

# 台灣沿海海藻中偏釩溴過氧化酵素活性調查 與純化

## The Screening and Purification of Vanadium Bromoperoxidase from Taiwanese Marine Macroalga

林錫斌<sup>1\*</sup>Hsi-Pin Lin

元培科技大學 食品科學系(所)

常竣揮<sup>1</sup>Chun-Hui Chang

元培科技大學 食品科學系(所)

<sup>1</sup>Department of Food Science, Yuanpei University

**摘要：**很多種類的海藻皆含有多種鹵化次級代謝產物，其中的鹵化過氧化酵素(haloperoxidase)，被認為在鹵化物以及過氧化氫的鹵化合成上扮演關鍵性的角色，這些酵素在海洋中具有排放揮發性溴甲烷，例如三溴甲烷(bromoform)和二溴甲烷(dibromomethane)的能力，並具有重要的生物活性。偏釩溴過氧化酵素(Vanadium bromoperoxidase)也具有上述特性，其主要來源為海藻。本研究中篩選台灣東北角、墾丁以及澎湖沿海的十五種海藻，以等量的 0.1 M 磷酸緩衝液(pH 8.0)粗萃取其酵素，再以改良式百里酚藍(Thymol blue)色度分析法測定偏釩溴過氧化酵素(V-BrPO)活性，發現以布氏藻(*Boodlea composita*) 的酵素活性最高。進一步以硫酸銨劃分、DEAE -sepharose 離子交換層析、Q-sepharose 離子交換層析以及 Superdex 200 凝膠層析等方法，將偏釩溴過氧化酵素從布氏藻中分離出來並加以純化，可有效的將酵素純度提高 300 倍，經由 Superdex 200 凝膠層析以及 SDS-PAGE 沖提後計算相對分子量約 22 kDa。本研究證明台灣沿海海藻中偏釩溴過氧化酵素因種類而有不同活性，且本文所採用的方法可以有效分離純化酵素。

**關鍵詞：**鹵化過氧化酵素，偏釩溴過氧化酵素，布氏藻，鹵化次級代謝產物

**Abstract:** Many species of marine macroalgae contain a variety of halogenated secondary metabolites. Haloperoxidase, a halogenating enzyme, is considered to play a key role in their syntheses in the presence of halides and hydrogen peroxide. These enzymes are responsible for the emission of volatile bromomethanes such as bromoform and dibromomethane in the marine environment. Haloperoxidase produce small amounts of bromophenol, halogenated terpene, bromo-topsentins, diazonamides and

---

\* Corresponding author



jasplakinolides, which often have important biological activity. In this study, we collected 15 species of marine algae from Taiwan's northeast, Kenting and Penghu sea area for screening the vanadium-haloperoxidase enzyme (V-BrPO) activities with modified thymol blue colorimetric assay method. It was showed that *Boodlea composita* possessed the vanadium- haloperoxidase enzyme activity. We also purified this enzyme from *B. composita* with ammonium sulfate precipitation, DEAE-cellulose ion-exchange chromatography, Q- sepharose FF chromatography and Superdex 200 10/300 gel chromatography. The relative molecular masses of V-BrPO was 22 kDa separated from gel filtration and SDS-PAGE.

**Keywords:** haloperoxidase, Vanadium Bromoperoxidase , *Boodlea composita* ,halogenated secondary metabolites

## 1. 前言

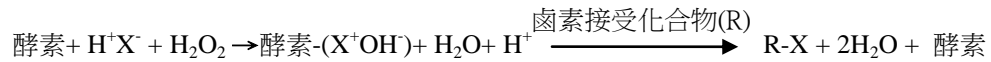
生物界中，特別是海洋生物環境中多種鹵化化合物多與鹵素過氧化酵素(haloperoxidase ; HPO)有關。HPO依酵素化學來區分其可分為三類型，第一類型為不需輔基鹵素過氧化酵素(perhydrolase ; metal-free haloperoxidases)，其主要存在於細菌中，如*Pseudomonas pyrocinia* (Wiesner, et al., 1988)、*Streptomyces lividans* (Bantleon et al., 1994)和*Pseudomonas putida* (Itoh, et al., 2001; Kawanami et al., 2002)。從金黴素鏈黴菌(*S. aureofaciens*)中所分離之不需輔基鹵素過氧化酵素(Hecht ,et al., 1994)、酯酶(esterase)以及脂解酶(lipases)有相似的結構，如 $\alpha/\beta$ 水解酵素摺疊( $\alpha/\beta$  hydrolase fold)以及serine - histidine - aspartic acid的催化三元體(catalytic triad)結構(Ollis, et al., 1992)，同時也具有與脂解酶相同的能力，如形成過氧酸 (peroxoacids)( Björkling, et al., 1992)。此酵素也具有催化有機化合物鹵化以及氧化的能力(Itoh ,et al., 2001)。

第二類型為血紅素型鹵素過氧化酵素(haem-containing haloperoxidases)，最早被測定出酵素結構的血紅素型鹵素過氧化酵素來自於海洋真菌(*C. fumago*)(Sundaramoorthy, et al., 1995)和脊椎過氧化酵素(canine myeloperoxidase)(Zeng & Fenna, 1992; Fenna, et al., 1995)。血紅素型鹵素過氧化酵素與血紅素酵素(heme enzymes)的結構相似，同樣具有由8個螺旋片段所摺疊構成的三級結構(Sundaramoorthy, et al., 1995)。

第三種類型為偏釩鹵素過氧化酵素(vanadium-haloperoxidase ; V-HPO)。Vilter於1984年首次從褐藻*Ascophyllum nodosum*分離出此酵素(Hans Vilter, 1984)，但是最早被測定出結構的偏釩鹵素過氧化酵素卻是分離自真菌*Curvularia inaequalis* (Messerschmidt & Wever, 1996)。偏釩鹵素過氧化酵素其主要存在於海藻中(Butler & Carter-Franklin, 2004)，但近年研究在真菌也被發現，如*Curvularia inaequalis* (van Schijndel, et al., 1993a & 1993b)以及地衣*Xanthoria parietina* (Plat ,et al., 1987)亦含有此類型酵素。

V-HPO 之反應為一種利用過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)使鹵素(X : Br, I 與 Cl)產生氧化活性化的酵素，會使一些有機化合物產生鹵化現象或是使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 產生氧氣。其反應式如下(Butler, 1998a):





鹵素過氧化酵素相關研究最多的海藻為褐藻，其中在褐藻中之Fucaceae 科富含V-BrPO，目前有A. nodosum、Fucus serratus、F. spiralis、F. vesiculosus、Pelvetia canaliculata以及F. distichus等相關報告(Vilter, 1995)。其中以A. nodosum之V-BrPO為相關研究最多，其含有二種之V-BrPO酵素(Krenn, et al., 1989)。研究中發現溝鹿角菜(P. canaliculata)的粗萃取液中除含V-BrPO酵素活性外亦含有V-IPO酵素活性(de Boer, et al., 1986a; Wever, et al., 1991; Vilter, et al., 1995)。此外紅藻之C. pilulifera (Itoh, et al., 1985 & 1986)、Kappaphycus alvarezii (Kamenarska, et al., 2007)以及綠藻之Penicillus capitatus (Manthey & Hager, 1981)、P. lamourouxii (Baden & Corbett, 1980)、Rhizocephalus phoenix (Baden & Corbett, 1980)亦有許多相關之研究。有文獻指出V-BrPO存在於褐藻，如A. nodosum (Vilter & Glombitza, 1983a & 1983b)、Macrocystis pyrifera (Butler, et al., 1990)、Laminaria saccharina 和 L. digitata (Jordan & Vilter, 1991)葉狀體的細胞壁內，皮質層(cortex)與髓質層(medulla)之間的過渡區(transitional region)或是葉狀體表面的細胞壁中(Vilter & Glombitza, 1983b; Almeida, et al., 2001)。

海洋中有含有少量之鹵化(halogenated)之萜烯(terpene)、acetogenins、indoles、phenol等具有特殊之生理活性，如生產阻嚇侵食者之物質(Sakata, et al., 1991a & 1991b; Denboh, et al., 1997; Ohsawa, et al., 2001)、抗癌、抗細菌(Neumann, et al., 2008)、抗真菌、抗病毒以及抗發炎等藥理活性(Cowan, et al., 1999)。近年的研究發現海綿與海鞘Diazona chinensis中之halogenated indoles化合物(如bromo-topsentins、diazonamides、jasplakinolides)被認為具有抗癌以及抗發炎等活性(Butler, 1998a)，海洋真菌C. fumago中的V-CIPO酵素以及紅藻C. pilulifera中的V-BrPO酵素具有催化含氮芳香雜環核酸鹵化的能力，其產生的鹵化核酸可以用來抑制DNA代謝，可被當作抗癌以及抗病毒試劑(Littlechild, 1999)。鹵化過氧化酵素(haloperoxidase)具有多種生理活性功能，因此受到極大的重視。

國外對於海藻中之偏鈳溴過氧化酵素有許多報告，但並無台灣海域中此類酵素的相關報告。本研究採集分析台灣東北角海岸、墾丁海岸以及澎湖海岸之各種海藻，包含綠藻植物門、褐藻植物門以及紅藻植物門共 15 種，以瞭解偏鈳溴過氧化酵素之分布情形，並進行高鹵素過氧化酵素活性之藻類篩選以及其酵素分離純化。

## 2. 材料與方法

### 2.1 材料

於 2010 年自台灣東北角、墾丁以及澎湖沿海海域採集共 15 種海藻。其中綠藻植物門之布氏藻(Boolea composita)、腸石髮(Enteromorpha intestinalis)、牡丹菜(Ulva conglobata)、裂片石蓴(Ulva fasciata)、石蓴(Ulva lactuca)；褐藻植物門之南方團扇藻(Padina australi)、馬尾藻(Sargassum polycystum)。紅藻植物門之小珊瑚藻(Corallina pilulifera)、鋸齒麒麟菜(Eucheuma serra)、鹿角菜(Gloiopeltis tenax)、蜈蚣藻(Grateloupia filicina)、叉枝蜈蚣藻(Grateloupia divaricata)、鹿角沙菜(Hypnea cervicornis)、長枝沙菜(Hypnea charoides)、翼枝藻(Pterocladia capillacea)共 15 種。藻類的採集地點如下：腸石髮、小珊瑚藻、鹿角菜、蜈蚣藻、鹿角沙菜以及翼枝藻採自台灣東北角，腸石髮、裂片石蓴、石蓴、鋸齒麒麟菜以及長枝沙菜採自墾丁，布氏藻、腸石髮、牡丹菜、南方團扇藻、馬尾藻



以及叉枝蜈蚣藻採自澎湖。海藻採集後，剔除附著在海藻上的附生植物以及雜藻，保存於-80℃備用。並由國立海洋大學陳衍昌教授協助藻種的鑑定。

## 2.2 實驗方法

### 2.2.1 海藻中偏鈎溴過氧化酵素(V-BrPO)的粗萃取

取 5 g 之海藻以剪刀剪碎，用等量的磷酸緩衝溶液(0.1 M, pH 8.0)與 1 g 海沙於研鉢中，在冰水浴中研磨萃取。萃取液在 4℃，10,000 rpm 離心 30 分鐘(KUBOTA 3700；KUBOTA, Japan)，取上清液即為粗萃液。粗萃液保存於 4℃備用。

### 2.2.2 偏鈎溴過氧化酵素(V-BrPO)活性的測定

酵素活性測定採用 Verhaeghe (2008)之百里酚藍比色法 (thymol blue colorimetry)。取磷酸緩衝溶液(0.1 M, pH 8.0) 0.7 ml、1 mM 之 TB 試劑 (thymol blue in H<sub>2</sub>O/dimethyl sulfoxide 4:1) 0.1 ml 和 1.0 M 之 NaBr 0.1 ml 於微量離心管中，再加入 20 mM 之 NaVO<sub>3</sub> 0.01 ml 和海藻萃取液 0.09 ml，混合均勻；反應液的最終濃度為 100 mM PBS、0.1 mM TB、100 mM NaBr 和 0.2 mM NaVO<sub>3</sub>。自微量離心管中取上述混合溶液 180 μl 於 96 孔盤(96-well tissue culture plate；BD Falcon™, U.S.A.)中，加入 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 μl 後立即於 45℃以 ELISA Reader (EL800；Bio-Tek, U.S.A.)於波長 630nm 測定其吸光值 A1。空白試驗則以 20 μl 磷酸緩衝溶液取代 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，測定其吸光值 A0。空白及樣品皆進行三重複試驗。

### 2.2.3 蛋白質含量的測定

蛋白質含量的測定使用 Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit (PIERCE, U.S.A.)。呈色劑之 A 液(sodium carbonate, sodium bicarbonate and sodium tartrate in 0.2 N NaOH)：B 液(4.0% bicinchoninic acid in water)：C 液(4.0% cupric sulfate, pentahydrate in water)以 6.25：6.00：0.25 之比率混合後，取 150 μl 呈色劑加入含有 150 μl 樣品之 ELISA 用 96 孔盤內，於 39℃放置 2 小時。吸光度的測定使用 ELISA Reader (EL800；Bio-Tek, U.S.A.)，波長設定 540 nm。以 bovine serum albumin (BSA)作為標準品，階段稀釋濃度成 1.25 ~20 μg/ml，以上述方法測定吸光度並製成檢量線。另外，以二次去離子水代替樣品，以上述方法進行吸光度測定，做為空白試驗。樣品、標準品及空白試驗皆做三重複測定。

### 2.2.4 電泳

製作 SDS-PAGE 膠體後，拔除膠體上之 comb，將凝固之膠體裝置充滿電泳緩衝液(25 mM Tris base、200 mM glycine、0.1% SDS)之電泳槽內，以電泳緩衝液洗滌樣品槽(well)後，填充入樣品及標準品。Marker 使用 5 μl 之 Prestained SDS-PAGE standards, Low Range(BIO-RAD) (構成蛋白質及分子量分別為 phosphorylase B；106,904、bovine serum albumin；93,636、ovalbumin；52,264、carbonic anhydrase；37,226、soybean trypsin inhibitor；28,244、lysozyme；18,833)。樣品及標準品填充入焦集膠體後，電壓設定 100 V 進行電泳至 bromophenol blue 到達分離膠體之底部為止。電泳後拔除玻璃板，小心取下膠體以純水洗滌，去除焦集膠體以染色液 (0.2% coomassie brilliant blue R-250、50% methanol、10% acetic acid)中進行 30-120 分鐘染色。之後以脫色液(20% methanol、10% acetic acid)進行脫色至膠體上藍色消失為止。



## 2.2.5 酵素的純化

### 2.2.5.1 純化樣品製備

酵素純化自 2010 年 1 月在澎湖海岸採集的布氏藻 (*Boodlea composita*)。經 -80 °C 冷凍的布氏藻取約 1 kg，加入等量 0.1 M PBS (pH 8.0) 在冰水浴中均質(cycle blend；Osterizer, U.S.A.)，均質液在 4 °C，10,000 rpm 離心 30 分鐘 (KUBOTA 3700；KUBOTA, Japan)，取上清液即為粗萃液。

### 2.2.5.2 硫酸銨劃分

粗萃液置於冰浴中投入磁石至於電磁攪拌器上攪拌(CIMAREC Digital Series；Barnstead/Thermolyne, U.S.A.)，小量分多次並緩慢加入硫酸銨，硫酸銨全加完後，再攪拌 30 分鐘，使溶解完全平衡，然後以 0 °C，10,000 rpm 離心 15 分鐘後收集沉澱；量取上清液體積，重複上述步驟加入硫酸銨，使得硫酸銨重量百分率濃度分別為 25%，50%，75% 以及 100%。所得之沉澱保存於 -20 °C 備用。四種硫酸銨濃度所得之沉澱以少量磷酸緩衝溶液(0.1 M, pH 8.0)溶解後進行透析。

### 2.2.5.3 DEAE-Sepharose 離子交換層析

Macro-Prep® DEAE-Support 充填管柱 ( $\varphi$  2.5×6.5 cm；BIO-RAD) 先以 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH 8.0) 平衡後，將透析後的樣品液以針筒(TERUMO® SYRINGE；5 ml) 吸取後注入 DEAE-Support 離子交換層析管柱內並收集流出液，用含有 NaCl 濃度 0.0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.3、0.4、0.5 以及 1.0 M 的磷酸緩衝溶液(0.1 M, pH 8.0) 各 100 ml 依序沖洗，流速約 1 ml/min，每 20 ml 收集於一 50 ml 離心管中，並進行活性測定以及蛋白質含量測定。

### 2.2.5.4 Q-Sepharose 離子交換層析

HiTrap™ Q-Sepharos Fast Flow 管柱( $\varphi$  0.7×2.5 cm；GE Healthcare) 先以 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH 8.0) 平衡後，將經方法 2.2.5.3 所述步驟純化、透析後的酵素活性樣品液以針筒(TERUMO® SYRINGE；5 ml) 吸取後注入 Q-Sepharose 離子交換層析管柱內，將管柱裝至快速蛋白質液相層析儀 FPLC (AKTA prime plus；GE Healthcare, U.S.A.)，用含有 1.0 M NaCl 的 0.1 M 磷酸緩衝溶液以連續梯度沖提 120 分鐘，流速為 0.5 ml/min，每試管收集 1 ml，並以 UV280 nm 測定吸光值。在吸收波峰處所得的沖提液進行活性與蛋白質含量測定。

### 2.2.5.5 Superdex 200 10/30 GL 凝膠層析

Tricorn™ Superdex 200 ( $\varphi$  10×300 mm GL；Amersham biosciences) 先以 0.1 M 磷酸緩衝溶液 (pH 8.0) 平衡後，將 Q-Sepharose 離子交換層析所得之酵素液樣品經脫鹽濃縮後以針筒吸取 1 ml 並注入 Superdex 200 分子篩層析管柱內，將管柱裝至快速蛋白質液相層析儀；FPLC (AKTA prime plus；GE Healthcare, U.S.A.)，用含 0.15 M NaCl 的磷酸緩衝溶液(0.05 M, pH 7.2) 沖洗，流速為 0.5 ml/min，每 1 ml 收集收集於玻璃試管中。以 UV280 nm 測定收集液的吸光值並測定其活性與蛋白質含量。



### 3. 結果

#### 3.1 活性測定單位(Unit)的定義

由圖 1 可知 V-BrPO 與 TB 的鹵化作用所產生的吸光值變化，在反應時間 60 分鐘以前呈直線上升，但在 60 分鐘以後吸光值的變化趨緩，因此我們以反應時間 60 分鐘做為測定 V-BrPO 活性的測量時間點。酵素活性定義如下：

$$\text{活性單位 (Units)} = \frac{\text{吸光值變化量}}{\text{反應時間(60 分鐘)}}$$

#### 3.2 台灣沿海各種藻類酵的酵素活性

本實驗在台灣沿海所採集的 15 種海藻中，以布氏藻(*B. composita*)所萃取的偏釩溴過氧化酵素(V-BrPO)比活性 7.98 mU/g 最高(表 1)。與前人的研究比較之下，布氏藻中的 V-BrPO 比活性很高，僅次於 *P. canaliculata* (32 mU/g)，因此我們決定以布氏藻做為實驗主題進行大量純化。

#### 3.3 布氏藻(*B. composita*)酵素純化結果

約 1 kg 的布氏藻打碎均質和離心後，可得到約 1.3 L 淡黃色的粗萃取液，酵素活性約 401 U，蛋白質約 2.9 g，比活性為 0.1 U/mg。

在四種硫酸銨百分飽和濃度劃分下(見圖 2)，V-BrPO 活性大部分集中在 75%飽和濃度，25%、50%和 100%飽和濃度也有檢測出少量的 V-BrPO 活性，尤其是 25%飽和濃度幾乎沒有 V-BrPO 活性。75%飽和濃度含有約 326 U 的酵素活性和約 294 mg 的蛋白質。此階段的酵素液為淡褐色。硫酸銨劃分的活性回收率約 99%。比較比活性方面，酵素粗萃取液由 0.1 U/mg 提高至硫酸銨 75%飽和濃度的 1.1 U/mg，濃縮 11 倍。其中 75%飽和濃度劃分所得的比活性是其他硫酸銨飽和濃度的 3.6 倍以上，所以我們決定以硫酸銨 75%飽和濃度所劃分之樣品進行爾後的純化步驟。

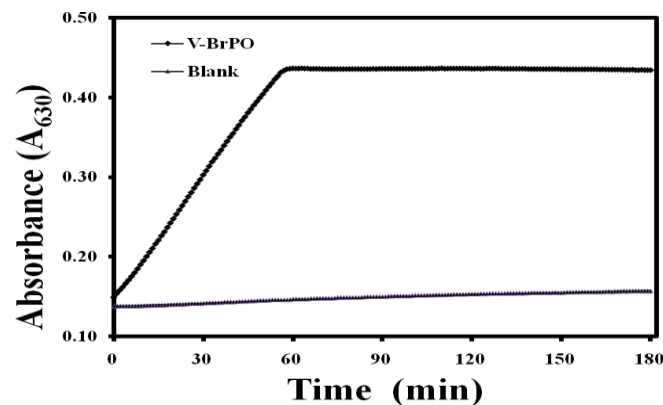


圖 1. V-BrPO 活性反應時間



表 1. 台灣沿海 15 種海藻中偏釩溴過氧化酵素比活性之比較

Scientific classification	Scientific name	V-BrPO spec.act. (mU/g)
Chlorophyta	<i>Boolea composita</i>	7.98
	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	N.D.*
	<i>Ulva lactuca</i>	2.59
	<i>Ulva fasciata</i>	0.67
	<i>Ulva conglobata</i>	N.D.*
Phaeophyceae	<i>Padina australis</i>	0.10
	<i>Sargassum polycystum</i>	0.44
Rhodophyta	<i>Corallina pilulifera</i>	N.D.*
	<i>Eucheuma serra</i>	N.D.*
	<i>Gloiopeltis tenax</i>	0.07
	<i>Grateloupia filicina</i>	N.D.*
	<i>Grateloupia divaricata</i>	N.D.*
	<i>Hypnea cervicornis</i>	0.28
	<i>Hypnea charoides</i>	1.25
	<i>Pterocladia capillacea</i>	0.01

\* N.D.: not detected

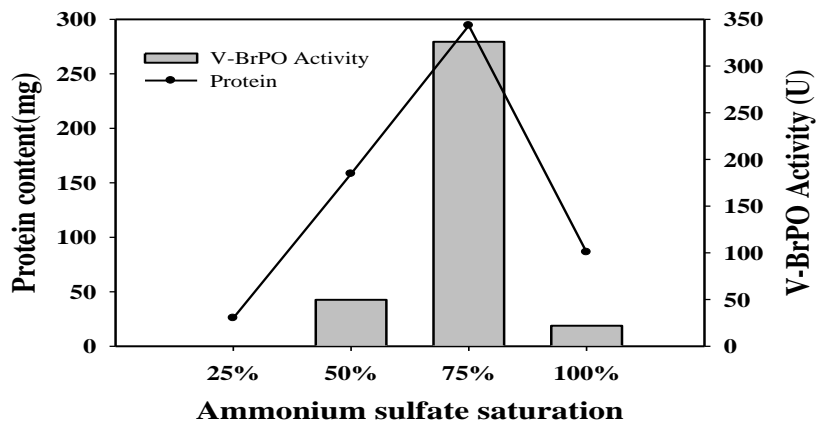


圖 2. 四種硫酸銨百分比濃度劃分中偏釩溴過氧化酵素活性之比較

在觀察 DEAE-Support 離子交換層析的結果(文中未呈現)可以發現在 NaCl 濃度 0.1、0.15、0.3 和 0.4 M 時皆有檢測出較高的 V-BrPO 活性。在 0.3 M NaCl 濃度的第 2 支收集管的 V-BrPO 活性 24.8 U 為最高，蛋白質含量約 1.6 mg。比活性由 1.1 U/mg 上升至 15.5 U/mg。在 NaCl 濃度 0、0.05 M 劃分中測出大量的蛋白質，但此劃分中所含的 V-BrPO 酵素活性很低，蛋白質回收率約 50%。顯示



可以去除四成以上的雜蛋白，但活性回收率略高於 100%，代表此純化方法是非常有效的。我們沒有將全部有 V-BrPO 活性的收集管合併，只取 V-BrPO 活性最高的收集管進行下階段的純化步驟。經過 DEAE-Suppot 管柱純化後，酵素液的顏色會由淡褐色轉為透明無色。

Q-Sepharose 離子交換層析的結果如圖 3 所示。所有蛋白質集中在 0.2-0.4 M NaCl 濃度流出(收集管 No.9-25)，在約 0.37 M NaCl 濃度的收集管(No. 21-24)出現最高的 V-BrPO 活性(1.6 U)，蛋白質含量約 0.22 mg。比活性由 15.5 U/mg 略為下降至 8 U/mg，活性回收率約 22%。我們將 V-BrPO 活性最高的前四管收集管 Fr.21-24 合併，再進行下一階段的純化步驟。

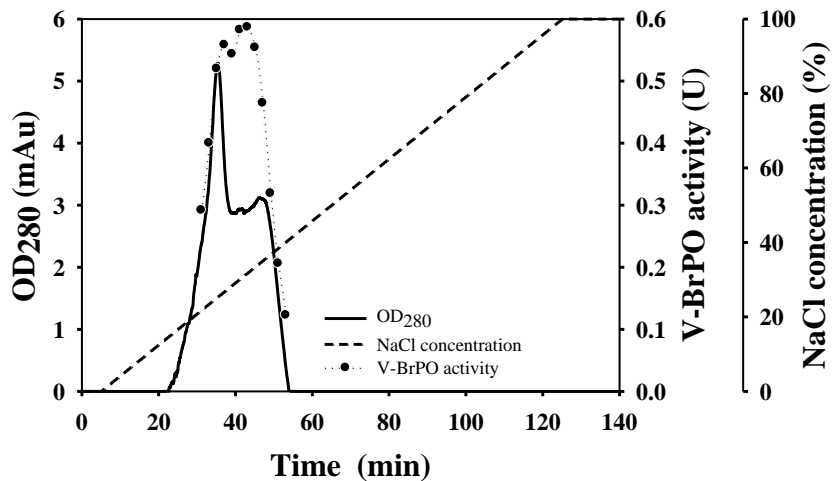


圖 3. Q-Sepharose 強陰離子交換瓊脂糖凝膠管柱層析

符號：——, UV. 280 nm 蛋白質吸光值; ...●..., V-BrPO 活性; -----, NaCl 濃度

圖 4 為 Superdex 200 10/30 GL 凝膠層析結果，以 UV280 nm 偵測發現有兩個明顯的波峰，前者在約 21 分鐘流出，後者在約 32 分鐘流出，而在測定酵素活性後，發現後面的收集管(No.20)含有最高的 V-BrPO 活性(0.3 U)，蛋白質含量約 10  $\mu$ g。活性回收率約 30%，比活性由 8 U/mg 上升至 30 U/mg。最後取得之酵素經 12% SDS-PAGE 電泳後，膠片以 CBB (Coomassie brilliant blue) 染色，可得到明顯的單一色帶(圖 5)。

上述純化步驟的結果，包括酵素活性、純化倍數以及回收率等如表 2 所示。經過本研究的純化步驟後，與粗萃取液比較，可有效的將 V-BrPO 純化約 300 倍，活性回收率約 0.07%。





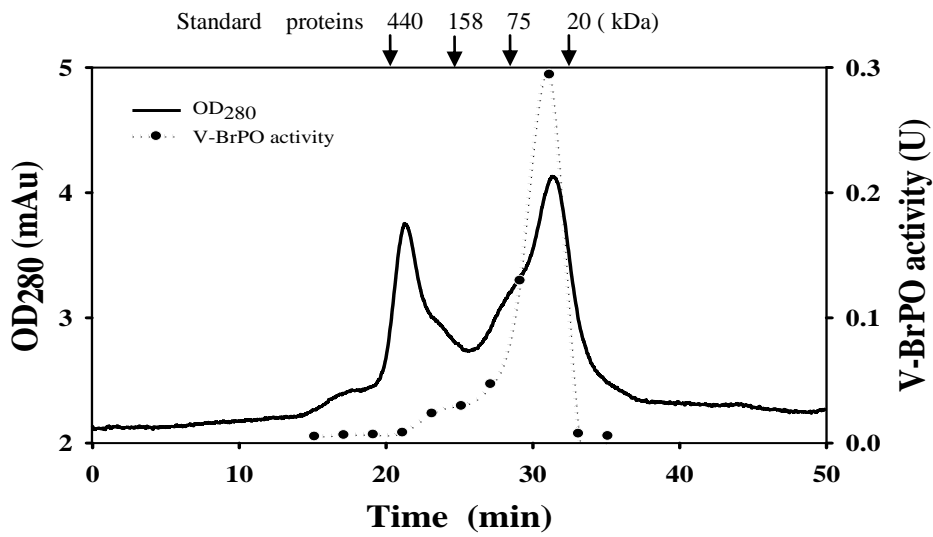


圖 4. Superdex 200 10/30 GL 凝膠分子篩管柱層析及 V-BrPO 分子量推估

符號：——, UV. 280 nm 蛋白質吸光值; ...●..., V-BrPO 活性

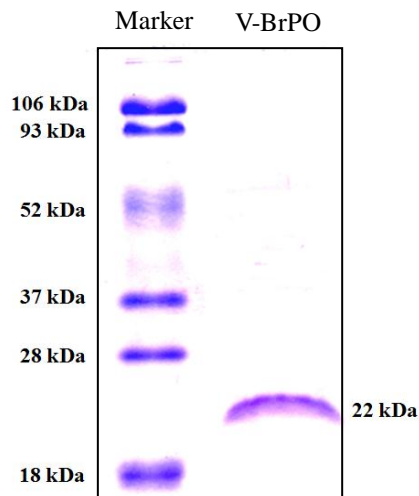


圖 5. V-BrPO 的 SDS-膠體電泳圖

表 2. V-BrPO 純化的活性回收表

Fraction	volume (ml)	activity (U)	protein (mg)	spec.act. (U/mg)	recovery (%)	purification (fold)
crude	1300	401.2	2877.3	0.1	100	1
ammonium sulfate fractionation	47	325.9	294.4	1.1	81.2	11
DEAE-sepharose	20	24.8	1.6	15.5	6.2	155
Q-sepharose	8	1.6	0.2	8	0.4	80
Superdex-200	1	0.3	0.01	30	0.07	300



## 4. 討論

單氯雙甲酮(monochlorodimedone : MCD) 檢測法是過去大部分文獻中用來測定偏鈎鹵素過氧化酵素活性的標準檢測方法，可以測定 V-BrPO 的活性，但是 MCD 檢測法的靈敏度非常容易被 pH 值所影響，所以在檢測不同來源的 V-BrPO 上顯得相當困難(Hager et al., 1966)。在過去的報告中，使用相同的方法檢測泡葉藻中的 V-BrPO，即使在很高濃度氯離子的環境中，也有很弱的 V-CIPO 活性(Soedjak & Butler, 1990)。MCD 檢測法也不會對 V-IPO 以及三碘化合物產生反應(Huwiler & Kohler, 1984)。

而 V-IPO 的活性檢測方法一般是利用光度法測定三碘化合物 (triiodide ; I<sub>3</sub><sup>-</sup>) 在波長 350 nm 的吸光值。但是此方法的實驗條件相當嚴苛，必須在酸性 pH 值以及高碘化物濃度的條件下，才能確保 I<sub>3</sub><sup>-</sup> 的形成和穩定。

酵素的活性測定主要是觀察酵素作用的結構、機制以及反應。大部分的檢測方法為使用分光光度法測量基質的消耗率及／或反應產物的形成率。V-HPO 與其他酵素的相同在於使用標準方法難以檢測到反應中間產物的產生。這個反應中間產物會自發性的產生不同的鹵素混合物，而 V-HPO 的標準檢測方法(MCD 檢測法)便是在測量此一混合物。而此一混合物很容易受到 pH 值以及鹵素的種類和濃度的影響，檢測條件的輕微變化將會導致混合物性質明顯的改變，進而使結果產生極大的誤差(Leblanc, 2006)。

在 2008 年 Verhaeghe (2008) 等人開發一種比前述方法更為靈敏和準確的比色法，用以檢測偏鈎鹵素過氧化酵素活性。此方法使用百里酚藍(thymol blue : TB) 當作基質，經偏鈎鹵素過氧化酵素反應後，其鹵化物在波長 620nm 有一明顯增加的吸收值。此法可檢測所有類型的偏鈎鹵素過氧化酵素，其對於干擾物的敏感性遠低於三碘化合物分析法。這也是本研究使用百里酚藍比色法(thymol blue colorimetric assay)，來確立酵素純化時新的活性指標之原因。

鹵化過氧化酵素(haloperoxidase) 可分為催化氯、溴以及碘等鹵化物的酵素，在催化過程中皆需要鈎(vanadium) 作為輔因子。偏鈎氯過氧化酵素(vanadium-chloroperoxidase : V-CIPO) 可催化氯、溴以及碘氧化，而偏鈎溴過氧化酵素(vanadium-bromoperoxidases : V-BrPO) 則會與溴以及碘反應(Butler et al., 2004)，但偏鈎碘過氧化酵素(vanadium-iodoperoxidase : V-IPO) 則只對碘產生反應(Verhaeghe, et al., 2008)。V-BrPO 酵素與 V-IPO 酵素主要是從許多海洋藻類中分離出來的，如 *Corallina pilulifera* (Itoh, et al., 1987&1988; Sheffield, et al., 1993&1995) 與 *Ascophyllum nodosum* (Vilter, et al., 1984; Krenn, et al., 1989; Bulter, 1998a)。而 V-CIPO 較少有在海洋生物發現之報告(Soedjak & Bulter, 1990; Butler & Carter-Franklin, 2004; Moore, 2006)，其相關文獻較多來自於陸上的真菌或細菌，如 *Serratia marcescens* (Burd, et al., 1995)、*S. aculeolatus*、*S. albus* (Winter, et al., 2007) 以及 *C. inaequalis* (van Schijndel, et al., 1993a&1993b; Messerschmidt, et al., 1996)。

至目前尚無台灣沿海海藻中偏鈎鹵素過氧化酵素的相關研究，此研究為台灣沿海藻種之初次相關活性調查。此研究顯示 V-BrPO 活性因藻種而有不同，但此次調查結果以綠藻植物門中的布氏藻(*Booledea composita*)、石蓴(*Ulva lactuca*) 活性遠高於其他藻種。鹵素過氧化酵素相關研究最多的海藻為褐藻，其中在褐藻中之 *Fucaceae* 科富含 V-BrPO (Vilter, 1995)，但本次調查中所使用的褐藻南方團扇藻(*Padina australi*)、馬尾藻(*Sargassum polycystum*) 的酵素活性偏低。在紅藻植物門中以長枝沙菜(*Hypnea charoides*) 的 V-BrPO 活性最高。V-BrPO 活性會因藻種而異外，V-BrPO 活性會隨著



生長環境和季節而有所增減(Hartung, et al., 2008; Flodin, et al., 1999; Almeid, et al., 1998; Itoh, et al., 1996)。Hartung 等人在 2008 年的文獻指出 2005 年 5 月在法國(Roscoff)所採集的 *A. nodosum* 其 V-BrPO 比活性約是同年 6 月的在相同地點採集的 4 倍，而是 2004 年 5 月的在蘇格蘭(Oban)採集的 1.6 倍。Flodin 等人在 1999 年的文獻指出在 1998 年 1 月所採集的 *Ulva lactuca* 其 V-BrPO 比活性約是在 1997 年 6 月採集的 3 倍。Almeid 等人在 1998 年的文獻指出在葡萄牙西海岸(Viana do Castelo)所採集的 *C. pilulifera* 其 V-IPO 比活性約是在葡萄牙(Arrábida)採集的 1.7 倍，在葡萄牙(Porto Côvo)採集的 2.5 倍。Itoh 等人在 1996 年的文獻指出在 1993 年 4 月所採集的 *C. pilulifera* 其 V-BrPO 比活性約是在 1992 年 10 月採集的 18 倍。在雖然有許多文獻以小珊瑚藻(*C. pilulifera*) 作為偏鈎鹵素過氧化酵素的實驗材料(Itoh, et al., 1985 & 1986)，但在台灣東北角所採集之小珊瑚藻並沒有檢驗出 V-BrPO 活性，因此推論其可能受到生長環境及季節影響。

在酵素純化方面，前人研究將硫酸銨劃分法分為 30%與 60%二種濃度(Ohshiro, et al., 2002)或僅 0-40%一種濃度(Wagner, et al., 2008)，本研究則將硫酸銨劃分法分為四種濃度，相較於前人之研究，此純化步驟將酵素純化約 11 倍，可去除較多的雜蛋白質，以得到比活性更高的酵素。本實驗僅五個純化步驟，便可使酵素純化至 300 倍，比起前人的純化法如 Shimonishi 等人將紅藻 *C. pilulifera* 經五個實驗步驟使酵素純化至 286 倍(Shimonishi, et al., 1998)，Ohshiro 等人將綠藻 *U. lens* 經五個實驗步驟使酵素純化至 6.18 倍(Ohshiro, et al., 1999)，Ohshiro 等人將表現出紅藻 *C. pilulifera* 基因之酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 經七個實驗步驟使酵素純化至 122 倍(Ohshiro, et al., 2002)和 Kamenarska 等人將紅藻 *K. alvarezii* 經四個實驗步驟使酵素純化至 21.8 倍(Kamenarska, et al., 2007)，本文所採用實驗純化方法步驟較少且有效。

此外，V-BrPO 分子量方面，Itoh 等人將紅藻 *C. Pilulifera* 純化所得之 V-BrPO 的分子量約為 64 kDa (Itoh, et al., 1996)。Hara 等人將褐藻 *E. stolonifera* 純化所得之 V-BrPO 的分子量約為 83 kDa (Hara, et al., 1998)。Almeida 等人將褐藻 *P. canaliculata* 純化所得之 pCl (Iodoperoxidases) 的分子量約為 66 kDa (Almeida, et al., 2000)。Coupe 等人將紅藻 *C. officinalis* 純化所得之 V-BrPO 的分子量則約為 768 kDa(Coupe, et al., 2007)。相較之下，本研究所純化之 V-BrPO 分子量以 Superdex 200 凝膠層析法以及 SDS-PAGE 推論求得酵素分子量約 22 kDa，證明為單體酵素，其分子量要遠小於前人之研究。

本研究為針對台灣海域生產海藻進行 V-BrPO 酵素活性的初次調查，發現從未被研究的綠藻植物門的布氏藻(*Boolea composita*)中含有高 V-BrPO 酵素活性，並有效的進行純化，發現其分子量遠小於其他藻種 V-BrPO 酵素，因此有必要對其生物化學特性以及分子結構進一步探討。

## 參考文獻

- [1]Almeida M.G., Humanes M., Melo R., et al., 1998. *Saccorhiza Polyschides* (phaeophyceae; phyllariaceae) A new source for vanadium-dependent haloperoxidases. *Phytochemistry* 48, 229-239.
- [2]Almeida M. G., Humanes M., Melo R., et al., 2000. Purification and characterisation of vanadium haloperoxidases from the brown alga *Pelvetia canaliculata*. *Phytochemistry* 54, 5-11.
- [3]Almeida M.G., Filipe S., Humanes M., et al., 2001. Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family. *Phytochemistry* 57, 633-642.



- [4]Baden D. G. and Corbett M. D., 1980. Bromoperoxidases from *Penicillium capitatus*, *Penicillium lamourouxii* and *Rhizocephalus phoenix*. *Biochemical Society* 187, 205-211.
- [5]Bantleon R., Altenbuchner J. and van Pée K. H., 1994. Chloroperoxidase from *Streptomyces lividans*: isolation and characterization of the enzyme and the corresponding gene. *Journal of Bacteriol* 176, 2339-2347.
- [6]Björkling F., Frykman H., Godtfredsen S. E. *et al.*, 1992. Lipase catalyzed synthesis of peroxycarboxylic acids and lipase mediated oxidations. *Tetrahedron* 48, 4587-4592 .
- [7]Boer E. de, Kooyk Y. van, Tromp M. G. M., *et al.*, 1986. Bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*: a novel class of enzymes containing vanadium as a prosthetic group? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 869, 48-53.
- [8]Burd W., Yourkevich O., Voskoboev A. J. *et al.*, 1995. Purification and properties of a non-haem chloroperoxidase from *Serratia marcescens*. *FEMS Microbiol Letters*. 129(2-3), 255-260.
- [9]Butler A., Soedjak H. S., Fuller M. P., *et al.* 1990. Studies of vanadium- -bromoperoxidase using surface and cortical protoplasts of *Macrocystis pyriefera* (phaeophyta). *Journal of Phycology* 26, 589-592.
- [10]Butler A., 1998a. Vanadium haloperoxidases. *Current Opinion in Chemical Biology* 2, 279-285.
- [11]Butler A., 1998b. Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms. *Science* 281, 207-209.
- [12]Butler A. and Carter-Franklin J. N., 2004. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. *Natural Product Reports* 21, 180-188.
- [13]Coupe E. E., Smyth M. G., Fosberry A. P., *et al.*, 2007. The dodecameric vanadium-dependent haloperoxidase from the marine algae *Corallina officinalis*: Cloning, expression, and refolding of the recombinant enzyme. *Protein Expression and Purification* 52, 265-272.
- [14]Cowan M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 564-582.
- [15]Denboh T., Suzuki M., Mizuno Y. and Ichimura T., 1997. Suppression of *Laminaria* sporelings by allelochemicals from coralline red algae. *Botanica Marina* 40, 249-256.
- [16]Fenna R., Zeng J. and Davey C., 1995. Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 316, 653-656 .
- [17]Flodin C., Helidoniotis F. and Whitfield F. B., 1999a. Seasonal variation in bromophenol content and bromoperoxidase activity in *Ulva lactuca*. *Phytochemistry* 51, 135-138.
- [18]Flodin C. and Whitfield F. B., 1999b. Biosynthesis of bromophenols in marine algae. *Water Science and Technology* 40, 53-58.
- [19]Hager L. P., Morris D. R., Brown F. S. *et al.*, 1966. Chloroperoxidase II. Utiliation of halogen anions. *The Journal of Biological Chemistry* 241, 1769-1777.
- [20]Hara I. and Sakurai T., 1998. Isolation and characterization of vanadium bromoperoxidase from a marine macroalga, *Ecklonia stolonifera*. *Journal of Inorganic Biochemistry* 72, 23-28.
- [21]Hartung J., Brücher O., a Hach D., *et al.*, 2008. Bromoperoxidase activity and vanadium level of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 69, 2826-2830.
- [22]Hecht H. J., Sobek H., Haag T., *et al.*, 1994. The metal-ion-free oxidoreductase from *Streptomyces aureofaciens* has an  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Nature Structural Biology* 1, 532-537.



- [23]Huwiler M. and Kohler H., 1984. Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/iodide system. *European Journal of Biochemistry* 141, 69-74.
- [24]Itoh N., Izumi Y. and Yamada H., 1985. Purification of bromoperoxidase from *Corallina pilulifera*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 131, 428-435.
- [25]Itoh N., Izumi Y. and Yamada H., 1986. Characterization of nonheme type bromoperoxidase in *Corallina pilulifera*. *Journal of Biological Chemistry* 261, 5194-5200.
- [26]Itoh N., Izumi Y. and Yamada H., 1987. Characterization of nonheme iron and reaction mechanism of bromoperoxidase in *Corallina pilulifera*. *Journal of Biological Chemistry* 262, 11982-11987.
- [27]Itoh N., Hasan A. K. M. Q., Izumi Y. *et al.*, 1988. Substrate specificity, regiospecificity and stereospecificity of halogenation reactions catalyzed by non-heme-type bromoperoxidase of *Corallina pilulifera*. *Biochemistry* 172, 477-484.
- [28]Itoh N., Sasaki H., Ohsawa N., *et al.*, 1996. Bromoperoxidase in *Corallina pilulifera* is regulated by its vanadate content. *Phytochemistry* 42, 277-281.
- [29]Itoh N., Kawanami T., Liu J.-Q., *et al.*, 2001. Cloning and biochemical characterization of Co<sup>2+</sup>-activated bromoperoxidase-esterase (perhydrolase) from *Pseudomonas putida* IF-3 strain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1545, 53-66.
- [30]Jordan P. and Vilter H., 1991. Extraction of proteins from material rich in anionic mucilages: Partition and fractionation of vanadate-dependent bromoperoxidases from the brown algae *Laminaria digitata* and *L. saccharina* in aqueous polymer two-phase systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1073, 98-106.
- [31]Kawanami T., Miyakoshi M., Dairi T. *et al.*, 2002. Reaction mechanism of the Co<sup>2+</sup>-activated multifunctional bromoperoxidase-esterase from *Pseudomonas putida* IF-3. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 398, 94-100.
- [32]Kamenarska Z., Taniguchi T., Ohsawa N., *et al.*, 2007. A vanadium-dependent bromoperoxidase in the marine red alga *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty displays clear substrate specificity. *Phytochemistry* 68, 1358-1366.
- [33]Leblanc C., Colin C., Cosse A., *et al.*, 2006. Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases. *Biochimie* 88, 1773-1785.
- [34]Littlechild J., 1999. Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions. *Current Opinion in Chemical Biology* 3, 28-34.
- [35]Manthey J. A. and Hager L. P., 1981. Purification and Properties of Bromoperoxidase from *Penicillium Capitatus*. *Biological Chemistry* 256, 11232-11238.
- [36]Messerschmidt A. and Wever R., 1996. X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: Chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 392-396.
- [37]Moore B. S., 2006. Biosynthesis of marine natural products: Macroorganisms (part B). *Natural Product reports* 23, 615-629.
- [38]Neumann C. S., Fujimori D. G., and Walsh C. T., 2008. Halogenation Strategies In Natural Product Biosynthesis. *Chemistry & Biology* 15, 99-109.
- [39]Ohshiro T., Nakano S., Takahashi Y., *et al.*, 1999. Occurrence of bromoperoxidase in the marine green macro-alga, *ulvella lens*, and emission of volatile brominated methane by the enzyme. *Phytochemistry* 52, 1211-1215.
- [40]Ohshiro T., Hemrika W., Aibara T., *et al.*, 2002. Expression of the vanadium-dependent



- bromoperoxidase gene from a marine macro-alga *Corallina pilulifera* in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. *Phytochemistry* 60, 595-601.
- [41] Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., *et al.*, 1992. The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold. *Protein Engineering* 5, 197-211.
- [42] Plat H., Krenn B. E. and Wever R., 1987. The bromoperoxidase from the lichen *Xanthoria parietina* is a novel vanadium enzyme. *Biochemical Journal* 248, 277-279.
- [43] Ohsawa N., Ogata Y., Okada N. and Itoh N., 2001. Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, *Corallina pilulifera*: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide. *Phytochemistry* 58, 683-692.
- [44] Sakata K., Kato K., Iwase H., *et al.*, 1991a. Feeding-stimulant activity of algal glycerolipids for marine herbivorous gastropods. *Journal of Chemical Ecology* 17(1), 185-193.
- [45] Sakata K., Iwase Y., Kato K., *et al.*, 1991b. A simple feeding inhibitor for marine herbivorous gastropods and the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* and its application to unpalatable algal extracts. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 261-265.
- [46] Sheffield D. J., Smith A. J., T. R. Harry *et al.*, 1993. Thermostability of the vanadium bromoperoxidase from *Corallina officinalis*. *Biochemical Society transactions* 21, 445S.
- [47] Sheffield D. J., Harry T. R., Smith A. J. *et al.*, 1995. *Corallina officinalis* bromoperoxidase immobilized on agarose. *Phytochemistry* 38, 1103-1107.
- [48] Shimonishi M., Kuwamoto S., Inoue H., *et al.*, 1998. Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macro-alga, *Corallina pilulifera*. *FEBS Letters* 428, 105-110.
- [49] Soedjak H. S. and Butler A., 1990. Characterization of vanadium bromoperoxidase from *Macrocystis* and *Fucus*: reactivity of vanadium bromoperoxidase toward acyl and alkyl peroxides and bromination of amines. *Biochemistry* 29, 7974-7981.
- [50] Sundaramoorthy M., Ternier J. and Poulos T. L., 1995. The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase-cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* 3, 1367-1377.
- [51] Verhaeghe E., Buisson D., Zekri E., *et al.*, 2008. A colorimetric assay for steady-state analyses of iodo- and bromoperoxidase activities. *Analytical Biochemistry* 379, 60-65.
- [52] Vilter H., 1995. Vanadium-dependent haloperoxidases. in: H. Sigel, A. Sigel (Eds.). *Metal ions in biological systems* 31, 325-362.
- [53] van Schijndel J. W.P.M., Vollenbroek E. G. M. and Wever R., 1993a. The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1161, 249-256.
- [54] van Schijndel J. W. P. M., Simons L.H., Vollenbroek E.G.M., Wever R., 1993b. The vanadium chloroperoxidase from the fungus, *Curvularia inaequalis* evidence for the involvement of a histidine residue in the binding of vanadate. *FEBS Letters* 336, 239-242.
- [55] Vilter H., Glombitza K.-W. and Grawe A., 1983a. Peroxidases from Phaeophyceae. I: Extraction and Detection of the Peroxidases. *Botanica Marina* 26, 331-340.
- [56] Vilter H. and Glombitza K.-W., 1983b. Peroxidases from Phaeophyceae II: Analytical Disc-Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Peroxidases from Phaeophyceae. *Botanica Marina* 26, 341-344.
- [57] Vilter H., 1984. Peroxidases from phaeophyceae: A vanadium(V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry* 23, 1387-1390.



- [58]Vilter H., 1995. Vanadium-dependent haloperoxidases. in: H. Sigel, A. Sigel (Eds.). *Metal ions in biological systems* 31, 325-362.
- [59]Wagner C., Molitor I. M., König G. M., 2008. Critical view on the monochlorodimedone assay utilized to detect haloperoxidase activity. *Phytochemistry* 69, 323-332.
- [60]Wever R., Tromp M. G. M., Krenn B. E., *et al.*, 1991. Brominating activity of the seaweed *Ascophyllum nodosum* : Impact on the biosphere. *Environmental Science & Technology* 25, 446-449.
- [61]Winter J. M., Moffitt M. C., Zazopoulos E., *et al.*, 2007. Molecular basis for chloronium-mediated meroterpene cyclization. *Journal of Biological Chemistry* 282 (22), 16362-16368.
- [62]Wiesner W., van Pée K. H. and Lingens F., 1988. Purification and characterization of a novel bacterial non-heme chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrrocinia*. *Journal of Biological Chemistry* 263, 13725-13732.
- [63]Zeng J. and Fenna R. E., 1992. X-ray crystal structure of canine myeloperoxidase at 3 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 226, 185-207.

