SDS	1.0ml
β - mercatoethanol	1.0ml

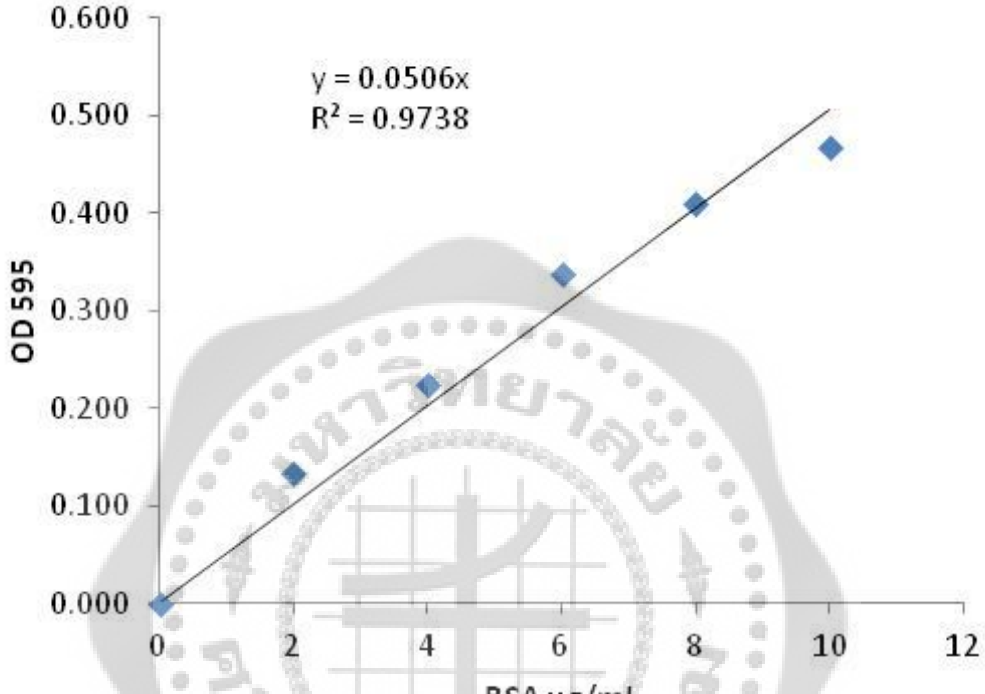
Bromophenol blue

One part of solubilizing medium was added to three parts of sample.

The mixture was heated 1 minute in boiling water befor loading to gel

ภาคผนวก ค

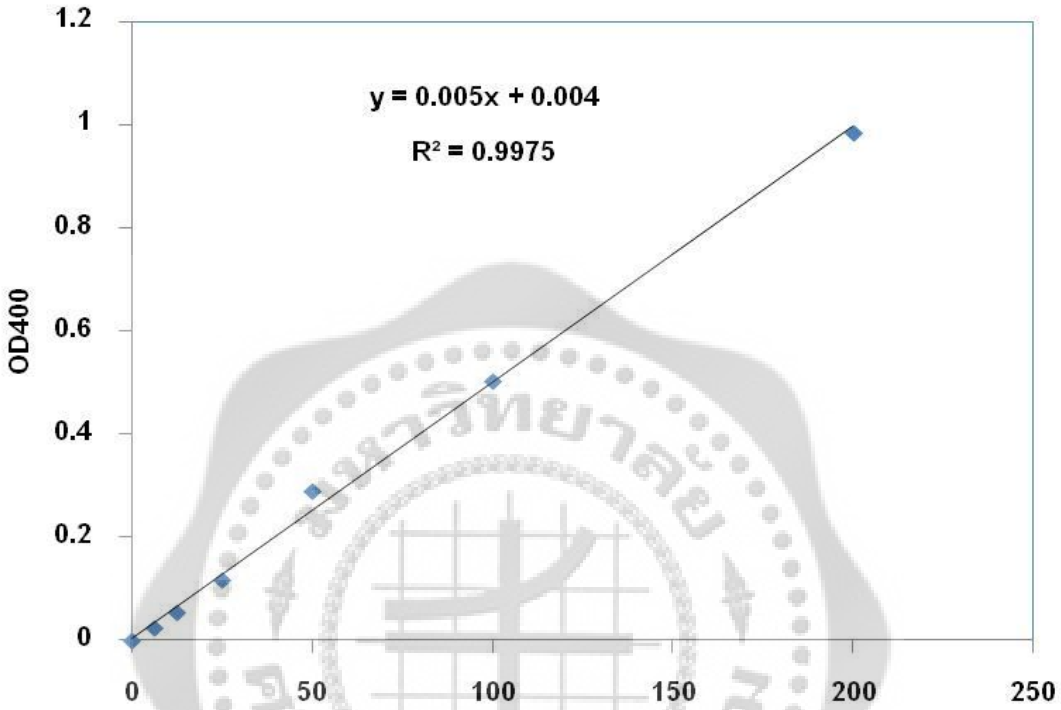
กราฟโปรตีนมาตรฐาน BSA



กราฟมาตรฐานโปรตีนBSA ด้วยวิธีของ Bradford

ภาคผนวก ง

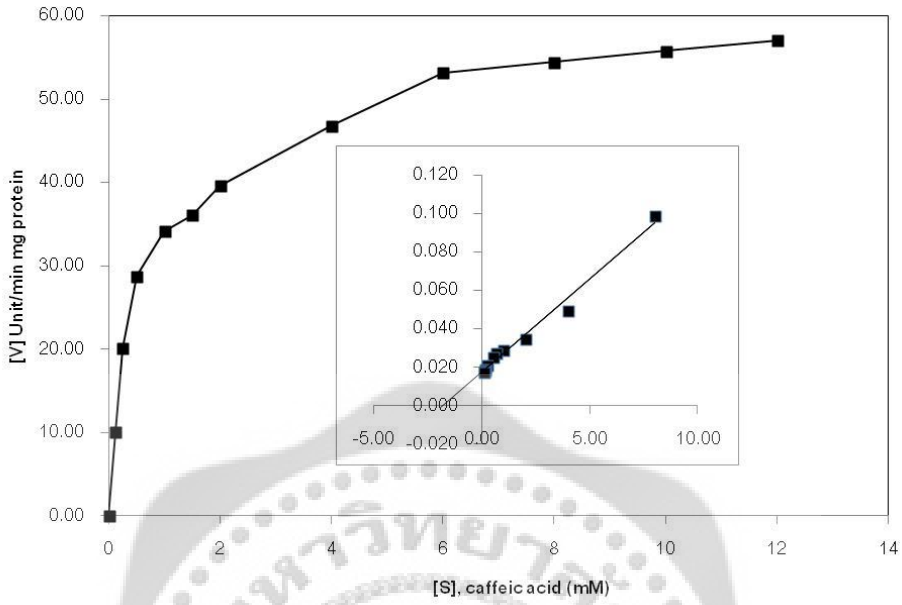
กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Gallic acid



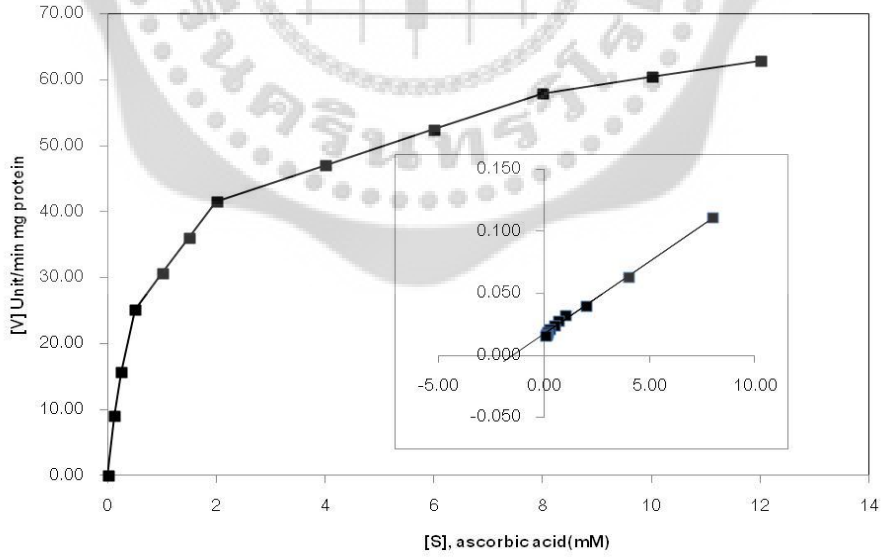
กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Gallic acid

ภาคผนวก จ

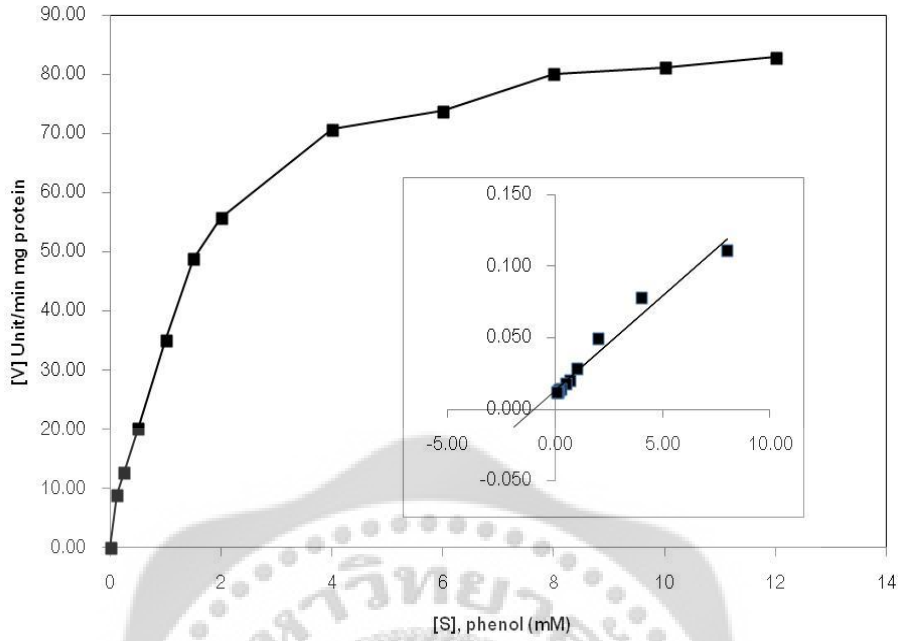
กราฟแสดงค่า K_m และ V_{max} ของเพอร์ออกซิเดสต่อสับเสตรท



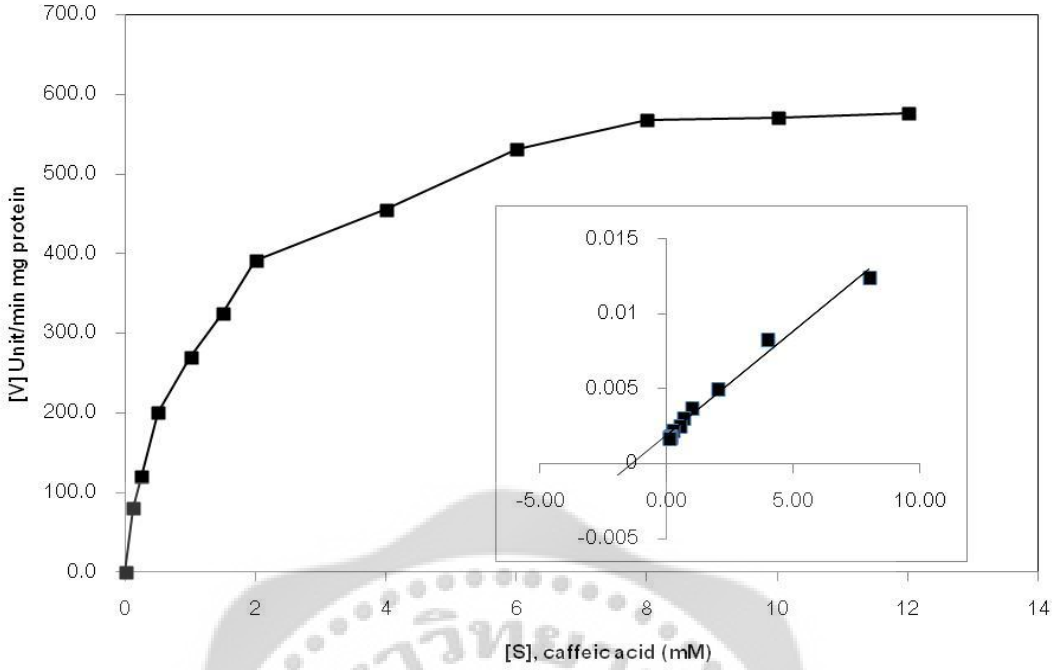
จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ caffeic acid เป็นซับสเทรต



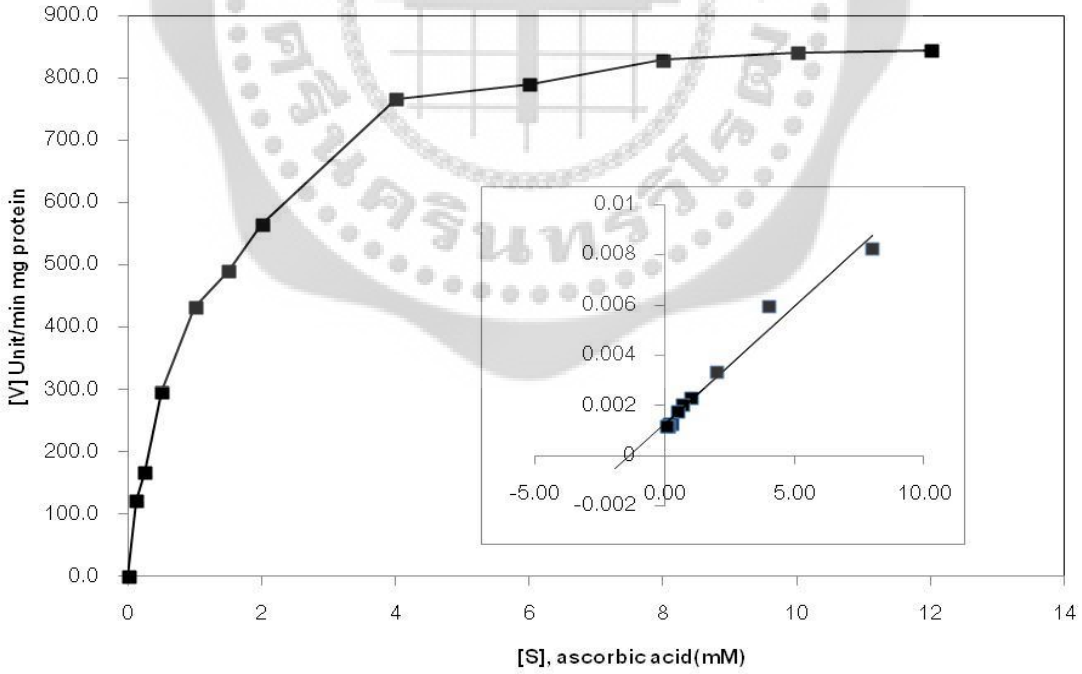
จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ ascorbic acid เป็นซับสเทรต



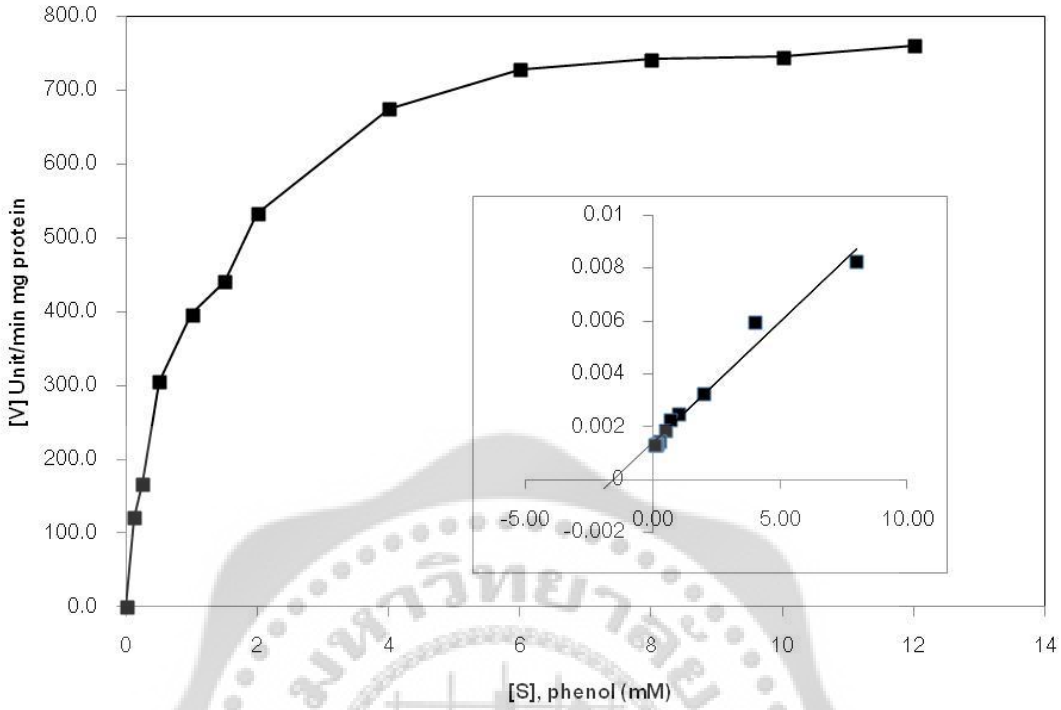
จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสสกัดหยาบจาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ phenol เป็นซับสเทรต



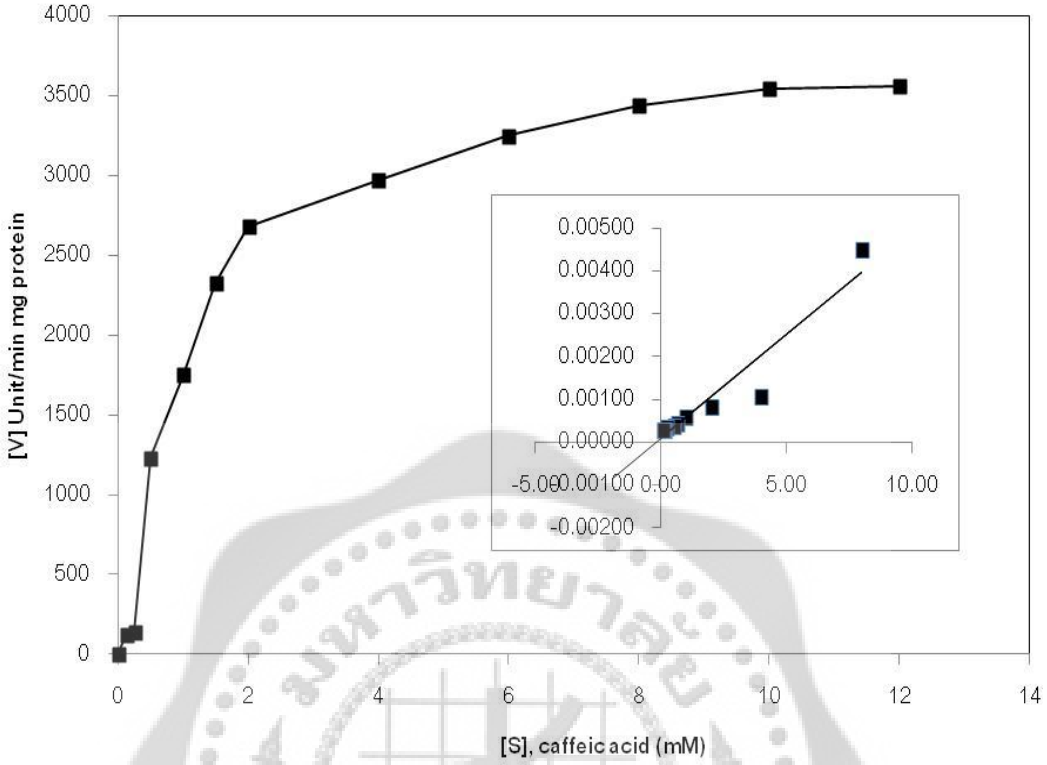
จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ caffeic acid เป็นซับสเทรต



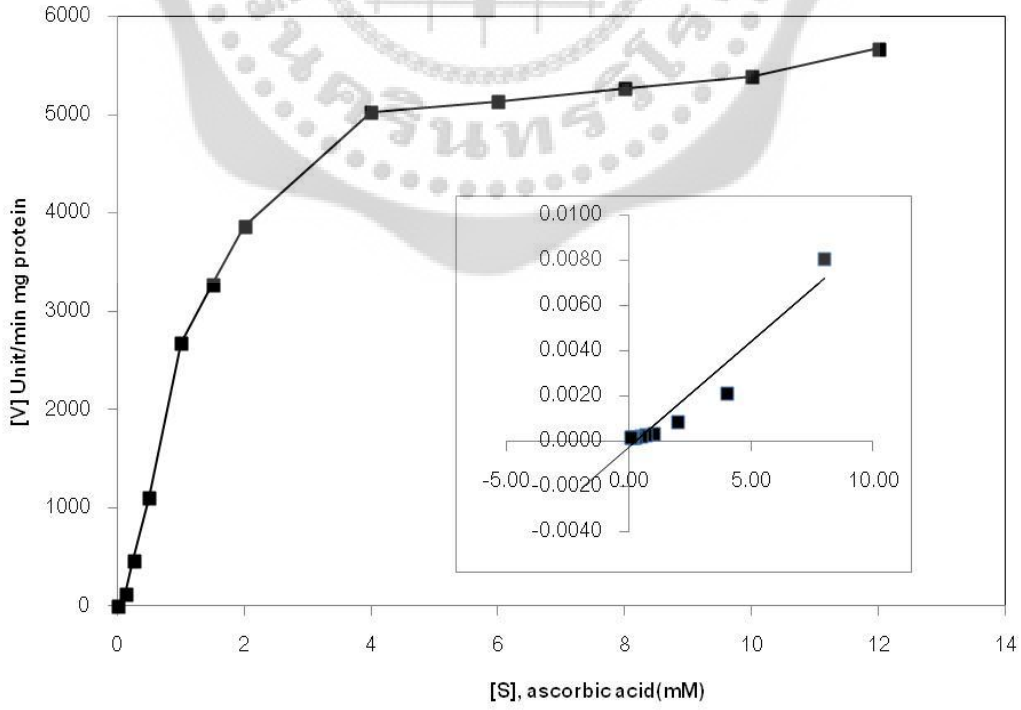
จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ ascorbic acid เป็นซับสเทรต



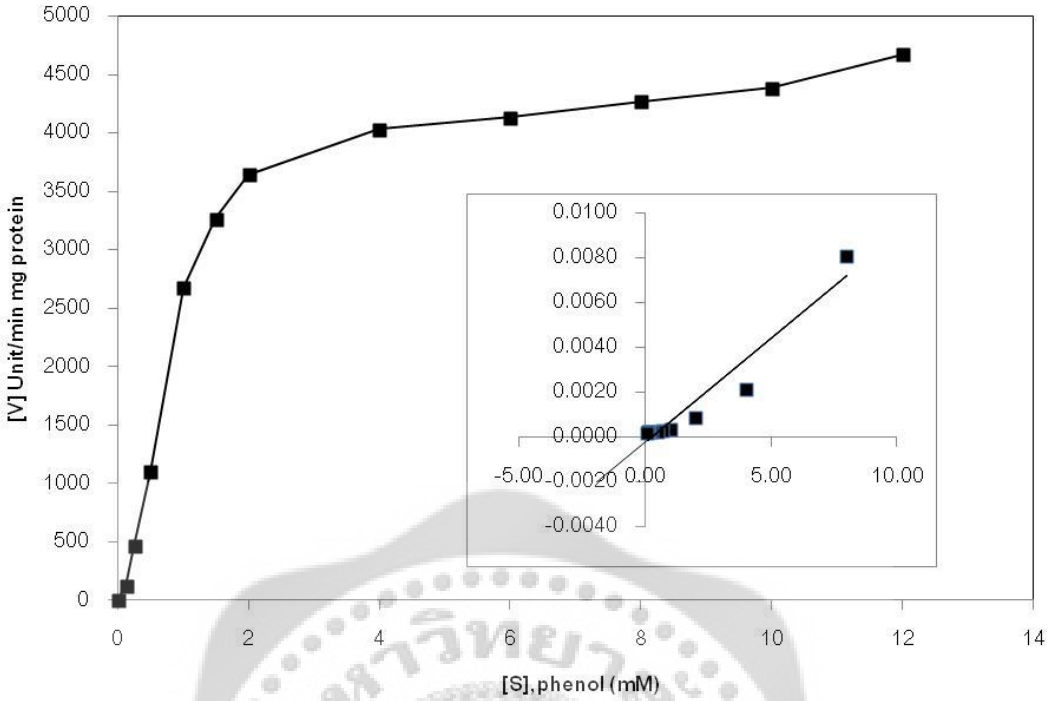
จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์บางส่วนจาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ phenol เป็นซับสเทรต



จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ caffeic acid เป็นซับสเทรต



จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ ascorbic acid เป็นซับสเทรต



จลนศาสตร์ของเพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จาก *Oscillatoria* sp. โดยใช้ phenol เป็นซับสเทรต

ภาคผนวก ฉ

รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติ

SCIENCE RESEARCH 4th CONFERENCE

มหาวิทยาลัยนเรศวร มหาวิทยาลัยบูรพา มหาวิทยาลัยพะเยา

Proceedings

การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 4

The 4th Science Research National Conference

วันที่ 12-13 มีนาคม 2555 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Detection of Peroxidase Activity in Cyanobacteria

Chaiyasad Kachensuwan[1,*], Surasak Laloknam[2,3] and Somkiat Phornphisutthimas [1,3]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand
[2]Department of General Science, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand
[3] Research Unit on Science Technology and Environment for Learning, Faculty of Science,
Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand
Tel. 02-649-5000 ext. 8660 Fax. 02-260-0128 E-mail: mesodrem_kik@hotmail.com

Abstract

This research aimed to detect the peroxidase activity from five cyanobacteria, *Oscillatoria* sp. *Nostoc* sp. *Synechocystis* PCC 6803 *Synechococcus* PCC 7942, and *Tolypothrix* sp. All samples were extracted by phosphate buffer, pH 7.0. The extracts were measured the peroxidase activity using a mixture of 4-amino antipyrine, phenol and hydrogen peroxide, and incubated at 30°C for 10 minutes. The result showed that the crude extract from *Oscillatoria* sp. for 14-day incubation had the highest peroxidase activity, 235.49 units/mg proteins. Peroxidase activity was reduced while NaCl was increased. The crude enzyme had the optimum temperature at 55°C and optimum pH at 9.0. Peroxidases were diluted at 3.21 fold, and partial purified as well as precipitation by saturated ammonium sulphate, yielded 57.98%. The partial purified enzyme showed peroxidase activity as 755.92 units/mg proteins, optimum temperature was 55 °C and optimum pH was 9.0.

Keyword: Detection/ Cyanobacteria/ Peroxidase

1. Introduction

Cyanobacteria (Blue green algae) are widely accepted as the major of phototrophic prokaryotes and oxygen evolving organisms [1]. They themselves are produced the free toxic oxygen, so they have to find the way to maintain their lives. They use a more or less extended time period to detoxify the oxygen; however, it still is more poisonous partially reduced species, called reactive oxygen species (ROS), e.g., superoxide radical, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide. The efficient removal (detoxification) of these ROS in cyanobacteria and other living cells is to adapt to the new way, i.e., increase oxygen-rich environment, elaborate a number of different redox enzymes including peroxidases and superoxide dismutase [2 – 3]. Under stress conditions, ROS are generated in cellular components, including DNA, protein and lipid membrane, of cell damage [4]. Cyanobacteria have evolved efficient antioxidant systems that can protect them from the damaging effects of oxidative stress. These mechanisms employ ROS scavenging enzymes, e.g., superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), and low molecular weight antioxidants, e.g., ascorbic acid, glutathione (GSH) and phenolic compounds [5]. The enhanced activity of superoxide dismutase and peroxidase (E.C. 1.11.1.7) were shown upon exposure to either NaCl or Seawater salinity [6]. Peroxidases (E.C. 1.11.1.7) are the enzymes that catalyze the H_2O_2 dependent oxidation of a widely substrates including phenolic compounds, aromatic amines and ascorbic acid [7 – 9]. In some previous reports, peroxidases were regarded as a marker enzyme and used in medical diagnosis immunochemistry and enzyme–linked immune–assay [10]. Peroxidases are widely distributed in all living organisms [11 – 12]. Peroxidases have been purified and characterized from a widely sources, such as *Chlorella vulgaris* [3], *Avicennia marine* [4], date palm leaves [7], *Pleurotus eryngii* [8], as well as Tartary buckwheat bran [10]. Thus, this study aimed to investigate the peroxidase activity in cyanobacteria.

2. Materials and methods

2.1 Microorganisms

Five species of cyanobacteria, *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 and *Tolypothrix* sp. were supported by Department of General Science, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

2.2 Culture conditions

All cyanobacteria were photoautotrophically grown in 100 ml of BG_{11} medium, pH 7.6. The media were supplemented by 0 – 0.5 M of NaCl concentration before sterilization using the autoclave at 15 lb/inch^2 for 15 min. The cultures were incubated at 28°C under continuous fluorescent white light (30μEm^{-2}s^{-1}) [13]. The growth was measured by estimation fresh weight of cyanobacteria for 30 days.

2.3 Enzyme extraction

The harvested cyanobacterial cells were washed three times with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 at room temperature. The 15-gram of wet sample was resuspended in 50 ml of phosphate buffer as a sonicating buffer. The cyanobacterial cells were disintegrated by sonicator at 30% amplitude using cycles of 20s on and 10s off for 10 min. The cell extracts were centrifuged at 5,000 x*g* for 15 min, at 4°C, and the supernatant was designated as crude enzyme which was used to determine peroxidase activity.

2.4 Enzyme assay and protein determination

Peroxidase activity was measured by colorimetric method following a modified Wright and Nicell [14]. A reaction mixture (5 ml in total) was contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 2 mM 4–AAP, 2mM phenol and 4 mM hydrogen peroxide. The mixture was incubated at room temperature, 30°C, for 10 min. The reaction was then started by adding 0.05 ml of crude enzyme, and the initial increase in absorbance was monitored at 500 nm using UV/VIS – Spectrophotometer Model Jenway 6405 (Jenway, UK). One unit of peroxidase activity was defined as the amount of the enzyme consuming 1 µmol of hydrogen peroxide per minute under the assay conditions. Protein was determined by Bradford method using bovine serum albumin as a standard [15].

2.5 Effect of salt stress on peroxidase activity

Effect of salt stress on peroxidase activity was determined after 1-hour incubation of the cyanobacteria cells in BG_{11} containing a range of 0 – 0.5 M NaCl.

2.6 Ammonium sulfate precipitation

The crude enzyme was fractionated by slowly adding the ammonium sulfate at concentration range of 0 – 100 % saturated $(NH_4)_2SO_4$ with continuous stirring at 4°C. Afterward, the precipitate was collected by centrifugation at 5,000 *xg* for 15 minutes at 4°C. The precipitate from each step was dissolved in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. The fractions were stored at 4°C to keep peroxidase activity before use.

2.7 Effect of temperature and pH on peroxidase activity

Effects of temperature and pH on enzyme activity were determined after 5-min incubation of the reaction mixtures at various temperature ranges from 4–100 °C. The dependence of pH on peroxidase activity was determined by using 50 mM buffers of different pH ranges of 4 – 11 in the following buffer: acetate buffer (4 – 5), phosphate buffer (6 – 7) and Tris–HCl buffer (8 – 11) at fixed concentration of substrates.

3. Results and Discussion

Five cyanobacterial species, *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 and *Tolypothrix* sp. were screened to assay the peroxidase activity. Ivy gourd (*Coccinia grandis* L.) and phosphate buffer (pH 7.0) were used as a positive control and a negative control, respectively.

The result showed all samples were found the peroxidase activity (Table 1). *Oscillatoria* sp. gave the highest peroxidase activity, following *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Synechocystis* PCC 6803, and *Synechococcus* PCC 7942, respectively.

Oscillatoria sp. was selected to study the optimum growth rate to find the highest peroxidase condition. After photoautotrophically grown in BG_{11} medium at 28°C, the mid-log phase was between 12 – 18 days. The highest peroxidase activity of *Oscillatoria* sp. was 14–day incubation (Fig. 1).

Table 1 Peroxidase activity in crude enzyme of 5 cyanobacterial species

Samples	Peroxidase activity (unit/mg protein)
Ivy gourd (Positive control)	349.95
Phosphate buffer (Negative control)	No activity
Oscillatoria sp.	235.49
Nostoc sp	220.32
Tolypothrix sp.	198.42
Synechocystis PCC 6803	197.11
Synechococcus PCC 7942	195.56

The effect of salt stress on peroxidase activity was also investigated. The results showed that the *Oscillatoria* sp. incubated in BG_{11} medium containing 0 M NaCl concentration had the highest peroxidase activity, and the activity was then decreased when NaCl concentration increased (Fig. 2).

The effect of temperature on the peroxidase activity of crude enzymes was investigated. The maximum peroxidase activity from *Oscillatoria* sp. was at 55°C, and active peroxidase activity was in a range of 40 – 60°C. When increasing temperature, the peroxidase activity was decreased, and wholly inhibited at 100°C (Fig. 3). A wide variability with regard to temperature has been reported for peroxidases from various sources, e.g., *Raphanus sativus* L. with optimum temperature at 60°C [11] and *Leucaena leucocephala* [16] with the optimum temperature at 55°C.

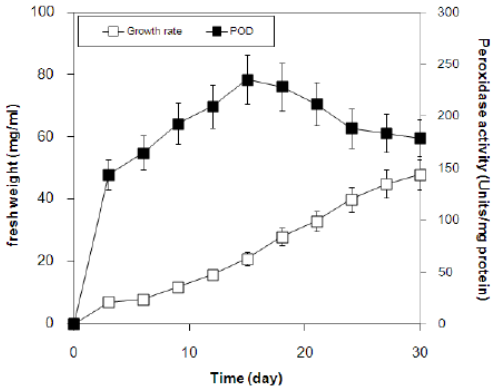


Fig. 1 Growth rate and peroxidase activity of *Oscillatoria* sp.

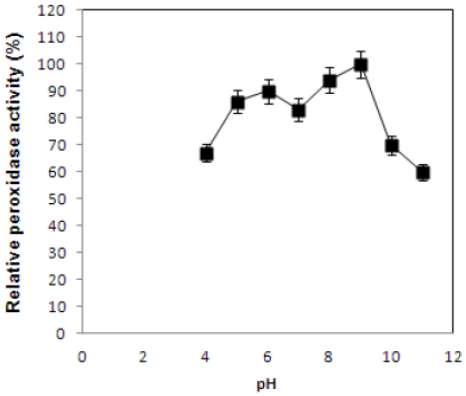


Fig. 4 Effect of pH on peroxidase activity in crude enzyme from *Oscillatoria* sp.

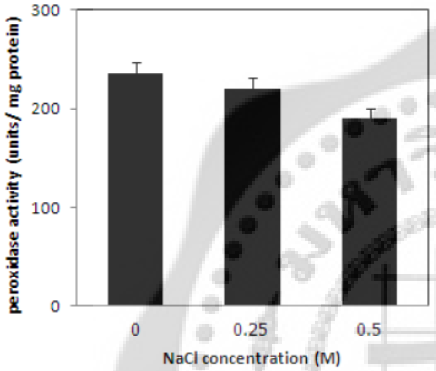


Fig. 2 Effect of salt stress on peroxidase activity of *Oscillatoria* sp.

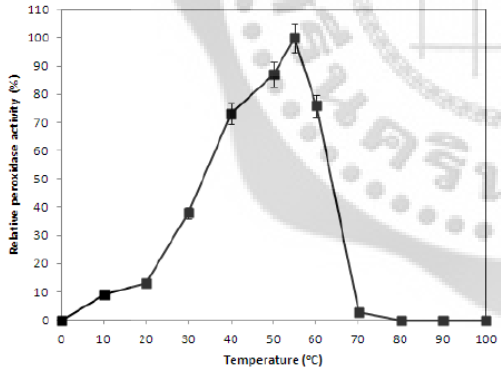


Fig. 3 Effect of temperature on peroxidase activity in crude enzyme of *Oscillatoria* sp.

The pH effect on the peroxidase activity was investigated. Peroxidases from *Oscillatoria* sp. were alkaline, acidic and natural. The optimum pH on peroxidase activity was showed at pH 9 (Fig. 4). The optimum pH for the peroxidases from various sources such as *Leucaena leucocephala* at pH 5 [16] Ivy gourd at pH 7 [17] and *Bacillus* sp. No.13 at pH 10 [18] were reported as this study.

Peroxidase was salted out using a range of 0 – 100% saturated ammonium sulfate. The 60 – 80 % of saturated ammonium sulfate showed the highest specific activity of 828.92 units/mg protein. The maximum peroxidase precipitation was obtained at 80% saturated ammonium sulfate. The result of partial purification at a range of 0 – 80% saturated ammonium sulfate showed the highest specific activity as 755.92 units/mg protein. The yield of enzyme partially purified at 3.21 fold was 57.98% as shown in Table 2.

Table 2 Purification of precipitated peroxidase from *Oscillatoria* sp.

Percentage of saturated $(NH_4)_2SO_4$	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purity (fold)
crude enzyme	235.49	100	1.00
0 – 20	105.97	6.23	0.45
20 – 40	310.85	21.36	1.32
40 – 60	581.66	32.21	2.47
60 – 80	828.92	28.64	3.52
80 – 100	61.23	5.49	0.26
0 – 80	755.92	57.98	3.21

The effect of temperatures on the partial purified peroxidase activity was determined. The maximum activity of partial purified peroxidases was at 55 °C, and its optimum temperature was at a range of 40 – 60 °C. The peroxidase activity was decreased when temperature was increased at a range of 40 – 60 °C, and dramatically decreased and/or inhibited at 100°C as shown in Fig. 5.

The effect of pH on partial purified peroxidase activity was investigated. The peroxidases from *Oscillatoria* sp. were a mix of alkaline, acidic and natural enzymes. The optimum pH on partial purified peroxidase activity was at pH 9 (Fig. 6).

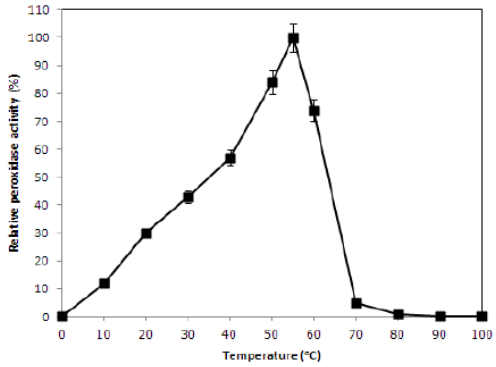


Fig 5 Effect of temperature on partial purified peroxidase activity of *Oscillatoria* sp.

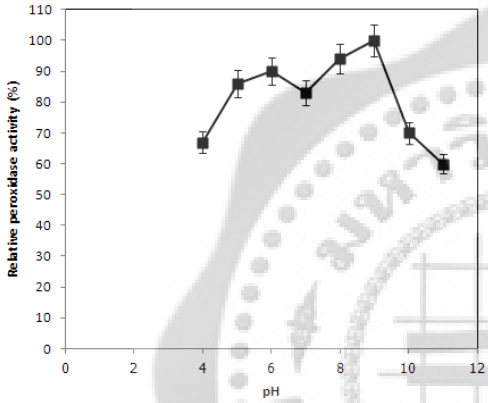


Fig 6 Effect of pH on partial purified peroxidase activity of *Oscillatoria* sp.

4. Conclusion

In conclusion, all cyanobacterial samples showed the activity of peroxidases as others reported, e.g., in *Oscillatoria* sp. *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Synechocystis* PCC 6803, and *Synechococcus* PCC 7942. The highest peroxidase activity from *Oscillatoria* sp. was at 14–day incubation, and the activity was decreased when the NaCl concentration was added up. The optimum temperature and pH of the crude enzyme was at 55°C and pH 9, respectively. The partial purified peroxidases at 3.21 folds using ammonium sulfate precipitation was also the same optimum temperature and pH as total pericipitation previously. The peroxidases from five cyanobacteria can be purified using the simple procedure and used for enzymatic reactions in living cells [19 – 22].

Acknowledgement

We thank for the Department of Biology, the Department of General science, Faculty of Science, and the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University for the material and instrument supports in this study.

References

1. Incharoensakdi A. and Laloknam S. (2005). Nitrate uptake in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* is energy-dependent driven by Δ pH. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 38(4):pp. 468 – 473
2. Regelsberger G. Jakopitsch C., Plasser L., Schwaiger H., Furtmuller P. Peschek G., Zamocky M. and Obinger C. (2002). Occurrence and biochemistry of hydoperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (Cyanobacteria). *Plant Physiol. Biochem*. 40: 479 – 490.
3. Takeda T., Yoshimura K. and Shigeoka S. (1998). Purification and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris*. *Biochimie*. 80: pp. 295 – 301.
4. Kavitha K., Venkateraman G. and Parida A. (2008). An oxidative and salinity stress induced peroxisomal ascorbate peroxidase from *Avicennia marine*: Molecular and functional characterization. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: pp. 794 – 804.
5. Becana M., and Lotassa C. (2007). Oxidative stress as a response to salinity and aluminum. *Lotus Newsletter*. 37(3): 98.
6. Rout N. and Shaw B. (2001). Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzyme. *Plant Science*. 160: pp. 415 – 423.
7. Al – Senaidy A. and Ismael M. (2011). Purification and characterization of membrane – bound peroxidase from date palm leaves (*Phoenix dactylifera* L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 18(3): pp. 293 – 298.
8. Chen M., Yao S., Zhang H. and Liang X. (2010). Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 18(5): pp. 824 – 829.
9. Singh J., Dubey A., Diwakar S., Rawat S., Batra N., and Joshi A. (2010). Biochemical Characterization of peroxidase from the fruits of *Mullus pumilus*. *International Research Journal of Biotechnology*. 1(4): 050 – 058.
10. Zheng Z., Wang Z. and Lin R. (1999). Purification and some properties of a peroxidase from Tartary buckwheat bran. *Fagopyum*. 16: pp. 57 – 60.
11. Melda S., Ilhami G., Murat C., Ali A., Hilal M. Habibe B., and Hasan O. (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(12): pp. 1187-1196.
12. Koksal E. (2011). Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*): Purification and some biochemical properties. *International Journal of Pharmacology*. 7(1): pp. 135 – 139.

13. Laloknam S. (2005). Effects of salt stress on choline transport into halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. Ph.D. (Biotechnology). Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
14. Wright, H. and Nicell, J.A. (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenol. *Biores. Technol.* 70: pp. 69 – 79.
15. Bradford M. (1976). A rapid method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein – dye binding, Anal. *Biochem.* 72: pp. 248 – 254.
16. Veda P. and Dwivedi N. (2011). Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 68: pp. 168 – 173.
17. Kongwithtaya S., Laloknam S. and Chairote G. (2010). Characterization of ammonium precipitatant peroxidase from Ivy gourd. *Proceedings of Pure and Applied chemistry international Conference 2010.* Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani university.
18. Ogawa J., TRiarsi W., Sulistyaningdyah T., Li Q., Tanaka H., Xie S., Kana K., Ikeda T. and Shimizu S. (2004). Two extracellular proteins with alkaline peroxidase activity,a noal cytochrome *C* and a catalase – peroxidase, from *Bacillus* sp. No.13. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1699: pp. 65 – 75.
19. Ihsan G. (2008). The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tbers. *African J. of Biotechnology* 7(13): pp 2248 – 2253.
20. Ajila C., Prasada Rao U. (2008). Purification and characterization of black gram (Vign mungo) husk peroxidase. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 60: pp. 36 – 44.
21. Vernwal S., Yadav R. and Yadav K. (2006). Purification of a peroxidase from Solanum melongena fruit juice. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 43. 239 – 243.
22. Erman J. and Vitelo L. (2002). Yeast cytochrome *c* Peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1597: pp. 193 - 220.

การประชุมวิชาการระดับชาติ
ศรีนครินทรวิโรฒวิชาการ
ครั้งที่
6
Proceedings
ISBN : 978-616-7299-96-9
เล่ม 2
29-30 พฤษภาคม 2555
สถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การประชุมวิชาการระดับชาติ
ศรีนครินทรวิโรฒวิชาการ
ครั้งที่ 6
Proceedings
ISBN : 978-616-7299-96-9
29-30 พฤษภาคม 2555
สถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
http://research.swu.ac.th

การประชุมวิชาการ "ศรีนครินทรวิโรฒวิชาการ" ครั้งที่ 6
29 – 30 พฤษภาคม 2555 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

SWU6-1106: การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp.

CHARACTERIZATION OF AMMONIUM SULFATE PRECIPITANT PEROXIDASE FROM CYANOBACTERIA *Oscillatoria* SP.

ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ[1,*], สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ[1,3], สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ[2,3]
Chaiyasad Kachensuwan[1,*], Somkiat Phomphisutthimas[1,3], Surasak Laloknam[2,3]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[1]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Thailand.
[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[2]Department of General Science, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Thailand.
[3]หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[3]Research Unit on Science Techonology and Environment for Learning, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Thailand.
***Corresponding author, E-mail:** mesoderm_kik@hotmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 5 ชนิด ได้แก่ *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 และ *Tolypothrix* sp. โดยสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 และติดตามแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสด้วย 4 - amino antipyrine, gallic acid และ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ทำการปมที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 10 นาที พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. สร้างเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสสูงที่สุดหลังจากปมเพาะ 14 วัน โดยมีแอคทิวิทีเท่ากับ 235.49 units/mg proteins เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงพบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. สร้างเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสลดลง สารสกัดหยาบเอนไซม์ให้แอคทิวิทีที่สูงที่สุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 55°C และพีเอช 9.0 จากนั้นตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 0-80 พบว่า ให้ผลผลิตร้อยละ 57.98 และความบริสุทธิ์ 3.21 เท่า ให้แอคทิวิทีเท่ากับ 755.92 units/mg proteins อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสเท่ากับ 55°ซ และ 9.0 ตามลำดับ ค่าจลศาสตร์ของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส K_m และ V_{max} เท่ากับ 0.944 mM และ 461.209 units/min-mg proteins ตามลำดับ เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสถูกกระตุ้นโดย Mn^{2+}, K^+, Na^+, and Ca^{2+} และถูกยับยั้งโดย Hg^{2+} and Zn^{2+} ตามลำดับ โดยพบว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสให้แอคทิวิทีในภาวะที่มี Urea, EDTA และ Sodium dodecyl sulfate

คำสำคัญ: เพอร์ออกซิเดส ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

Abstract

This study aimed to investigate the screening of peroxidase activity from five cyanobacteria, *Oscillatoria* sp. *Nostoc* sp. *Synechocystis* PCC 6803 *Synechococcus* PCC 7942, and *Tolypothrix* sp.. All samples were extracted by phosphate buffer, pH 7.0. The extracts were measured the peroxidase

activity using a mixture of 4-amino antipyrine, gallic acid and hydrogen peroxide, and incubated at 30°C for 10 minutes. The result showed that the crude extract from *Oscillatoria* sp. for 14-day incubation had the highest peroxidase activity, 235.49 units/mg proteins. Peroxidase activity was reduced while NaCl was increased. The crude enzyme had the optimum temperature at 55°C and optimum pH at 9.0. Percentage of ammonium sulfate fractionation at 0-80% saturation was selected to precipitate of peroxidase from cyanobacterium *Oscillatoria* sp. crude extract. Peroxidase was purified 3.21 fold with 57.98% yield. The partial purified enzyme showed peroxidase activity as 755.92 units/mg proteins, optimum temperature was 55°C and optimum pH was 9.0. Peroxidase showed K_m and V_{max} were 0.944 mM and 461.209 units/min-mg proteins, respectively. Peroxidase activity was enhanced by Mn^{2+}, K^+, Na^+, and Ca^{2+} and strongly inhibited Hg^{2+} and Zn^{2+}, respectively. Peroxidase had stability in the presence of Urea, EDTA and Sodium dodecyl sulfate.

Keywords: Peroxidase Characterization Cyanobacterium Ammonium sulfate precipitation

Introduction

Cyanobacteria (Blue green algae) are widely accepted as the major of phototrophic prokaryotes and oxygen evolving organisms [1]. They themselves are produced the free toxic oxygen, so they have to find the way to maintain their lives. They use a more or less extended time period to detoxify the oxygen; however, it still is more poisonous partially reduced species, called reactive oxygen species (ROS), e.g., superoxide radical, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide. Detoxification of these ROS in cyanobacteria and other living cells is to adapt to the new way, i.e., increase oxygen-rich environment, elaborate a number of different redox enzymes including peroxidases and superoxide dismutase [2-3]. Under stress conditions, ROS are generated in cellular components, including DNA, protein and lipid membrane, of cell damage [4]. Cyanobacteria have evolved efficient antioxidant systems that can protect them from the damaging effects of oxidative stress. These mechanisms employ ROS scavenging enzymes, e.g., superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), and low molecular weight antioxidants, e.g., ascorbic acid, glutathione (GSH) and phenolic compounds [5]. The enhanced activity of superoxide dismutase and peroxidase (E.C. 1.11.1.7) were shown upon exposure to either NaCl or Seawater salinity [6]. Peroxidases (E.C. 1.11.1.7) are the enzymes that catalyze the H_2O_2 dependent oxidation of a widely substrates including phenolic compounds, aromatic amines and ascorbic acid [7-9]. In some previous reports, peroxidases were regarded as a marker enzyme and used in medical diagnosis immunochemistry and enzyme – linked immune – assay [10]. Peroxidases are widely distributed in all living organisms [11-12]. Peroxidases have been purified and characterized from a widely sources, such as Chlorella vulgaris [3], Avicennia marine [4], date palm leaves [7], Pleurotus eryngii [8], as well as Tartary buckwheat bran [10].

The preliminaries work to screen of cyanobacteria have peroxidase activity and therefore is selected the cyanobacterium showed highest peroxidase activity to produce of the enzyme. Five cyanobacterial species, *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 and *Tolypothrix* sp. were used as a source of peroxidase production, which has not been

attempted before. These could be an alternative commercial source of high peroxidase activity. *Oscillatoria* sp. gave the highest peroxidase activity. However, extraction of enzyme is a limitation to enzyme production because reduce enzyme activity and yield. Conventional initial purification step, ammonium sulfate precipitation was selected for this research to reduce process time, low energy consumption and biocompatible environment to the biomolecule due to the presence of large amounts of water in the extraction systems. Therefore, in the present study were investigated the property of ammonium sulfate precipitate peroxidase from cyanobacterium *Oscillatoria* sp. to use enzyme source for phenolic compound biosensor.

Objectives

To screen the highest peroxidase producing sources from five cyanobacteria and partial purified by ammonium sulfate precipitation and characterized of peroxidase from cyanobacterium *Oscillatoria* sp.

Methods

Microorganisms: Five species of cyanobacteria, *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 and *Tolypothrix* sp. were supported by Department of General Science, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

Culture conditions: All cyanobacteria were photoautotrophically grown in 100 ml of BG_{11} medium, pH 7.6. The media were supplemented by 0-0.5 M of NaCl concentration before sterilization using the autoclave at 15 lb/inch2 for 15 min. The cultures were incubated at 28°C under continuous fluorescent white light ($30\mu Em^{2}s^{-1}$) [13]. The growth was measured by estimation fresh weight of cyanobacteria for 30 days.

Enzyme extraction: The harvested cyanobacterial cells were washed three times with 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 at room temperature. The 15-gram of wet sample was resuspended in 50 ml of phosphate buffer as a sonicating buffer. The cyanobacterial cells were disintegrated by sonicator at 30% amplitude using cycles of 20s on and 10s off for 10 min. The cell extracts were centrifuged at 5,000 xg for 15 min, at 4°C, and the supernatant was designated as crude enzyme which was used to determine peroxidase activity.

Enzyme assay and protein determination: Peroxidase activity was measured by colorimetric method following a modified Wright and Nicell [14]. A reaction mixture (50 ml in total) was contained 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 2 mM 4–AAP, 2mM gallic acid and 4 mM hydrogen peroxide. The mixture was incubated at room temperature (30°C), for 10 min. The reaction was then started by adding 0.05 ml of crude enzyme, and the initial increase in absorbance was monitored at 400 nm using UV/VIS – Spectrophotometer Model Jenway 6405 (Jenway, UK). One unit of peroxidase activity was defined as the amount of the enzyme consuming 1 µmol of hydrogen peroxide per minute under the assay conditions. Protein was determined by Bradford method using bovine serum albumin as a standard [15].

Effect of salt stress on peroxidase activity: Effect of salt stress on peroxidase activity was determined after 1-hour incubation of the cyanobacteria cells in BG_{11} containing a range of 0-0.5 M

NaCl.

Ammonium sulfate precipitation: The crude enzyme was fractionated by slowly adding the ammonium sulfate at concentration range of 0-100% saturated $(NH_4)_2SO_4$ with continuous stirring at 4°C. Afterward, the precipitate was collected by centrifugation at 5,000 xg for 15 minutes at 4°C. The precipitate from each step was dissolved in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0. The fractions were stored at 4°C to keep peroxidase activity before use.

Optimum temperature, Optimum pH and Enzyme kinetic: Effects of temperature and pH on enzyme activity were determined after 5-min incubation of the reaction mixtures at various temperature ranges from 4-100°C. The dependence of pH on peroxidase activity was determined by using 50 mM buffers of different pH ranges of 4-11 in the following buffer: acetate buffer (4-5), phosphate buffer (6-7) and Tris–HCl buffer (8-11) at fixed concentration of substrates. Kinetics was studied with ammonium sulfate precipitant peroxidase using gallic acid as substrate. The inset is the Lineweaver – Burk plot for K_m and V_{max} estimation.

Effect of urea, Sodium dodecyl sulfate, EDTA and Cations: Peroxidase were incubated with increasing concentration (0-10 mM) of urea, SDS and EDTA for 15 min in 50 mM phosphate buffer pH 7.0 at 30°C (room temperature). Also the effects of cations was examined using different cations, Cr^{3+}, Fe^{3+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Mg^{2+}, Hg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+} and K^{+}, respectively. Peroxidase was incubated with increasing concentration of various cations for 15 min in 50 mM phosphate buffer pH 7.0 at 30°C (room temperature). Peroxidase activity was determined after each incubation period. The activity of the untreated enzyme was considered as control (100%) for calculating percent activity.

Results

Five cyanobacterial species, *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Synechocystis* PCC 6803, *Synechococcus* PCC 7942 and *Tolypothrix* sp. were screened to assay the peroxidase activity. Ivy gourd (*Coccinia grandis* L.) and phosphate buffer (pH 7.0) were used as a positive control and a negative control, respectively. The result showed all samples were found the peroxidase activity (Table 1). *Oscillatoria* sp. gave the highest peroxidase activity, following *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Synechocystis* PCC 6803, and *Synechococcus* PCC 7942, respectively.

Table 1 Peroxidase activity in crude enzyme of 5 cyanobacterial species

Samples	Peroxidase activity (unit/mg protein)
Ivy gourd (Positive control)	349.95
Phosphate buffer (Negative control)	No activity
Oscillatoria sp.	235.49
Nostoc sp	220.32
Tolypothrix sp.	198.42
Synechocystis PCC 6803	197.11
Synechococcus PCC 7942	195.56

Oscillatoria sp. was selected to study the optimum growth rate to find the highest peroxidase condition. After photoautotrophically grown in BG_{11} medium at 28°C, the mid-log phase was between 12-18 days. The highest peroxidase activity of *Oscillatoria* sp. was 14 – day incubation (Figure 1). The effect of salt stress on peroxidase activity was also investigated. The results showed that the *Oscillatoria* sp. incubated in BG_{11} medium containing 0 M NaCl concentration had the highest peroxidase activity, and the activity was then decreased when NaCl concentration increased (Figure 2).

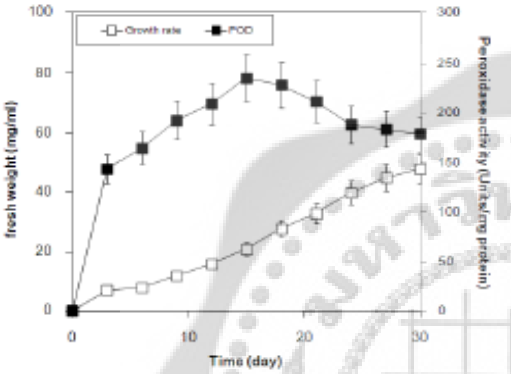


Figure 1 Growth rate and peroxidase activity of *Oscillatoria* sp.

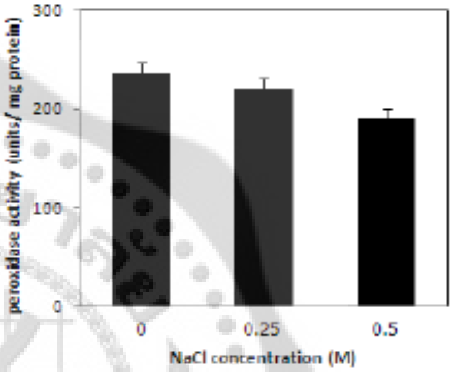


Figure 2 Effect of salt stress on peroxidase activity of Oscillatoria sp.

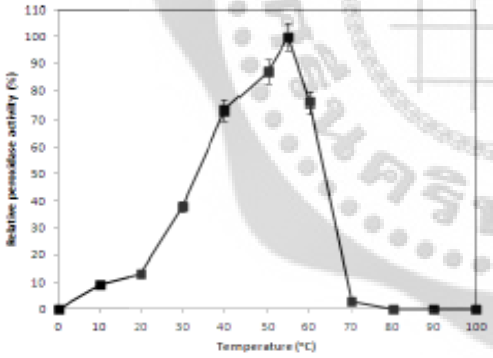


Figure 3 Effect of temperature on peroxidase activity in crude enzyme from *Oscillatoria* sp.

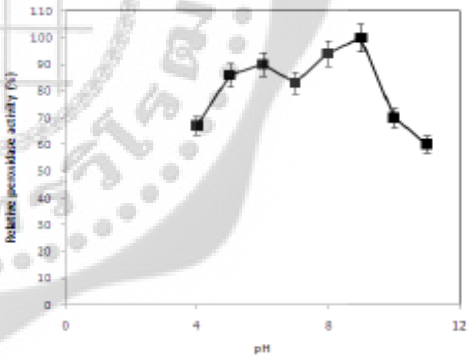


Figure 4 Effect of pH on peroxidase activity in crude enzyme from *Oscillatoria* sp.

The effect of temperature on the peroxidase activity of crude enzymes was investigated. The maximum peroxidase activity from *Oscillatoria* sp. was at 55°C, and active peroxidase activity was in a range of 40-60°C. When increasing temperature, the peroxidase activity was decreased, and wholly inhibited at 100°C (Figure 3). A wide variability with regard to temperature has been reported for peroxidases from various sources, e.g., *Raphanus sativus* L. with optimum temperature at 60°C [11] and *Leucaena leucocephala* [16] with the optimum temperature at 55°C.

The pH effect on the peroxidase activity was investigated. Peroxidases from *Oscillatoria* sp. were alkaline, acidic and natural. The optimum pH on peroxidase activity was showed at pH 9 (Figure 4). The optimum pH for the peroxidases from various sources such as *Leucaena leucocephala* at pH 5 [16] Ivy gourd at pH 7 [17] and *Bacillus* sp. No.13 at pH 10 [18] were reported as this study.

The filtered crude extract was added by ammonium sulfate to precipitate ranged of 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 and 80-100% saturation. The result showed that ammonium sulfate fractionation ranged of 60-80% saturation was the highest specific activity, 828.92 units/mg proteins and ammonium sulfate precipitation ranged of 20-80% saturation was selected for partial purification of *Oscillatoria* sp. peroxidase data as shown in Table 2.

Table 2 Purification of precipitated peroxidase from *Oscillatoria* sp.

Percentage of saturated $(NH_4)_2SO_4$	Specific activity (units/mg protein)	Yield (%)	Purity (fold)
crude enzyme	235.49	100	1.00
0 – 20	105.97	6.23	0.45
20 – 40	310.85	21.36	1.32
40 – 60	581.66	32.21	2.47
60 – 80	828.92	28.64	3.52
80 – 100	61.23	5.49	0.26
0 – 80	755.92	57.98	3.21

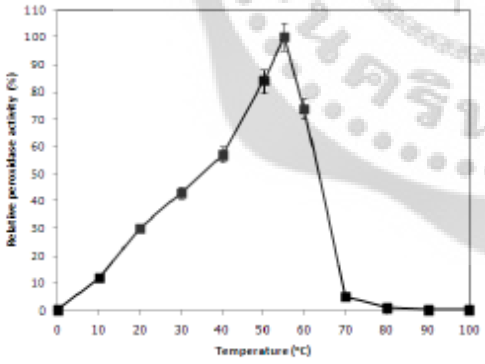


Figure 5 Effect of temperature on partial purified peroxidase activity of *Oscillatoria* sp.

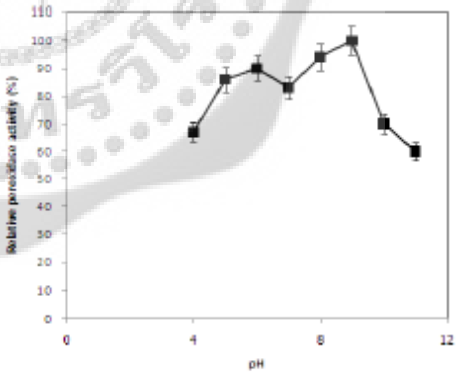


Figure 6 Effect of pH on partial purified peroxidase activity of *Oscillatoria* sp.

The effect of temperatures on the partial purified peroxidase activity was determined. The maximum activity of partial purified peroxidases was at 55°C, and its optimum temperature was at a range of 40-60°C. The peroxidase activity was decreased when temperature was increased at a range of 40-60°C, and dramatically decreased and/or inhibited at 100°C as shown in Figure 5.

The effect of pH on partial purified peroxidase activity was investigated. The peroxidases from *Oscillatoria* sp. were a mix of alkaline, acidic and natural enzymes. The optimum pH on partial purified peroxidase activity was at pH 9 (Figure 6).

The apparent kinetic parameters for ammonium sulfate precipitant peroxidase are shown in Figure 7. The plot shown is foe gallic acid. The K_m and V_{max} values for *Oscillatoria* sp. peroxidase were 0.944 mM and 461.209 Unit/min-mg proteins, respectively.

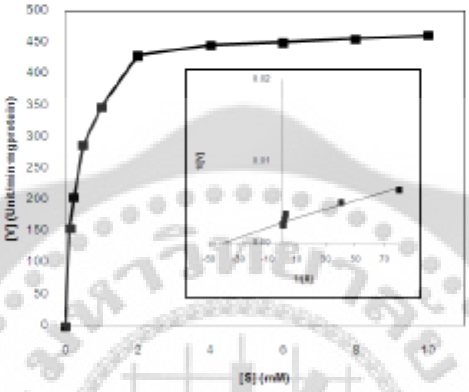


Figure 7 Kinetic of *Oscillatoria* sp. peroxidase activity

Urea, EDTA, SDS and some cations were determined for peroxidase activity. Peroxidase activity did not change when Urea concentration increases. The peroxidase activity was enhanced in the presence of 2 mM of EDTA, the enzyme still activity at EDTA range of 4-10 mM. SDS, an anionic detergent on the activity of peroxidase indicated that peroxidase activity of SDS was increased at 4 mM, and the activity did not change when increased its concentration to 10 mM as shown in Figure 8.

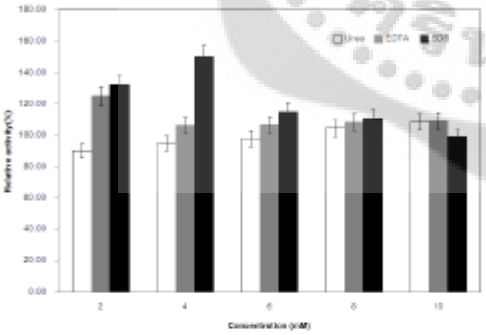


Figure 8 Effect of Urea, EDTA and SDS on partial purified peroxidase activity of *Oscillatoria* sp.

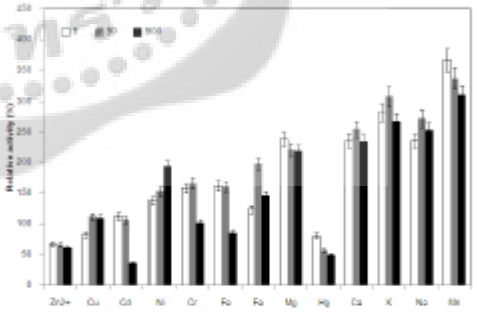


Figure 9 Effect of cations on partial purified peroxidase activity of *Oscillatoria* sp.

Cations, peroxidase activity was enhanced in the presence of Mn^{2+}, K^{+}, Na^{+}, and Ca^{2+} because of some heavy metals act as cofactor for enzyme reaction. Also, peroxidase activity was strongly inhibited by Hg^{2+}, Zn^{2+} and 500 µM of Cd^{2+} (Figure 9) because of heavy metal precipitated the protein and denatured enzyme protein.

Conclusions and Discussion

In conclusion, all cyanobacterial samples showed the activity of peroxidases as others reported, e.g., in *Oscillatoria* sp. *Nostoc* sp., *Tolypothrix* sp., *Synechocystis* PCC 6803, and *Synechococcus* PCC 7942. The highest peroxidase activity from *Oscillatoria* sp. was at 14 – day incubation, and the activity was decreased when the NaCl concentration was added up. The optimum temperature and pH of the crude enzyme was at 55°C and pH 9, respectively. The partial purified peroxidases at 3.21 folds using ammonium sulfate precipitation was also the same optimum temperature and pH as total pericipitation previously. The K_m and V_{max} values for *Oscillatoria* sp. peroxidase were 0.944 mM and 461.209 Unit/min-mg proteins. Peroxidase activity did not change when Urea concentration increases. The peroxidase activity was still activity at EDTA range of 4-10 mM. The activity did not change when increased SDS concentration to 10 mM. The activity of peroxidase was enhanced by Mn^{2+}, K^{+}, Na^{+}, and Ca^{2+} and strongly inhibited Hg^{2+} and Zn^{2+}, respectively. The peroxidases from five cyanobacteria can be purified using the simple procedure and used for enzymatic reactions in living cells [19-22].

References

[1] Incharoensakdi, A.; & Laloknam, S. (2005). Nitrate uptake in the halotolerant cyanobacterium Aphanothece halophytica is energy-dependent driven by pH. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38(4): 468-473.

[2] Regelsberger, G.; et al. (2002). Occurrence and biochemistry of hydoperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (Cyanobacteria). *Plant Physiol. Biochem*. 40: 479-490.

[3] Takeda, T.; Yoshimura, K.; & Shigeoka, S. (1998). Purification and characterization of ascorbate peroxidase in Chlorella vulgaris. *Biochimie*. 80: 295-301.

[4] Kavitha, K.; Venkateraman, G.; & Parida, A. (2008). An oxidative and salinity stress induced peroxisomal ascorbate peroxidase from Avicennia marine: Molecular and functional characterization. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 794-804.

[5] Becana, M.; & Lotassa, C. (2007). Oxidative stress as a response to salinity and aluminum. *Lotus Newsletter*. 37(3): 98.

[6] Rout, N.; & Shaw, B. (2001). Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzyme. *Plant Science*. 160: 415-423.

[7] Al – Senaidy, A.; & Ismael, M. (2011). Purification and characterization of membrane – bound peroxidase from date palm leaves (Phoenix dactylifera L.). *Saudi Journal of Biological Sciences*. 18(3): 293-298.

[8] Chen, M.; et al. (2010). Purification and characterization of a versatile peroxidase from edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 18(5): 824-829.

[9] Singh, J.; et al. (2010). Biochemical Characterization of peroxidase from the fruits of *Mullus pumilus*. *International Research Journal of Biotechnology*. 1(4): 50-58.

[10] Zheng, Z.; Wang, Z.; & Lin, R. (1999). Purification and some properties of a peroxidase from Tartary buckwheat bran. *Fagopyum*. 16: 57-60.

[11] Melda, S.; et al. (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*. 4(12): 1187-1196.

[12] Koksal, E. (2011). Peroxidase from leaves of spinach (*Spinacia oleracea*): Purification and some biochemical properties. *International Journal of Pharmacology*. 7(1): 135-139.

[13] Laloknam, S. (2005). *Effects of salt stress on choline transport into halotolerant cyanobacterium Aphanothece halophytica*. Dissertation, Ph.D. (Biotechnology). Bangkok: Chulalongkorn University.

[14] Wright, H.; & Nicell, J.A. (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenol. *Biores. Technol*. 70: 69-79.

[15] Bradford, M. (1976). A rapid method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein – dye binding, Anal. *Biochem*. 72: 248-254.

[16] Veda, P.; & Dwivedi, N. (2011). Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68: 168-173.

[17] Kongwithtaya, S.; Laloknam, S.; & Chairote, G. (2010). *Characterization of ammonium precipitatant peroxidase from Ivy gourd*. In *Proceedings of Pure and Applied chemistry international Conference 2010 (CD - ROM)*. Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani university.

[18] Ogawa, J.; et al. (2004). Two extracellular proteins with alkaline peroxidase activity,a noal cytochrome C and a catalase – peroxidase, from *Bacillus* sp. No.13. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1699: 65-75.

[19] Ihsan, G. (2008). The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tbers. *African J. of Biotechnology*. 7(13): 2248-2253.

[20] Ajila, C.; & Prasada, Rao U. (2008). Purification and characterization of black gram (*Vign mungo*) husk peroxidase. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 60: 36-44.

[21] Vernwal, S.; Yadav, R.; & Yadav, K. (2006). Purification of a peroxidase from Solanum melongena fruit juice. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 43. 239-243.

[22] Erman, J.; & Vitelo, L. (2002). Yeast cytochrome *C* Peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1597: 193-220.

วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้
ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 (2555)

J. Res. Unit Sci. Technol. Environ. Learning Vol. 3 No. 1 (2012)

การคัดกรองไซยาโนแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส

ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ[1,*] สมบัติ คงวิทยา[2] สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ[1,4] และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ[3,4]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110
[2]กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรุงเทพฯ 10400
[3]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110
[4]หน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพฯ 10110
*E-mail: mesodrem_kik@hotmail.com

รับบทความ: **10 พฤศจิกายน 2554** ยอมรับตีพิมพ์: **25 กุมภาพันธ์ 2555**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl และตรวจหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Anabeana ambigua Nostoc commune Spilurina* sp. *Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina* และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 ในอาหาร BG_{11} โดยสกัดตัวอย่างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 และติดตามแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสด้วย 4-amino antipyrine, gallic acid และ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 นาที พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabeana ambigua Nostoc commune Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina* และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 เจริญได้ดีในภาวะที่ไม่มีเกลือ NaCl ส่วน *Spilurina* sp. เจริญได้ดีในภาวะที่มีเกลือ NaCl เข้มข้น 0.25 โมลาร์ และภาวะทนเค็มของ *Anabeana ambigua* น้อยกว่า 0.25 โมลาร์ ในขณะที่ *Nostoc commune Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina Oscillatoria* sp. TISTR 8491 และ *Spilurina* sp. น้อยกว่า 0.5 โมลาร์ จากการศึกษาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส พบว่า *Anabeana ambigua Nostoc commune Spilurina* sp. *Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina* และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 มีแอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 32.34 29.75 12.86 10.67 9.60 และ 3.82 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เพอร์ออกซิเดสทำงานได้ในช่วงพีเอช 4 – 11 และทำงานได้ดีในภาวะที่เป็นแบส ค่าพีเอชเท่ากับ 9.0

คำสำคัญ: การคัดกรอง เพอร์ออกซิเดส ไซยาโนแบคทีเรีย ภาวะความเค็ม

วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 (2555)

A Screening of Cyanobacteria Producing the Peroxidase

Chaiyasad Kachensuwan[1,*], Sombat Kongwithtaya[2], Somkiat Phornphisutthimas[1,4] and Surasak Laloknam[3,4]

[1]Department of Biology, Faculty of science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand
[2]Department of Science Service, Ministry of Science and Technology, Bangkok 10400, Thailand
[3]Department of General Science Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand
[4]Research Unit on Science Technology and Environment for Learning, Faculty of science, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand
*E-mail: mesodrem_kik@hotmail.com

Abstract

This research aimed to study the growth of six cyanobacteria, *Anabeana ambigua*, *Nostoc commune*, *Spilurina* sp., *Oscillatoria* sp., *Oscillatoria salina* and *Oscillatoria* sp. TISTR 8491, on salt stress by increasing of NaCl in BG_{11} medium, and detect their peroxidase activities. The samples were extracted by phosphate buffer, pH 8.0. The peroxidase activities from extracts were measured using a mixture of 4-aminoantipyrine, gallic acid and hydrogen peroxide, incubated at 30°C for 10 minutes. The result showed that the optimal growth rate of *Anabeana ambigua*, *Nostoc commune*, *Oscillatoria* sp., *Oscillatoria salina* and *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 under no salanity while *Spilurina* sp. was 0.25 M NaCl. The salt stress condition on growth of *Anabeana ambigua* was under 0.25 M NaCl, *Nostoc commune*, *Oscillatoria* sp., *Oscillatoria salina*, *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 and *Spilurina* sp. was under 0.5 M NaCl. The specific activities of crude extracts from *Anabeana ambigua*, *Nostoc commune*, *Spilurina* sp., *Oscillatoria* sp., *Oscillatoria salina* and *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 were 32.34, 29.75, 12.86, 10.67, 9.60 and 3.82 Units/mg protein, respectively. The peroxidase activities were stable at the pH range of 4 – 11, with optimal activities at alkaline condition at pH 9.0.

Keywords: Screening, Peroxidase, Cyanobacteria, Salinity

บทนำ:

เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase: E.C. 1.11.1.7) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron accepter) (Singh et al., 2010) และออกซิไดซ์ซับสเตรตที่ให้อิเล็กตรอน เช่น ฟีนอล (phenol) อะโรมาติกเอมีน (aromatic amines) และกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) (Vernwal et al., 2006) จึงมีการนำเพอร์ออกซิเดสไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายทั้งในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกรรม และในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีสารประกอบฟีนอลซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (นิตยา จันชิว และคณะ, 2551; สุวิตา เจริญศรี และวรางคณา จุ้งลก, 2551; ลือชัย อารยะ-รังสฤษฎ์ และสุภาพร จันทร์บัวทอง, 2554) เพอร์ออกซิเดสที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้มาจากรากฮอร์สเรดิช (horse-radish root) (Dunford, 1999) ซึ่งมีราคาสูงจึงได้มีการหาเพอร์-ออกซิเดสจากแหล่งอื่น ๆ เช่น สัตว์ พืช และแบคทีเรีย (Kong-withtaya et al., 2010) เพื่อช่วยในการลดต้นทุนในการนำเข้าจากต่างประเทศ

ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) เป็นสิ่งมีชีวิตพวกโพรแคริโอตที่สามารถสร้างอาหารด้วยกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (phototrophic prokaryotes) (Incharoensakdi and Laloknam, 2005) ไซยาโนแบคทีเรียบางชนิดสามารถตรึงไนโตรเจนได้ (nitrogen-fixing cyanobacteria) เช่น *Nostoc* sp. และ *Anabaena* sp. (ยุวดี พีรพรพิศาล และคณะ, 2551)

J. Res. Unit Sci. Technol. Environ. Learning Vol. 3 No. 1 (2012)

ในภาวะความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จากสารอนุมูลอิสระ (free radical) ที่มีออกซิเจนในโมเลกุล (reactive oxygen species: ROS) เช่น อนุมูลซูปเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical) และอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radical) (Regelsberger et al., 2002) ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหาย เช่น การกลายของดีเอนเอ (DNA mutation) การทำลายสภาพโปรตีน (protein carbonylation) (Kongwithtaya et al., 2008) สิ่งมีชีวิตมีกลไกรักษาสมดุลโดยการกำจัดสารกลุ่ม ROS โดยเซลล์มีการตอบสนองด้วยกลไกในการสังเคราะห์เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidative enzyme) เช่น แคแทเลส (catalase) เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) เพื่อช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (Becana and Lotassa, 2007) โดยมีรายงานการตรวจพบแอคทิวิทีของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. *Nostoc* sp. *Tolypothrix* sp. *Synechocystis* PCC 6803 และ *Synechococcus* PCC 7942 ซึ่งสอดคล้องกับ *Oscillatoria willei* BDU 130511 ซึ่งสร้างเอนไซม์ซูปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxidedismutase: SOD) และเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase: POX) ในภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจน (Saha et al., 2003)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองและตรวจหาแหล่งผลิตเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Anabena ambigua Nostoc commune Spirulina* sp. *Oscillatoria salina Oscillatoria* sp. TISTR 8491 และ *Oscillatoria* sp. เพื่อใช้เป็นแหล่งข้อมูลเพอร์ออกซิเดสเพื่อลดการนำเข้าเพอร์-ออกซิเดสจากต่างประเทศ

วิธีดำเนินการวิจัย

ไซยาโนแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย: มีจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Anabena ambigua Nostoc commune Spirulina* sp. *Oscillatoria salina Oscillatoria* sp. TISTR 8491 และ *Oscillatoria* sp. ซึ่งได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

การเพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรีย: เพาะเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสูตร BG_{11} ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0 – 1 M ภายใต้ภาวะที่มีแสงขาว ($30\mu Em^{2}s^{-1}$) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเป็นเวลา 30 วันโดยการชั่งน้ำหนักแห้ง

ภาวะปกติ คือ ภาวะที่ทำให้การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียดีที่สุด และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl คือภาวะที่ทำให้การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียเป็นครึ่งหนึ่งของภาวะปกติ

การสกัดหยาบเอนไซม์: ล้างเซลล์ไซยาโนแบคทีเรีย 1 กรัม ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 mM (pH 7.0) ที่อุณหภูมิห้อง จำนวน 3 ครั้ง ทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 ×*g* เป็นเวลา 15 นาที และนำส่วนใสไปวัดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การตรวจหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสและปริมาณโปรตีน: ตรวจหาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสด้วยวิธีการ colorimetric method (Kongwithtaya et al., 2010) ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 2 mM 4-amino antipyrine (4-AAP) 2 mM gallic acid และ 4 mM hydrogen peroxide บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที ปฏิกิริยาเริ่มต้นด้วยการเติมสารสกัดหยาบเอนไซม์ 0.05 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV/VIS spectrophotometer model Jenway 6405 (Jenway, UK) คำนวนยูนิตของเอนไซม์ โดย 1 ยูนิต ของเพอร์ออกซิเดส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เข้มข้น 1 ไมโครโมล ใน 1 นาทีภายใต้ภาวะทดลอง

หาปริมาณโปรตีนโดยใช้สารละลาย Comassie brilliant blue G-25 (Fluka, Switzerland) ด้วยวิธีของ Bradford โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (Bradford, 1976)

การหาพีเอชที่เหมาะสมของเพอร์ออกซิเดส: ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 50 mM ที่มีค่าพีเอชในช่วง 4 – 11 ดังนี้ สารละลาย acetate buffer (pH 4 – 5) phosphate buffer (pH 6 – 7) และ Tris-HCl (pH 8 – 11) จากนั้นนำไปวัดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

ผลการวิจัย

การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ *Anabena ambigua Nostoc commune Oscillatoria* sp, *Oscillatoria salina Oscillatoria* sp. TISTR 8491 และ *Spirulina* sp. ในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียสูตร BG_{11} ในภาวะที่มีเกลือ NaCl เข้มข้น 0 – 1 M พบว่า ไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดเจริญได้ถึงระยะกลางแบบทวีคูณ (mid-log phase) อยู่ระหว่าง 12 – 18 วัน โดย *Anabena ambigua Nostoc commune Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina* และ*Oscillatoria* sp. TISTR 8491 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงไซยาโนแบคทีเรียที่ไม่มีเกลือ ในขณะที่ *Spirulina* sp. เจริญได้ดีในอาหารสูตรที่มีเกลือ NaCl เข้มข้น 0.25 M การเจริญภายใต้ภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl ของไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดลดลงเมื่อเลี้ยงที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.5 M ขึ้นไป *Nostoc commune Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina Oscillatoria* sp. TISTR 8491 และ *Spirulina* sp. ไม่สามารถเจริญได้ ในขณะที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ขึ้นไป *Anabena ambigua* ไม่สามารถเจริญได้ ดังตาราง 1

ตาราง 1 การเจริญของไซยาโนแบคทีเรียในภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl

ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl* (M)		
	ภาวะที่เหมาะสม	ภาวะที่มีความเครียด	ความสามารถในการทนเค็ม
Anabena ambigua	0	0.25	< 0.25
Nostoc commune	0	0.50	< 0.50
Oscillatoria salina	0	0.50	< 0.50
Oscillatoria sp. TISTR 8491	0	0.50	< 0.50
Oscillatoria sp.	0	0.50	< 0.50
Spirulina sp.	0.25	0.50	< 0.50

*ระดับความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่ใช้ในการศึกษา 0 – 1 M

จากการสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Anabena ambigua Nostoc commune Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina Oscillatoria* sp. TISTR 8491 และ *Spirulina* sp. โดยใช้เซลล์ที่มีอายุ 12 – 18 วัน ด้วยสารละลาย Tris-HCl buffer เข้มข้น 50 mM (pH 8.0) และวัดแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส พบว่า *Anabena ambigua* มีแอคทิวิทีจำเพาะสูงสุด เท่ากับ 32.34 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาได้แก่ *Nostoc commune* (29.75 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) *Spirulina* sp. (12.86 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) *Oscillatoria* sp. (10.67 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) *Oscillatoria salina* (9.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 (3.82 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ดังตาราง 2

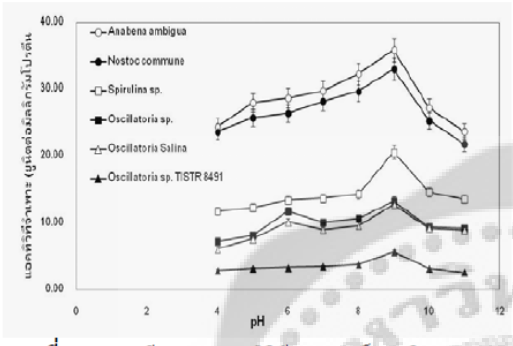
ตาราง 2 แอคทิวิทีเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย

ชนิดของไซยาโนแบคทีเรีย	แอคทิวิทีจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
Anabena ambigua	32.34
Nostoc commune	29.75
Spirulina sp.	12.86
Oscillatoria sp.	10.67
Oscillatoria salina	9.60
Oscillatoria sp. TISTR 8491	3.82

จากการหาพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่าง ๆ พบว่าไซยาโนแบคทีเรียให้แอคทิวิทีในช่วงพีเอช 4 – 11 โดยไซยาโนแบคทีเรียทุกชนิดให้แอคทิวิทีสูงสุดที่ภาวะเบส (pH 9.0) โดย *Anabena ambigua* ให้แอคทิวิทีจำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 35.89 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาเป็น *Nostoc commune* ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 33.02 ยูนิต ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

J. Res. Unit Sci. Technol. Environ. Learning Vol. 3 No. 1 (2012)

Spirulina sp. ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 20.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน *Oscillatoria* sp. ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 13.28 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน *Oscillatoria salina* ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 12.78 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 ให้แอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 5.67 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส

จากภาพที่ 1 พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. และ *Oscillatoria salina* อาจพบไอโซไซม์ (isozyme) ของเพอร์ออกซิเดส จึงทำให้พบแอคทิวิทีที่พีเอช 6 และ 9 โดย *Oscillatoria* sp. มีแอคทิวิทีจำเพาะที่พีเอช 6 และ 9 เท่ากับ 11.78 และ 13.28 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และ *Oscillatoria salina* มีแอคทิวิทีจำเพาะเท่ากับ 10.16 และ 12.78 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้ พบว่า ไซยาโนแบคทีเรีย *Anabena ambigua Nostoc commune Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina Oscillatoria* sp. TISTR 8491 และ *Spirulina* sp. มีการเจริญถึงระยะกลางแบบทวีคูณในช่วง 12 – 18 วัน โดยพบว่า *Anabena ambigua Nostoc commune Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina Oscillatoria* sp. TISTR 8491 เจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีเกลือ *Spirulina* sp. เจริญได้ที่ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl 0.25 โมลาร์ และภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ NaCl พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นการเจริญของไซยาโนแบคทีเรียจะลดลง โดย *Anabena ambigua* ไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มตั้งแต่ 0.25 โมลาร์ ของเกลือ NaCl ส่วน *Nostoc commune Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina Oscillatoria* sp. TISTR 8491 และ *Spirulina* sp. ไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0.5 M ขึ้นไป ซึ่งสอดคล้องกับโพธิธรณ์ ครรชิตานุรักษ์ และคณะ (2555) พบว่า *Oscillatoria* sp.และ *Nostoc* sp. เจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl เท่ากับ 0 – 0.5 โมลาร์ และ *Anabaena* sp. สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีเกลือ NaCl เข้มข้น 0 – 0.25 โมลาร์ เช่นเดียวกับ บงกช บุญบุรพงษ์ และคณะ (2554) ที่รายงานว่า *Synechococcus* PCC 7942 เป็นไซยาโนแบคทีเรียน้ำจืดสามารถทนเค็มได้น้อยกว่าความเข้มข้นของเกลือ NaCl 0.5 โมลาร์ ในขณะที่ *Synechocytis* sp. PCC6803 และ *Aphanothece halophytica* ทนเค็มได้สูงถึง 1.5 โมลาร์และ 3.0 โมลาร์ ตามลำดับ

จากการศึกษาแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรีย 6 ชนิด พบว่า *Anabena ambigua* ให้แอคทิวิทีจำเพาะสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ *Nostoc commune Spirulina* sp. *Oscillatoria* sp. *Oscillatoria salina* และ *Oscillatoria* sp. TISTR 8491 ตามลำดับ เมื่อศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดส พบว่า เพอร์ออกซิเดสจากไซยาโนแบคทีเรียทั้ง 6 ชนิดทำงานได้ในช่วงพีเอช 4.0 – 11.0 ซึ่งทำงานได้ดีในภาวะที่เป็นเบส โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 9.0 โดยพบว่า ใน *Oscillatoria* sp. และ *Oscillatoria salina* น่าสร้างเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมากกว่า 1 ชนิดที่เป็นกลุ่มของไอโซไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mujer et al. (1983) ที่พบไอโซไซม์ของเพอร์ออกซิเดสในมะพร้าว ภาวะพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิทีขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ ดังนั้นไซยาโนแบคทีเรียจึงเป็นแหล่งเพอร์ออกซิเดสที่น่าสนใจแหล่งหนึ่งซึ่งสามารถนำมาใช้แทนเพอร์ออกซิเดสนำเข้าจากต่างประเทศได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นิตยา จันชิว จตุรพร พรศิลปะทิพย์ และปรียานาถ วงศ์จันทร์. (2551, กันยายน). การผลิตโมโนโคนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อเฮพาแรนซัลเฟตโปรติโอกลัยแคนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ออร์สราดิชเปอร์ออกซิเดสสำหรับงานตรวจทางภูมิคุ้มกันวิทยา. **วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่** 41(3): 167-174.

บงกช บุญบูรพงษ์ อาภรณ์ บัวหลวง อรัญ อินเจริญศักดิ์ ยุวธิดา นิลผาย ปนัดดา พ่วงขวัญ อภิญญาณ บุญประกอบกุล และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2554). ผลของไกลซีน โพรลีน และกลูตาเมต ต่อการเจริญของไซยาโนแบคทีเรีย *Synechococcus* PCC 7942, *Synechocytis* PCC6803 และ *Aphanothece halophytica* ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ. **วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้** 2(1): 48-58.

โพธิชรณ์ ครรชิตานุรักษ์ อภิรดา สถาปัตยานนท์ กนกกานต์ นาคทอง ชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ และสุรศักดิ์ ละลอกน้ำ. (2555, มีนาคม). ผลของความเค็มต่อการเจริญและปริมาณโพรลีนของไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria* sp. *Nostoc* sp. และ *Ananaena* sp. ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเครียดจากเกลือ. **การประชุมวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 4**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก.

ยุวดี พีรพรพิศาล จีรพร เพกเกาะ ชยากร ภูษาด ชาติชาย โขนงนุช ปานมุก วัชระปิยะโสภณ พิมพร ลีลาพร-พิสิฐ วลัยลักษณ์ บุญชุม และสุดาพร ตงศิริ. (2551). **กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระทนร้อนของรงควัตถุกลุ่มไฟโคบิลิโปรตีนจากไซยาโนแบคทีเรียในน้ำพุร้อนเพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ทนร้อนด้านอื่น**. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ลือชัย อารยะรังสฤษฏ์ และสุภาพร จันทร์บัวทอง. (2553). **รายงานวิจัย เรื่อง กิจกรรมของเอ็นไซม์ peroxidase กับปฏิกิริยาต่อโรคไหม้ของข้าวบางพันธุ์**. ปทุมธานี: ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี.

สุวิตา เจริญศรี และวรางคณา จุ้งลก. (2551). การลดลงของระดับ glutathione peroxidase activites ในประชากรอำเภอร่อนพิบูลย์. **รายงานการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 33**. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช.

Becana, M., and Lotassa, C. (2007). Oxidative stress as a response to salinity and aluminum. **Lotus Newsl**. 37(3): 98.

Bradford, M. (1976). A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**. 72: 248-254.

Dunford, H. B. (1999). Heme peroxidase nomenclature. **Plant Peroxidase Newsl**. 13: 65 – 71.

Incharoensakdi, A. and Laloknam, S. (2005). Nitrate uptake in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* is energy-dependent driven by pH. **J. Biochem. Mol. Biol**. 38(4): 468–473.

Kavitha K., Venkateraman, G., and Parida A. (2008). An oxidative and salinity stress induced peroxisomal ascorbate peroxidase from Avicennia marine: Molecular and functional characterization. **Plant Physiol. Biochem**. 46: 794-804.

Kongwithtaya, S., Laloknam, S., and Chairote, G. (2010). Characterization of ammonium precipitant peroxidase from ivy gourd. **Proceedings of Pure and Applied chemistry international Conference 2010**. Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand.

Mujer, C. U., Mendoza, E. M., and Ramierez, D. A. (1983). Coconut peroxidase isoenzymes: isolation, partial purification and physicochemical properties. **Phytochem**. 22: 61-65.

Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Plasser, L., Schwaiger, H., Furtmuller, P. Peschek, G., Zamocky, M., and Obinger, C. (2002). Occurrence and biochemistry of hydoperoxidases in oxygenic photo-

trophic prokaryotes (Cyanobacteria). **Plant Physiol. Biochem.** 40: 479- 490.

Saha, S., Uma, L., and Subramanian, G. (2003). Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. **FEMS Microbiol. Ecol.** 45: 263-272.

Singh, J., Dubey, A., Diwakar, S., Rawat, S., Batra, N., and Joshi A. (2010). Biochemical Characterization of peroxidase from the fruits of *Mullus pumilus*. **Int. Res. J. Biotechnol.** 1(4): 50-58.

Vernwal, S., Yadav, R., and Yadav, K. (2006). Purification of a peroxidase from *Solanum melongena* fruit juice. **Indian J. Biochem. Biophys.** 43: 239-243.

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล นายชัยศาสตร์ คเชนทร์สุวรรณ

วัน เดือน ปีเกิด วันเสาร์ที่ 13 มิถุนายน พ.ศ. 2530

ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 19/126 ถนนริมคลองบางค้อ แขวงบางค้อ เขตจอมทอง จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน ครูผู้ช่วย

สถานที่ทำงานปัจจุบัน โรงเรียนมัธยมวัดหนองจอก เลขที่ 21 หมู่ 2 ถนนเลียบวารี แขวงกระทุ่มราย เขตหนองจอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2545 มัธยมศึกษาตอนต้นปีที่ 3 โรงเรียนธนบุรีวรเทพีพลารักษ์ แขวงตลาดพลู เขตธนบุรี จังหวัดกรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2548 มัธยมศึกษาตอนปลายปีที่ 6 โรงเรียนธนบุรีวรเทพีพลารักษ์ แขวงตลาดพลู เขตธนบุรี จังหวัดกรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2552 กศ.บ. (วิทยาศาสตร์ทั่วไป) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

พ.ศ. 2556 วท.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ