Thesis CM 4

Contact "Library Services" : info@dss.go.th

Thesis Title Development of an Enzymatic Method for the Determination of Phenolic Compounds Using Peroxidase from *Coccinia grandis* Voigt

Author Mr. Sombat Kongwithtaya

Degree Doctor of Philosophy (Chemistry)

Thesis Advisory Committee

Associate Professor Dr. Griangsak Chairote	Advisor
Assistant Dr. Rattikorn Yimnirun	Co-advisor
Urai Tengjaroenkul	Co-advisor

ABSTRACT

This study aimed to investigate the screening of peroxidase activity from 10 kinds of vegetables, Shallot (*Allium accalonicum* Linn.), Bitter gourd (*Momordica charantia* Linn.), Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Linn.), Lettuce (*Lactuca sativa* Linn.), Cabbage (*Brassica oleracea* Linn.), Mustard (*Brassica chinensis* Linn.), Chinese Kale (*Brassica alboglabra* Linn.), Coriander (*Foeniculum vulgare* Mill.) and Ivy gourd (*Coccinia grandis* Voigt) and to compare with Horseradish root (*Armoracia lapathifolia* Linn.). All samples were extracted by phosphate buffer, pH 7.0 and crude extracts were measured for peroxidase activity using a reaction mixture consisting of 4-aminoantipyrine (4 AA), phenol and hydrogen peroxide. The condition for reaction of phenol was at 30°C for 10 minutes. Ivy gourd showed the highest peroxidase activity,

349.95 μmol.min^{-1}.mg protein^{-1}. The Ivy gourd crude extract was fractionated by ammonium sulfate precipitation at percentage saturation range of 0 – 20, 20 – 40, 40 – 60, 60 – 80, and 80 – 100, respectively. Ammonium sulfate fractionation range of 60 – 80% saturation gave the highest peroxidase activity, of 1,522.25 μmol.min^{-1}.mg protein^{-1}. Percentage of ammonium sulfate fractionation at 20 – 80% saturation was selected to precipitate of peroxidase from Ivy gourd crude extract and gave 60% recovery with 4.08 fold purification. Partial purification of the Ivy gourd peroxidase has been obtained by passing the 20 – 80% ammonium sulphate fraction through a diethyl amino ethyl-cellulose (DEAE-Cellulose) column. The fractions with peroxidase activity were pooled separately and passed through a Sephadex G100 column for further purification. The purified enzyme preparation exhibited a specific activity of 6,106.63 μmol.min^{-1}.mg protein^{-1}, while purification fold and yield were 17.45 and 34.70 respectively. The purified peroxidase was homogenous as judged by native and sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight as determine by gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was 45 kD, which suggested that the purified peroxidase contained only one subunit. The apparent K_m and V_{max} values of the enzyme against phenol were 93 μM and 561 μmol.min^{-1}.mg protein^{-1}, respectively. The optimum temperature, pH for purified peroxidase were 45°C and pH 6.0, respectively. However, it was stable at 30-60°C and pH 4.0- 8.0. The presence of metal ions such as Cu^{2+} and Ca^{2+} enhanced peroxidase activity. On the other hand, Cr^{3+} and Hg^{2+} strongly inhibited the enzyme activity at 500 μM. Sodium dodecyl sulfate reduced a half of peroxidase activity at approximately 3 mM. Ivy gourd was stability in the presence of each urea concentration. The affinity of the enzyme with different substrates showed as the highest relative activities on gallic acid followed by catechin, ascorbic

acid and caffeic acid, respectively. The validation of an enzymatic method for determination of total phenolic compounds using gallic acid as standard was investgated. The method, which involves the use of Ivy gourd peroxidase, 4 AA, gallic acid and hydrogen peroxide.The method is applicable over the concentration range of 4 – 200 $mg.L^{-1}$ with correlation coefficient of 0.9998. The detection limit (LOD) of gallic acid was 1.42 $mg.L^{-1}$ while quantitation limit (LOQ) was 19.18 $mg.L^{-1}$ and % RSD 1.15. The proposed procedure was successfully applied for the determination of gallic acid in five tea samples with mean recoveries of 85.03 – 100.33 and % RSD was 0.2 – 1.9. the results obtained were in good agreement with those obtained using the official method.

Keywords: Peroxidase, Characterization, Ivy gourd, Purification, Phenolic compound

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาวิธีทางเอนไซม์สำหรับการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยการใช้เพอร์ออกซิเดสจากตำลึง

ผู้เขียน นายสมบัติ คงวิทยา

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. เกรียงศักดิ์ ชัยโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัตติกร ยิ้มนิรันดร์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

อาจารย์ ดร. อุไร เต็งเจริญกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้ได้ตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสเบื้องต้นจากผักในตลาดท้องถิ่น จำนวน 10 ชนิด ได้แก่ ต้นหอม (Shallot, *Allium accalonicum* Linn.) มะระ (Bitter gourd, *Momordica charantia* Linn.) ผักกาดขาว (Chinese cabbage, *Brassica pekinensis* Linn.) ผักกาดหอม (Lettuce, *Lactuca sativa* Linn.) คะน้า (Cabbage, *Brassica oleracea* Linn.) ผักกาดกวางตุ้ง (Mustard, *Brassica chinensis* Linn.) กะหล่ำปลี (Chinese Kale, *Brassica alboglabra* Linn.) ผักชี (Coriander, *Foeniculum vulgare* Mill.) ตำลึง (Ivy gourd, *Coccinia grandis* Voigt) และเปรียบเทียบกับต้นวาซาบิ (Horseradish root, *Armoracia lapathifolia* Linn.) โดยนำผักทุกชนิดมาสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 จากนั้นติดตามแอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสด้วยการทำปฏิกิริยาของ 4-อะมิโนแอนทิไพรีน ฟีนอล ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และสารสกัดทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 10 นาที พบว่าสารสกัดหยาบจากตำลึงให้ให้แอคทิวิทีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุด 349.95 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำสารสกัดจากตำลึงตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 และ 80-100 ตามลำดับ พบว่าที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 60-80 ให้แอคติวิตีของเพอร์ออกซิเดสสูงสุด 1,522.25 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ใช้การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มเข้มข้นอิ่มตัวตัวร้อยละ 20-80 พบว่าให้ผลผลิตร้อยละ 60 และ

ความบริสุทธิ์ 4.08 เท่า จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปผ่านคอลัมน์ DEAE-Cellulose และ Sephadex G100 พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 17.45 เท่า และ ได้ผลผลิตร้อยละ 34.50 ค่าจลนศาสตร์ของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส โดยใช้ phenol เป็นสับสเตรต พบว่า *Km* และ V*max* เป็น 93 ไมโครโมลาร์ และ 561 ไมโครโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้นี้มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 45 kDa มีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 7.0 และ 40°ซ ตามลำดับ แอคทิวิทีของเอนไซม์จะถูกกระตุ้นด้วยอิออน Cu^{2+} และ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้นของอิออน Cr^{+3} และ Hg^{2+} 500 ไมโครโมลาร์ยับยั้งแอคทิวิทีอย่างชัดเจน แอคทิวิทีของเอนไซม์จะเสถียรเมื่ออยู่ในสารละลายยูเรีย และที่ความเข้มข้นของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 3 มิลลิโมลาร์ยับยั้งแอคทิวิทีเป็นครึ่งหนึ่งของภาวะปกติ เพอร์ออกซิเดสจากตำลึงมีความจำเพาะต่อสารประกอบฟีนอลิกเรียงตามลำดับ ดังนี้ gallic acid, cathechin, ascorbic acid และ caffeic acid ตามลำดับ จากนั้นนำเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์จากตำลึงไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณสารประกอบฟีนอล โดยใช้gallic acid เป็นสารมาตรฐาน โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย4-อะมิโนแอนทิไพรีน ฟีนอล ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และ เพอร์ออกซิเดสบริสุทธิ์ ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ใช้ให้ความเป็นเส้นตรงที่ช่วง 4 – 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าสหสัมพรรท (R^2) เท่ากับ 0.9998 ให้ค่า LOD 1.24 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมถึงค่า LOQ และ %RSD เท่ากับ 19.18 และ 1.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ค่า %Recovery จากตัวอย่างชา 5 ชนิดที่วางขายในตลาดที่ช่วงร้อยละ 85.03 – 100.33 และ %RSD เท่ากับ 0.2 -1.9

Keywords: เพอร์ออกซิเดส การศึกษาสมบัติ ตำลึง การทำให้บริสุทธิ์ สารประกอบฟีนอลิก