

การทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์ไคตินเนสและไคโตไบเอส  
จากเลือดกุ้งกุลาดำ

Purification and Characterization of Chitinase and Chitobiase  
from the Tiger Prawn's (*Penaeus monodon*) hemolymph



นิทรา มาศวิวัฒน์  
Nitira Maswivat

๗

|           |                       |
|-----------|-----------------------|
| เลขหมู่   | QP702.C5 a6A ๑๕๔3 ๑.2 |
| Order Key |                       |
| Bib Key   | 201915                |
|           | 3 1.๑.๒.2543          |


วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
Master of Science Thesis in Biological Sciences  
Prince of Songkla University  
2543

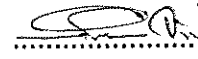
ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอสจาก  
เลือดกิ้งกูดดำ

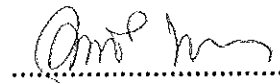
ผู้เขียน นางนิทรา มาศวิวัฒน์  
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

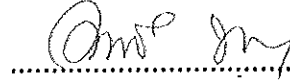
คณะกรรมการที่ปรึกษา

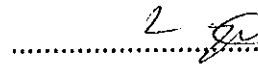
คณะกรรมการสอบ

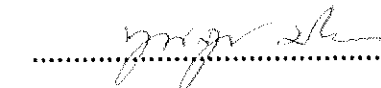
 ประธานกรรมการ  
(ดร. อุตสาหกรรม จันทรอำไพ)

 ประธานกรรมการ  
(ดร. อุตสาหกรรม จันทรอำไพ)

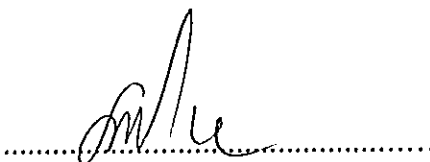
 กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

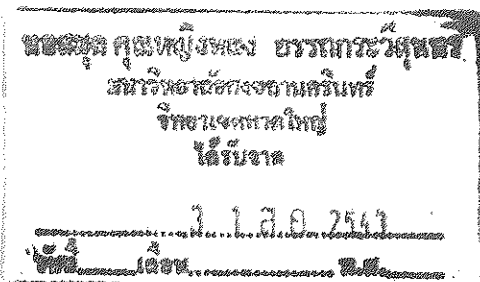
 กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

 กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. นงพร ไตว์ฉนะ)

 กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสุวรรณ)

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์  
ชีวภาพ

  
(รองศาสตราจารย์ ดร. นพรัตน์ นำรุ่งรักษ์)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย



ชื่อวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์ไคตินเนส และไคโตไบเอส  
จากเลือดกุ้งกุลาดำ  
ผู้เขียน นางนิทรา มาศวิวัฒน์  
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
ปีการศึกษา 2543

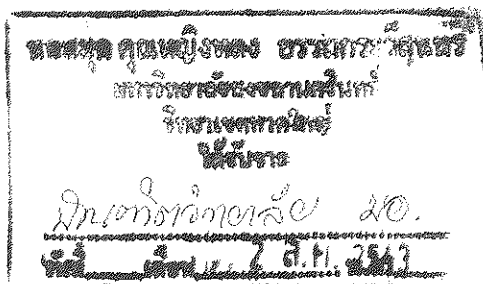
### บทคัดย่อ

การทำงานของระบบไคติโนไลติก (chitinolytic system) ประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase; EC 3.2.1.14) และไคโตไบเอส (chitobiase; EC 3.2.1.30) ระบบดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไคติน (chitin) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่พบในธรรมชาติมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลสให้หน่วยย่อยเป็น N-acetylglucosamine (NAG)

จากการศึกษาในเลือดกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่า ไคตินเนส และไคโตไบเอสปรากฏในส่วนซีรัมมากกว่าในเม็ดเลือด คิดคิดเป็นร้อยละ 84 และ 96 ตามลำดับ เอนไซม์ไคตินเนสและไคโตไบเอสจากซีรัมของเลือดกุ้งกุลาดำทำงานได้ดีที่ pH 5.0 และ 5.5 และที่อุณหภูมิ 40 °C และ 50 °C ตามลำดับ ผลการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ไคตินเนสเมื่อใช้ไคตินผงจากกระดองของปลานมึกเป็นสารตั้งต้นในสารก่อปฏิกิริยา พบว่า มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 3.57 มก/มล. และค่า  $V_{max}$  เท่ากับ 3.13 ยูนิต/มล./ชั่วโมง สำหรับไคโตไบเอส เมื่อใช้ *p*-nitrophenyl N-acetylglucosamininide เป็นสารตั้งต้นในสารก่อปฏิกิริยา พบว่า มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 11 mM และ  $V_{max}$  5 ยูนิต/มล. เอนไซม์ไคตินเนส และไคโตไบเอสสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ถึง 4 °C โดยไม่เสียสภาพเป็นเวลา 20 และ 30 วัน ตามลำดับ

กระบวนการแยกเอนไซม์ทั้งสองชนิดจากเลือดกุ้งกุลาดำให้ได้สารกึ่งบริสุทธิ์เมื่อดำเนินการโดยการกรองด้วย ultrafiltration (Centricon-30), โครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตอร์ชั้น Sephadex G-200 แล้วตามด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ DEAE sephadex A-50 พบว่าผลสุดท้ายได้ไคตินเนสและไคโตไบเอสมีความบริสุทธิ์ 18.33 และ 38.00 เท่า และได้ปริมาณเอนไซม์กลับคืนมาร้อยละ 63.14 และ 62.70 ตามลำดับ จาก

การประเมินน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ทั้งสองชนิดโดยโครมาโตกราฟฟีแบบเจลฟิลเตรชัน และ ultrafiltration พบว่า โคติเนสจากเลือดกึ่งกลาดำน่าจะประกอบด้วย 3 ไอโซไซม์ ซึ่งมีขนาด 199,000 50,000 และ ต่ำกว่า 30,000 Da ตามลำดับ ส่วนโคโตไบเอสมีขนาดประมาณ 83,000 Da



Thesis Title            Purification and Characterization of Chitinase and Chitobiase  
                                 from the Tiger Prawn's (*Penaeus monodon*) hemolymph  
Author                    Mrs. Nitra Masswiwat  
Major Program        Biological Sciences  
Academic Year        2000

#### Abstract

Chitinolytic system involving the activity of at least 2 enzymes, namely chitinase (EC.3.2.1.14) and chitobiase (EC 3.2.1.30). The system plays an important role in hydrolysis of chitin, which is known to exist as a second most abundant natural polymer next to cellulose and its final product is N-acetylglucosamine. (NAG)

Results from the study in hemolymph of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) suggested that both chitinase and chitobiase distribute more in serum than in cellular fraction, which were 84 and 96 %, respectively. The optimum pH and temperature on activities of former and later enzymes were 5.0 and 5.5 and were 40 °C and 50 °C, respectively. Kinetic analysis for chitinase using chitin powder extracted from squid pen as a substrate revealed that  $K_m$  was 3.57 mg/ml and  $V_{max}$  was 3.13 U/ml/hr. Similar analysis for chitobiase using *p*-nitrophenyl N-acetylglucosaminide as a substrate showed that  $K_m$  was 11 mM and  $V_{max}$  5 U/ml/min. It appeared at temperature below 4 °C that chitobiase was more stable than chitinase. The activities of chitobiase and chitinase were not significantly changed when they were kept at that temperature for 30 and 20 days respectively.

Partial purification of the enzymes from hemolymph of the prawn could be carried out by ultrafiltration (centricon-30), Sephadex G-200 gel filtration and followed by ion-exchange chromatography. After the final process, purity of

chitinase and chitobiase were 18.33 and 38.00 fold, while the percent recovery were 63.14 and 62.70 % respectively. Chromatographic profile from gel filtration and ultrafiltration suggested chitinase in hemolymph of prawn might be composed of 3 isozymes which showed molecular weight of 199,000, 50,000 and less than 30,000 daltons. However, a single isozyme of chitobiase were eluted at molecular weight 830,00 daltons.

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.อุตสาห์ จันทร์อำไพ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาให้คำแนะนำ ให้ความรู้ในด้านต่าง ๆ ในการค้นคว้าทดลองงานวิจัย รวมทั้งการเขียนและการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา กรรมการที่ปรึกษาร่วม ได้กรุณาให้คำปรึกษาอนุเคราะห์อุปการะต่าง ๆ รวมทั้งการเขียนและการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร ไตวัฒนะ กรรมการภาควิชาชีวเคมี และรองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสุวรรณ กรรมการบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบ และให้คำแนะนำในการเขียน ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ ที่ให้คำแนะนำ ให้กำลังใจ และให้ความรู้ในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา และคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ประสิทธิ์ ประสาทวิชาความรู้ให้คำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการเรียนรู้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกคนที่ให้บริการอย่างดีเยี่ยมในทุกด้านตลอดการศึกษา และขอขอบคุณคุณประสพ ศรประสิทธิ์ ที่ช่วยให้คำแนะนำ พร้อมทั้งอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับวัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี สำหรับทำการวิจัยครั้งนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณเสริม, ด.ญ. ธัญวรรณ และด.ญ. อัญชัน มาศวิวัฒน์ ที่ช่วยเป็นแรงบันดาลใจในการต่อสู้ชีวิตอยู่เบื้องหลังความสำเร็จ รวมทั้ง พ่อ แม่ พี่น้อง ที่ช่วยแบ่งเบาภาระของครอบครัวในช่วงที่ลาศึกษาต่อ และครอบครัวมาศวิวัฒน์ ที่คอยติดตามเป็นกำลังใจมาตลอด ขอขอบคุณผู้อำนวยการศักรินทร์ จริงจิตร ผู้อำนวยการโรงเรียนย่านตาขาวรัฐชนูปถัมภ์ และเพื่อนร่วมงานที่ให้การสนับสนุน ในการศึกษาครั้งนี้ด้วยความจริงใจ จึงทำให้วิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นิทรา มาศวิวัฒน์

## สารบัญ

|                             | หน้า |
|-----------------------------|------|
| บทคัดย่อ                    | (3)  |
| Abstract                    | (5)  |
| กิตติกรรมประกาศ             | (7)  |
| สารบัญ                      | (8)  |
| รายการตาราง                 | (9)  |
| รายการรูป                   | (10) |
| ตัวย่อสัญลักษณ์             | (11) |
| 1. บทนำ                     | 1    |
| บทนำต้นเรื่อง               | 1    |
| การตรวจเอกสาร               | 2    |
| วัตถุประสงค์                | 47   |
| 2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ | 42   |
| วัสดุ                       | 42   |
| อุปกรณ์                     | 43   |
| วิธีการ                     | 44   |
| 3. ผลการทดลอง               | 53   |
| 4. วิจารณ์                  | 77   |
| 5. สรุป                     | 84   |
| เอกสารอ้างอิง               | 85   |
| ภาคผนวก                     | 101  |



## รายการตาราง

| ตารางที่ .   | หน้า |
|--|------|
| 1.1 ตารางแสดงปริมาณโคตินในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ                                  | 4    |
| 1.2 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โคติเนส  | 18   |
| 1.3 ตารางแสดงค่า $K_m$ ของเอนไซม์โคติเนส   | 20   |
| 1.4 ผลของ pH และอุณหภูมิของเอนไซม์โคติเนส  | 22   |
| 1.5 ผลของอิออนโลหะ และสารประกอบบางชนิดต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส          | 24   |
| 1.6 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โคโตไบเอส  | 27   |
| 1.7 ตารางแสดงค่า $K_m$ และ $V_{max}$ ของเอนไซม์โคโตไบเอส                         | 29   |
| 1.8 ผลของ pH และอุณหภูมิของเอนไซม์โคโคไบเอส                                      | 31   |
| 1.9 ผลของอิออนโลหะ และสารประกอบบางชนิดต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโคไบเอส        | 33   |
| 3.1 ผลการหาปริมาณโปรตีน และค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติโนไลติก                    | 53   |
| 3.2 ผลของการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์โคติเนส                                       | 62   |
| 3.3 ผลของการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์โคโตไบเอส                                     | 65   |
| 3.4 แสดงปริมาณเอนไซม์โคติโนไลติกที่ผ่านการกรอง                                   | 68   |
| 3.5 สรุปขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์โคติเนสจากเลือดกึ่งกลาดำ               | 71   |
| 3.6 สรุปขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์โคโตไบเอสจากเลือดกึ่งกลาดำ             | 71   |
| 3.7 ตารางแสดงค่า $K_{av}$ ที่คำนวณได้จากปริมาตรระของโปรตีนมาตรฐาน และสารตัวอย่าง | 74   |

## รายการรูป

| รูปที่  | หน้า |
|---|------|
| 1.1 แสดงโครงสร้างของโคติน   | 3    |
| 1.2 แสดงการทำงานของเอนไซม์โคติโนไลติก   | 7    |
| 3.1 แสดงผลความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส   | 54   |
| 3.2 แสดงผลความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอส   | 55   |
| 3.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส   | 56   |
| 3.4 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอส   | 57   |
| 3.5 ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส   | 58   |
| 3.6 ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอส   | 59   |
| 3.7 ผลจากการหาสภาพการคงตัวของเอนไซม์โคติเนส   | 60   |
| 3.8 ผลจากการหาสภาพการคงตัวของเอนไซม์โคโตไบเอส   | 61   |
| 3.9 กราฟแสดงความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสเมื่อใช้โคตินแตกต่างกัน  | 63   |
| 3.10 กราฟแสดงค่า $K_m$ และ $V_{max}$ ของเอนไซม์โคติเนส  | 64   |
| 3.11 กราฟแสดงความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสเมื่อใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน  | 66   |
| 3.12 กราฟแสดงค่า $K_m$ และ $V_{max}$ ของเอนไซม์โคโตไบเอส  | 67   |
| 3.13 กราฟแสดงปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี             | 72   |
| 3.14 กราฟแสดงปริมาณโปรตีนและค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ | 73   |
| 3.15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $OD_{280}$ โปรตีนมาตรฐานที่ผ่านเจลฟิลเตรชัน  | 75   |
| 3.16 กราฟแสดงการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอสจากเลือดกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน                  | 76   |

## ตัวย่อและสัญลักษณ์

|                    |   |                                     |
|--------------------|---|-------------------------------------|
| $\alpha$ -         | = | alpha                               |
| $\beta$ -          | = | beta                                |
| $\gamma$ -         | = | gamma                               |
| $\mu\text{mol}$    | = | micromolar                          |
| Da                 | = | dalton                              |
| DEAE               | = | diethylaminoethyl                   |
| DMAB               | = | <i>p</i> -dimethylaminobenzaldehyde |
| $K_m$              | = | Michalis - Menten constant          |
| M                  | = | molar                               |
| mM                 | = | milimolar                           |
| mg                 | = | milligram                           |
| ml                 | = | millilitre                          |
| min                | = | minute                              |
| MW                 | = | molecular weight                    |
| N                  | = | normal                              |
| NAG                | = | N-acetyl glucosamine                |
| ppm                | = | part per million                    |
| rpm                | = | revolution per minute               |
| Sp.Act.            | = | specific activity                   |
| U                  | = | unit                                |
| มล.                | = | มิลลิลิตร                           |
| $^{\circ}\text{C}$ | = | องศาเซลเซียส                        |

## 1. บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

ไคตินเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติที่มากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ N-acetylglucosamine (NAG) เชื่อมด้วยพันธะ  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glycosidic เป็นเส้นตรงเช่นเดียวกับเซลลูโลส ไคตินทำหน้าที่สำคัญคือ เป็นโครงสร้างให้ความแข็งแรงแก่เปลือกของสัตว์ พวกอาร์โทรพอด เช่น กุ้ง กิ้งก่า ปู แมลง และพวกมอลลัสต์ เช่น เปลือกหอย และกระดองปลาหมึก นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา ยีสต์ แบคทีเรีย รวมทั้งสาหร่ายบางชนิด ไคตินที่ผลิตขึ้นมาในโลกแต่ละปีมากมายมหาศาล หรือไม่น้อยกว่าล้านตัน

การย่อยสลายไคตินในธรรมชาติให้เป็นหน่วยย่อยอาศัยการทำงานอย่างของ เอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิดคือ ไคติเนส (Chitinase:EC3.2.1.14) และไคโตไบเอส (Chitinase : EC 3.2.1.30) ที่เรียกรวบรวมไคติโนไลติก (chitinolytic system) ซึ่งพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และอาจทำหน้าที่แตกต่างกัน เช่น แบคทีเรียจะสังเคราะห์เอนไซม์ไคติโนไลติกออกมาย่อยไคตินจากสิ่งแวดล้อมเพื่อนำผลผลิตไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เชื้อราจะสังเคราะห์ออกมาย่อยไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ในระหว่างการแบ่งเซลล์ ในทางเดินอาหารของปลาและสัตว์บางชนิดจะสังเคราะห์ออกมาย่อยอาหารที่มีส่วนประกอบของไคติน หรือที่พบในเลือดทำหน้าที่เกี่ยวกับกลไกการต่อต้านเชื้อโรคที่เซลล์บุผิว (epithelial cell) ของสัตว์พวกอาร์โทรพอดจะสังเคราะห์เอนไซม์ดังกล่าวออกมาย่อยไคตินที่เปลือกทำให้ขบวนการลอกคราบเกิดขึ้นสะดวก และนำเอาผลผลิตที่เกิดขึ้นมาใช้ใหม่ เอนไซม์ไคติโนไลติกในพืชมีหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับกลไกการต่อต้านเชื้อโรคโดยจะถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์ขึ้นมาเมื่อถูกบุกรุกโดยเชื้อโรค หรือเมื่อเกิดบาดแผล

เนื่องจากเอนไซม์ไคติโนไลติกมีบทบาทสำคัญหลายประการในการดำรงอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิต จึงมีผู้ศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพจากแหล่งต่าง ๆ หลายแห่ง ทั้งนี้เพื่อความเหมาะสมสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ

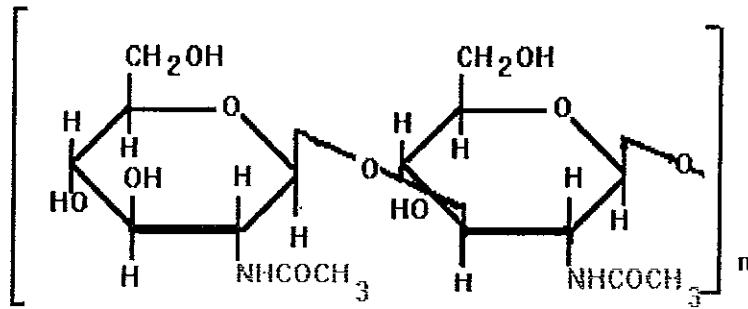
## การตรวจเอกสาร

### 1.1 ไคติน

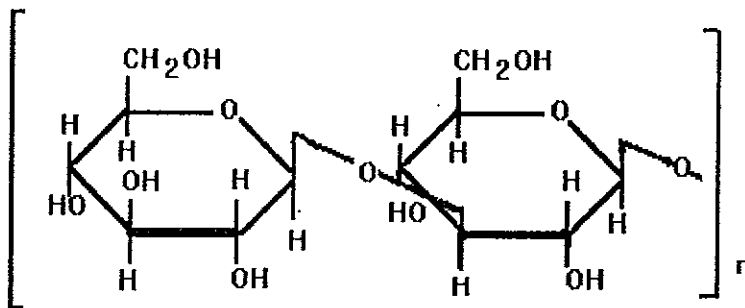
ในปี ค.ศ. 1811, Henri Bracannot เป็นคนแรกที่รายงานการค้นพบว่าเป็นสารประกอบที่ทนต่อสภาวะต่างซึ่งสกัดได้จากเชื้อราจึงเรียกว่า ฟังจิน (fungine) ต่อมาในปี ค.ศ. 1811, Odier ได้แยกสารที่มีคุณสมบัติคล้ายกันนี้จากปีกนอกของแมลงและให้ชื่อว่า chitin (อ้างโดย Cabib, 1987) จากการศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติของสารดังกล่าวพบว่า เป็นคาร์โบไฮเดรตคล้ายกับเซลลูโลสแต่ต่างจากเซลลูโลสที่หมู่ hydroxyl group ตำแหน่งที่ 2 ของคาร์บอนในกลูโคสจะถูกแทนที่ด้วยหมู่อะซิติด acetamido ( $\text{NHCOCH}_3$ ) ดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 1.1 จึงเรียกหน่วยย่อยของไคตินว่า N-acetylglucosamine (NAG) ซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) ไกลโคซิดิก

ไคตินเป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นสารที่ให้ความแข็งแรงแก่เปลือกสัตว์ซึ่งมีความสำคัญคล้ายกับเซลลูโลสในพืชคือ เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างหลักที่เป็นแกนของร่างกายในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีโครงร่างแข็งภายนอก (exoskeleton) โดยเฉพาะในไฟล์ม อาริโธรโปดา เช่น กุ้ง กั้ง ปู แมลง และสัตว์กลุ่มมอลลัสต์ เช่น ปลาหมึก นอกจากนี้ยังพบได้ในผนังเซลล์ของเชื้อรา เช่น ใน *Penicillium chrysogenum* พบว่า มีไคตินอยู่ประมาณ 20.1% โดยน้ำหนักแห้ง (Knorr, 1984) จะเห็นว่าเราสามารถพบไคตินในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในโปรคาริโอต และยูคาริโอต ซึ่งปริมาณไคตินในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1.1 พบว่าในแต่ละปีการสังเคราะห์ไคตินของสัตว์ทะเลในกลุ่มครัสเตเชีย จำพวก กุ้ง หอย ปู และคริล ฯลฯ จะมีปริมาณนับเป็นล้านตัน ซึ่งนับว่าเป็นความอุดมสมบูรณ์ที่เราจะต้องศึกษา เพื่อจะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

แหล่งของไคตินส่วนใหญ่ได้มาจากของเหลือทิ้งจากกุ้ง ( หัวกุ้งและเปลือกกุ้ง) จากอุตสาหกรรมการส่งออกอาหารทะเล และวัตถุดิบที่มีศักยภาพสูงสุดสำหรับไคตินในสัตว์คือ แอนตาร์กติกคริล (พงศจันทร์ จันทยศ, 2534) นอกจากนี้ พบว่าแหล่งของไคตินที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือ กระดองปลาหมึกมีไคติน 40 % เป็นแหล่งไคตินที่มีแร่ธาตุอื่นปนอยู่น้อยมากจึงง่ายต่อการเตรียมไคตินให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ (ธีระพล ประมวลกิจจา, 2534)



Chitin



Cellulose

รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส และไคติน

ที่มา : Cabib, 1987

ตารางที่ 1.1 ปริมาณไคตินในสัตว์ และราชชนิดต่าง ๆ

| Type                            | Chitin contents (%)   | Type                            | Chitin contents (%)                   |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| Crustacea                       |                       | Insects                         |                                       |
| <i>Cancer</i> (Crab)            | 72.1 <sup>c</sup>     | May beetle                      | 16 <sup>b</sup>                       |
| <i>Carcinus</i> (Crab)          | 0.43-3.3 <sup>a</sup> | Diptera (True fly)              | 54.8 <sup>c</sup>                     |
| <i>Callinectes</i> (blue crab)  | 14 <sup>a</sup>       | Calleria (Wax worm)             | 33.7 <sup>c</sup>                     |
| <i>Pleuroncodes</i> (red crab)  | 1.38-1.8 <sup>b</sup> | Periplanet (cockroach)          | 2.0 <sup>b</sup>                      |
| <i>Parallthodes</i> (king crab) |                       | Blatella (cockroach)            | 10 <sup>b</sup>                       |
| <i>Nephrops</i> (lobster)       | 69.1 <sup>c</sup>     | Piers(sulfur butterfly)         | 64 <sup>c</sup>                       |
| <i>Nephrops</i> (lobster)       | 69.8 <sup>c</sup>     | Tenebrio(beetle)                | 5-15 <sup>b</sup> ;27-35 <sup>c</sup> |
| <i>Lepus</i> (bamacles)         | 58.3 <sup>c</sup>     | <i>Bombyx</i> (silk worm)       | 44.2 <sup>c</sup>                     |
| <i>Cragon</i> (shrimp)          | 5.8 <sup>b</sup>      | Calleria (wax worm)             | 33.7 <sup>c</sup>                     |
| Molluscan Orans                 |                       | Grasshopper                     | 2-4 <sup>a</sup> ;20 <sup>c</sup>     |
| Clamshell                       | 6.1 <sup>b</sup>      | Fungi                           |                                       |
| Squid ,skeleton pen             | 41.0 <sup>b</sup>     | <i>Apergillus niger</i>         | 42.0 <sup>e</sup>                     |
| oyster shell                    | 3.6                   | <i>Penicillium notatum</i>      | 18.5 <sup>e</sup>                     |
|                                 |                       | <i>Penicillium chrysogenium</i> | 20.1 <sup>a</sup>                     |
|                                 |                       | <i>Mucor rouxii</i>             | 44.5                                  |

<sup>a</sup> Wet body weight<sup>d</sup> Total dry weight of cuticle<sup>b</sup> Dry body weight<sup>e</sup> Dry weight of cell wall<sup>c</sup> Oranganic weight of cuticle

ที่มา : Knorr,1984

คุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีของไคตินที่พบในธรรมชาติโดยทั่วไปมี 3 ชนิดตามลักษณะการจัดเรียงตัวของสายโมเลกุล กล่าวคือ ไคตินชนิดแรก คือ แอลฟาไคติน ( $\alpha$ -chitin) เป็นไคตินที่มีสายโมเลกุลมีการจัดเรียงตัวแบบทิศทางสวนทางกัน (anti-parallel) มีลักษณะที่แข็งแรงมาก พบมากที่สุดในผิวเคลือบของแมลง รา และสัตว์พวกกุ้ง ปู ไคตินชนิดที่สอง เบต้าไคติน ( $\beta$ -chitin) เป็นไคตินที่มีสายโมเลกุลมีการจัดเรียงตัวแบบทิศทางเดียวกัน (parallel) พบมากในพวกมอลลัสก์ เช่น หอย ปลานมึก ไคตินชนิดที่สาม แกมมาไคติน ( $\gamma$ -chitin) เป็นไคตินที่มีสายโมเลกุลมีการจัดเรียงตัวทั้งสองแบบคือมีทั้ง anti-parallel และ parallel รวมอยู่ด้วยกัน พบมากในเปลือกหุ้มไข่ของด้วงปีกแข็ง ชนิด *Ptilinotecnus* และ *Phycaenus fungi* แต่ในปลานมึกกล้วย สามารถพบไคตินที่มีรูปแบบการจัดเรียงตัวแตกต่างกันตามส่วนต่าง ๆ เช่น ส่วนงอยปากที่มีลักษณะแข็งจะพบ  $\alpha$ -chitin ส่วนกระดองมีลักษณะอ่อนนุ่มพบ  $\beta$ -chitin และส่วนเยื่อกระเพาะอาหารพบแบบ  $\gamma$ -chitin (Muzzarelli, 1977)

คุณสมบัติโดยทั่วไปของไคติน ไม่สามารถละลายน้ำ และตัวทำละลายทั่วไปได้ แต่สามารถละลายได้ใน ไดมethylอะซิทาไมด์ ซึ่งมีลิเทียมคลอไรด์ 5 % (Austin, et al., 1981) ส่วนไคตินที่อยู่ในรูปอนุพันธ์สามารถละลายน้ำได้ เช่น แอทธิลีนไกลคอลไคติน (ethylene glycol chitin) และ คาร์บอกซีเมทิลไคติน (carboxy-methyl chitin) (Tokura et al., 1983) ในธรรมชาติไคตินสามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ไคติโนไลติก

การใช้ประโยชน์จากไคตินมีการประยุกต์ใช้งานด้านต่าง ๆ อย่างหลากหลาย โดยการเปลี่ยนรูปของไคตินไปเป็นอนุพันธ์ของไคตินในรูปแบบต่าง ๆ กัน เช่น อยู่ในรูป ไคโตแซน หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว NAG เพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสมในด้านต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการทำเครื่องสำอาง การแพทย์ การทำกระดาษ และเภสัชกรรม เป็นต้น (ธีระพล ประมวลกิจจา, 2534)

## 1.2. เอนไซม์ไคติโนไลติก

เอนไซม์ไคติโนไลติกมีบทบาทในการย่อยสลายไคตินในธรรมชาติให้เป็นหน่วยย่อย N-acetylglucosamine (NAG) ซึ่งมีลักษณะการทำงานร่วมกันอย่างต่อเนื่องเป็นระบบเรียกว่า Chitinolytic system โดยทั่วไปเอนไซม์ย่อยไคตินจะถูกเหนี่ยวนำให้หลั่งออกมาเป็นกลุ่ม



ร่วมกันในลักษณะ multienzyme complex ซึ่งส่วนมาก ประกอบด้วยเอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด คือ ไคตินเนส (EC 3.2.1.14) และไคโตไบเอส (EC 3.2.1.30) (Linsays, 1986) โดยไคตินเนสจะทำหน้าที่ย่อยโพลีเมอร์ของ NAG จนกระทั่งเป็นไคโตไบเอสซึ่งเป็นผลผลิตหลัก และจะได้ triacetylchitotriose บ้างเล็กน้อย จากนั้นไคโตไบเอสจะทำงานต่อเนื่องโดยย่อยไคโตไบเอสให้เป็นโมโนเมอร์ NAG (Shaikhand Deshpende, 1993) ดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 1.2

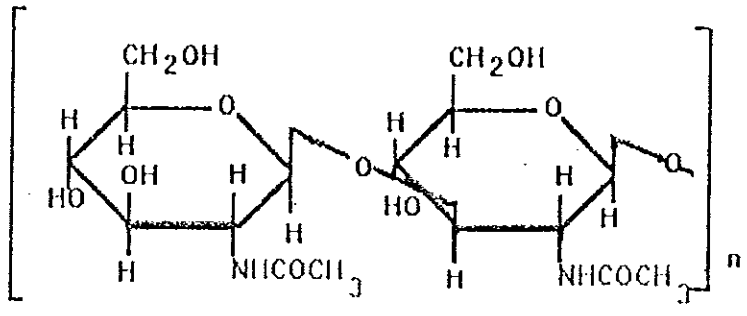
### 1.2.1 แหล่งของเอนไซม์ไคติโนไลติก

เอนไซม์ไคติโนไลติกพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไปทั้งโปรคาริโอต และ ยูคาริโอต ซึ่งมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในปัจจุบันทั้งในสัตว์ พืช และในจุลินทรีย์

#### 1.2.1.1 แหล่งของเอนไซม์ไคติโนไลติกในสัตว์

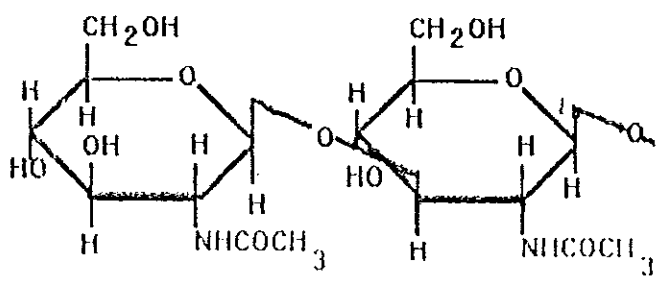
เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถพบได้ในสัตว์ทั่วไป เช่นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซีเลนเตอเรต, โพลีคีต, โอลีคีต และในเนมาโตดบางชนิด เช่น Horn worm: *Munduca sexta*, Silk worm: *Bombyx mori* ซึ่งจะสังเคราะห์ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive) ก่อน หลังจากนั้นจึงเกิดปฏิกิริยาการย่อยโปรตีน (proteolysis) ให้อยู่ในรูปที่สามารถทำงานได้ (active) ต่อไป (Koga, et al., 1989) ในสัตว์กลุ่ม มอสซิลบางชนิด เช่น หอยนางรม (Wright, 1986) ส่วนในพวกครัสเตเชีย เช่น ในตัวอ่อนของกุ้ง (*Penaeus japonicus*) (Kono, et al., 1990) ในกุ้งมังกร (lobster) (Lynn, 1990) คริล (Krill) พวก *Euphasia superba* และ *Megany norvegior* (Spindler, 1988) พวกแมลงต่าง ๆ จะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ไคติโนไลติกใน integument และ molting fluid ซึ่งทำหน้าที่สลายไคตินในคิวติเคิล และยังพบได้ในเลือด และ ทางเดินอาหารอีกด้วย (Funke, et al., 1989) การผลิตเอนไซม์ไคติโนไลติกในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังส่วนใหญ่จะหลั่งมาจากต่อมเนื้อเยื่อ (glandular tissue) ของระบบทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตามสามารถตรวจพบเอนไซม์นี้ได้จากผิวหนังของกลุ่มเนมาโตดบางชนิดในช่วงฟักไข่หรือจากต่อมใต้ผิวหนัง (epidermal gland) ของกลุ่มอาร์โทรพอดในช่วงของการลอกคราบ

สำหรับสัตว์มีกระดูกสันหลังปัจจุบันมีการศึกษากันมากขึ้น พบว่าตำแหน่งการสังเคราะห์ และปริมาณเอนไซม์แตกต่างกัน เช่น จากการศึกษาในซีรัม และเม็ดเลือดขาวของคน พบว่า มีมากในเม็ดเลือดขาว และมีมากที่สุด ในเม็ดเลือดขาวชนิดกรานูโลไซต์ (Escott and Adams, 1995)



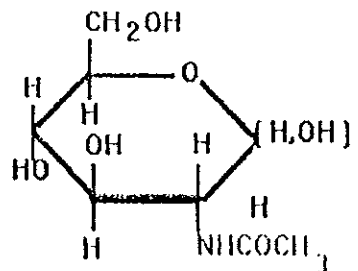
Chitin

Chitinase



Chitobiose

Chitobiase



N- acetyl - D - glucosamine

รูปที่ 1.2 แผนภาพแสดงขั้นตอนการย่อยสลายไคตินโดยอาศัยระบบการทำงานของ เอนไซม์ ไคตินเนส และเอนไซม์ไคโตไบเอส

ที่มา : Brine. 1984

ในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์เลื้อยคลานบางชนิดจะหลั่งเอนไซม์ไคตินเนสจากตับอ่อน และเซลล์ผิวหนังทางเดินอาหาร ในขณะที่นกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมบางชนิดหลั่งจากเซลล์ผิวหนังทางเดินอาหารเพียงแหล่งเดียว (Jeuniaux, 1986)

#### 1.2.1.2. แหล่งของเอนไซม์ไคติโนไลติกในพืช

การศึกษาเอนไซม์ไคติโนไลติกในพืชเริ่มศึกษาคั้งแรกจากการสกัดสาร emulsin จากเมล็ดเอลมอล โดยนำมาแยกด้วยโครมาโตกราฟี (Zechmeister and Toth., 1938 อ้าง โดย Reynolds, 1954) ในถั่ว : *Phaseolus vulgaris* (Boller, et al., 1983) ในมันเทศ : *Dioscorea opposita* (Tsukamoto, et al., 1984 อ้างโดย Cabib., 1987) ในแตงกวา และในยาสูบ : *Nicotina tabacum* (Grusset, et al., 1990) และจากการศึกษาในยางพารา พบว่า มีไคตินเนสอยู่ในส่วนบี-ซีรัมของน้ำยางถึง 20 % ของโปรตีนทั้งหมด

การศึกษาเอนไซม์ไคติโนไลติกในพืช ส่วนใหญ่มุ่งเน้นศึกษาเฉพาะเอนไซม์ไคตินเนส มีรายงานการศึกษาไคโตไบเอสน้อยมากเนื่องจากส่วนประกอบในเซลล์พืชไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ แต่ไคตินเนสได้รับความสนใจ และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในพืช เนื่องจากไคตินเนสมีความสำคัญในการต่อต้านต่อการบุกรุกของเชื้อโรคในพืช โดยมีการทำงานร่วมกับเอนไซม์  $\beta$ -1,3 กลูคาเนสแบบเสริมฤทธิ์ร่วมกัน (synergistic) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคโดยที่ไคตินเนสจะย่อยสลายพันธะไกลโคซิติกในส่วนประกอบที่เป็นไคติน ในขณะที่เอนไซม์  $\beta$ -1,3 กลูคาเนสจะย่อยสลายพันธะไกลโคซิติกในส่วนที่เป็น  $\beta$ -1,3 กลูแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักในผนังเซลล์ของเชื้อโรค จากคุณสมบัติดังกล่าวไคตินเนสจึงถูกจัดอยู่ในกลุ่ม PR - protein (pathogenesis relate protein)

Mauch และคณะ (1988) พบว่า เอนไซม์ไคตินเนส ที่พบคู่กับเอนไซม์  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส ซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากผักถั่วลันเตาที่ถูกบุกรุกด้วยเชื้อ *Fusarium solani* และ *Fusarium phasioli* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ 15 ชนิดใน 18 ชนิดที่ทดสอบ แต่ถ้าใช้เอนไซม์  $\beta$ -1,3 - กลูคาเนสเพียงอย่างเดียว จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Fusarium solani* และ *Fusarium pisi* ได้

#### 1.2.1.3 แหล่งของเอนไซม์ไคติโนไลติกในจุลินทรีย์

ปัจจุบันมีการศึกษาเอนไซม์ไคติโนไลติกกันอย่างกว้างขวางในพวกจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้มีการสังเคราะห์ไคติโนไลติกออกมาเพื่อย่อยสลายไคตินในธรรมชาติให้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่หมุนเวียนในระบบนิเวศ

แหล่งของเอนไซม์ไคติโนไลติกจากแบคทีเรีย มักเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกมาออกเซลล์ เช่น การศึกษาแบคทีเรียในท้องทะเลหลายชนิด (Anderson, 1978) รวมทั้งแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ดีในท้องทะเลที่มีระดับความเค็มสูง พบว่า ไม่ใช่ทุกชนิดที่สามารถย่อยไคตินได้ แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไคติโนไลติกที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง คือจากบ่อเลี้ยงกุ้ง จากการศึกษาของทัศนัย วาหะ (2537) ได้แยกจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไคติเนสได้จากตะกอนดินของบ่อเลี้ยงกุ้ง พบว่าแบคทีเรีย *Aromonas sp.* หลายสายพันธุ์สามารถสังเคราะห์ไคติเนสได้ปริมาณมาก

O'Brein และคณะ (1987) ทำการศึกษาแยกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 101 ชนิดในสิ่งแวดล้อม พบว่า 20 ชนิด ที่สามารถ สังเคราะห์ได้ทั้งเอนไซม์ไคติเนส และไคโตไบเอส และอีก 4 ชนิดที่สามารถสังเคราะห์ได้เฉพาะเอนไซม์ไคโตไบเอสเพียงอย่างเดียว Cody และคณะ (1989) ทำการศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ไคติเนส และไคโตไบเอส จาก *Bacillus* 29 ชนิด พบว่า มี 10 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไคติเนสได้เพียงอย่างเดียว และอีก 19 ชนิด สามารถสังเคราะห์ได้ทั้งเอนไซม์ไคติเนส และไคโตไบเอส Osawa และ Koga (1995) ได้ทำการตรวจสอบแบคทีเรียที่ใช้ไคตินเป็นอาหารในแหล่งน้ำ 48 ชนิด ในประเทศญี่ปุ่น พบว่า มีแบคทีเรีย 6 ชนิด ที่สามารถผลิตทั้งเอนไซม์ไคติเนส และไคโตไบเอส และมีการใช้น้ำตาล NAG เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนด้วย

แหล่งเอนไซม์ไคติโนไลติกจากเชื้อรา โดยทำการศึกษาในกลุ่ม *Streptomyces* 41 ชนิด พบว่า ชนิด C-10 และ C-14 สามารถย่อยไคตินได้ดี (Reynolds, 1954) โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์ที่สังเคราะห์จากเชื้อรา จะรวมหรือปะปนอยู่ที่ผนังเซลล์หรือละลายอยู่ในส่วนของ vacuole, membrane-bound หรือ wall-bound ของเชื้อรา โดยมีทั้งเอนไซม์ไคติเนสและไคโตไบเอสที่พบได้จาก *Aspergillus indulans* (Bemasconi และคณะ, 1984)

### 1.2.2 บทบาทของเอนไซม์ไคติโนไลติก

จากการศึกษาเอนไซม์ไคติโนไลติกในสิ่งมีชีวิตทั่วไป พบว่า มีคุณสมบัติเป็น enzymological property และ immunological property ซึ่งมีบทบาท และหน้าที่ที่แตกต่างกันตามตำแหน่งที่พบ และชนิดของสิ่งมีชีวิตดังนี้

### 1.2.2.1 บทบาทเอนไซม์ไคติโนไลติกในสัตว์

เอนไซม์ไคติโนไลติกในสัตว์มีการผลิตในหลายตำแหน่งที่ต่างกักัน และทำหน้าที่แตกต่างกัน ตามแหล่งการกระจาย เช่น ในสัตว์กลุ่มอาร์โทรพอด พบเอนไซม์ไคติโนไลติกได้ใน molting fluid, haemolymph, alimentary canal และ integument ซึ่งมีบทบาททั้งการย่อยสลายอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนสารพวกไคตินที่เป็นส่วนประกอบของเปลือกนอก (exoskeleton) โดยทำหน้าที่ ย่อยสลายไคตินจากเปลือกนอกก่อนการลอกคราบให้อยู่ในรูปของ NAG แล้วมีการดูดกลับไปเก็บไว้ใน molting fluid สำหรับนำมาสร้างคราบใหม่ในครั้งต่อไป ซึ่งการทำงาน ใน molting fluid ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน ecdysteroid (Flach, *et al.*, 1992)

จากการศึกษาปริมาณเอนไซม์ไคติเนสและไคโตไบเอส ในเลือดของปลาเทอริบอทของ Malano และคณะ (1992) พบว่า มีเอนไซม์ทั้งสองชนิดในเม็ดเลือดขาวมากกว่าเม็ดเลือดแดงถึง 10 เท่า จึงกล่าวว่ เอนไซม์ไคติโนไลติกในเลือดทำหน้าที่เกี่ยวกับขบวนการต่อต้านเชื้อโรค โดยย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรคส่วนที่เป็นไคติน และทำหน้าที่เกี่ยวกับขบวนการย่อยสลายสารประกอบพวกไกลโคโปรตีน นอกจากนี้พบว่าในปลามีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสภายในไข่ ซึ่งสามารถชักนำให้มีการสังเคราะห์ได้ โดยการเพิ่มปริมาณอาหาร (Kono, *et al.*, 1987)

Escott และ Adams (1995) ทำการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก เม็ดเลือดขาวของมนุษย์พบว่ามีการกระจายโดยทั่วไป ส่วนใหญ่พบในเม็ดเลือดขาว ซึ่งพบมากที่สุด ในเม็ดเลือดขาวชนิดกรานูโลไซท์ มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านเชื้อโรคโดยทำหน้าที่ ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรค หรือส่วนที่เป็นไคติน

Godknecht และ Honegger (1991) ได้รายงานบทบาทของเอนไซม์ไคโตไบเอสในกระบวนการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงว่า เอนไซม์ไคโตไบเอสที่อยู่บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ของสเปิร์ม มีส่วนช่วยให้สเปิร์ม ยึดจับกับไข่ในกระบวนการปฏิสนธิ

จากการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก *Myrothecium verrucaria* พบว่ามีประสิทธิภาพในการย่อยคิวติเคิล (cuticle) ของตัวอ่อนของยุง *Aedes aegypti* ที่เป็นพาหะของโรคไข้เลือดออกทั้งในระยะที่ 1 และ 4 โดยทำให้ตัวอ่อนนั้นตายเร็วขึ้นกว่าเดิม ถึง 50 % (Mandonsa, *et al.*, 1996)

บทบาทของเอนไซม์ไคตินเนสในเชื้อพลาสโมเดียม (*Plasmodium gallinaceum*) จะหลั่งมาในรูปที่ยังไม่สามารถทำงานได้ก่อน และเมื่อได้รับการกระตุ้นจาก ทริปทีซิน ที่ถูกผลิตขึ้นมาจึงจะสามารถทำงานได้ ซึ่งจะย่อยสารเคลือบทางเดินอาหาร (peritrophic matrix) ทำให้สปอร์เข้าไปฝังตัวในเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร (gut epithelium) เพื่อการเจริญ และขยายพันธุ์ในยุง *Aedes aegypti* ซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้มาลาเรียในคน Shabuddin และคณะ (1996) ทำการศึกษากลไกการยับยั้งสารกระตุ้นทริปทีซินไม่ให้ทำงาน โดยใช้สาร antitrypsin ไปยับยั้งทริปทีซินไม่ให้กระตุ้นเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลทำให้สปอร์ของเชื้อพลาสโมเดียมไม่สามารถเข้าไปฝังตัว และเจริญ ในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารของยุงได้ เรียกสารดังกล่าวว่า antitrypsin antibody ซึ่งคาดว่า จะนำสาร antitrypsin antibody มาผลิตเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันโรคมาลาเรียในอนาคต

#### 1.2.2.2 บทบาทของเอนไซม์ไคติโนไลติกในพืช

จากการศึกษาเอนไซม์ไคติโนไลติกในพืช พบว่า มีคุณสมบัติเป็น immunological property ส่วนใหญ่มีการศึกษาเฉพาะเอนไซม์ไคตินเนส ซึ่งจะถูกสร้างขึ้น จากปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเซลล์ หลังจากการถูกกระตุ้นจากการบุกรุกของเชื้อโรค ส่วนใหญ่ จะพบเอนไซม์ไคตินเนสร่วมกับเอนไซม์  $\beta$ -1,3 กลูคาเนส โดยมีลักษณะการทำงานร่วมกัน แบบ synergistic เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค ในขณะที่ไคตินเนสจะย่อยสลาย พันธะไกลโคซิดิกในส่วนประกอบที่เป็นไคติน และเอนไซม์  $\beta$ -1,3 กลูคาเนส จะย่อยสลาย พันธะไกลโคซิดิกในส่วนที่เป็น  $\beta$ -1,3 กลูแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อโรค จากบทบาทที่สำคัญของเอนไซม์ดังกล่าว เอนไซม์ทั้งสองจึงถูกจัดเป็น PR-Protein (Legrand, et al., 1988) ซึ่งทำหน้าที่โดยตรงในการควบคุมทางชีวภาพ (Biological control)

#### 1.2.2.3 บทบาทของเอนไซม์ไคติโนไลติกในจุลินทรีย์

เอนไซม์ไคติโนไลติกชนิด exogenous ในแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญ ในการย่อยสลายอาหารโมเลกุลใหญ่ให้อยู่ในรูปที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ พบมากใน แบคทีเรียที่มีการเจริญเติบโตในบริเวณใต้ห้องทะเล หรือปลอเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ใช้ไคตินที่เกิดจากการลอกคราบของ crustacean เป็นแหล่งอาหาร จึงมีการหลั่งเอนไซม์ ไคติโนไลติกออกจากเซลล์ลงสู่แหล่งน้ำ เพื่อย่อยสลายไคตินให้อยู่ในรูปที่สามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์นำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนเพื่อการเจริญเติบโต จึงเรียกแบคทีเรียพวก นี้ว่าไคติโนไลติกแบคทีเรีย

ไคติโนไลติกแบคทีเรียแต่ละชนิดย่อยไคตินด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน ตามความต้องการคาร์บอนและไนโตรเจนไปใช้ประโยชน์ในรูปแบบที่แตกต่างกัน เอนไซม์ไคติโนไลติกส่วนมากจะย่อยไคตินโดยการย่อยหมู่อะซิติลเลท อะมิโน ซึ่งจะให้ผลผลิตเป็นกรดอะซิติค และแอมโมเนีย ส่วนไคติโนไลติกแบคทีเรียอีกหลายชนิดจะย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกระหว่างคาร์บอนกับออกซิเจน ในพันธะดังกล่าวให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (Zobell and Rittenberg, 1983 : Campbell and Williams, 1951)

บทบาทของเอนไซม์ไคติโนไลติกในเชื้อรา และยีสต์ จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญเติบโต โดยทำหน้าที่ในการแยกเซลล์ออกจากกันเมื่อมีการแบ่งเซลล์ (Flash, et al., 1992)

Latzko และ Hampel (1995) รายงานการศึกษาบทบาทของเอนไซม์ไคติโนไลติกที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ ใน *Azotobacter sp.* โดยทำการเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของ ผนังเซลล์ของยีสต์, ไมซีเลียมของเชื้อรา *Trichoderma reesei*, colloidal chitin, NAG และกลูโคซามีน พบว่า เอนไซม์ไคติโนไลติกสามารถทำงานได้อย่างรวดเร็วที่สุดในอาหารที่มีส่วนประกอบของผนังเซลล์ของยีสต์ นอกจากนี้ในการศึกษาปริมาณไคตินภายในเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า ไคตินส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบอยู่ในส่วน septal region กระจายไปถึงส่วนของผนังเซลล์ โดยมีลักษณะเป็นสายสั้น ๆ จับอยู่กับ  $\beta$  1-3 กลูแคน (Mol and Wessels., 1987 อ้างโดย Latzko และ Hampel, 1995)

#### 1.2.2.4 บทบาทของเอนไซม์ไคติโนไลติกต่อระบบนิเวศ

จากการศึกษาเอนไซม์ไคโตไบเอสในอาหารเลี้ยงแพลงค์ตอน (*Daphnia pullicar*) พบว่า แพลงค์ตอนคริสต์เซียก็มีการปล่อยเอนไซม์ไคติโนไลติกสู่แหล่งน้ำ เช่นเดียวกับแบคทีเรีย และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามขนาดของเซลล์ (Vrba. et al., 1994) จากบทบาทของเอนไซม์ไคติโนไลติกในแบคทีเรีย และส่วนที่ปล่อยมาจากพวกคริสต์เซีย ส่งผลต่อระบบนิเวศวิทยาในแหล่งน้ำในหลาย ๆ ด้านดังนี้

1) จากบทบาทของเอนไซม์ไคติโนไลติกที่สามารถย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ ให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ NAG ผลผลิตดังกล่าวมีความสำคัญต่อห่วงโซ่อาหารขั้นต้นของสิ่งมีชีวิตในท้องทะเล หรือแหล่งน้ำ เนื่องจากแพลงค์ตอนในแหล่งน้ำ เช่น

copepod ในทะเลใช้น้ำตาลดังกล่าวเป็นอาหาร (Hoppe.,1983) แพลงตอนที่เจริญเติบโตขึ้นก็จะเป็นอาหารของสัตว์น้ำในห่วงโซ่ถัดไป และสุดท้ายจะมาเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์

2) จากบทบาทการเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง และมีการหมุนเวียนสารให้นำไปใช้ประโยชน์ได้ของเอนไซม์ไคติโนไลติกนั้น ส่งผลต่อระบบนิเวศวิทยาโดยทางอ้อม คือเป็นการกำจัดอินทรีย์สารที่มีปริมาณมาก ไม่ให้ทับถมในท้องทะเลทำให้เกิดการตื่นเขิน และการนำเสียของน้ำจากไคตินที่ปล่อยมาจากการลอกคราบของ crustacean ที่มีปริมาณมากมายมหาศาล (Zobell and Rittenberg,1983)

### 1.2.3. เอนไซม์ไคติเนส

เอนไซม์ไคติเนสที่พบโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ endo-chitinase และ exo-chitinase โดยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด จะมีการทำงานที่แตกต่างกัน exo-chitinase จะทำการย่อยสลายไคตินจากปลาย non-reducing และให้หน่วย diacetylchitobiose เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ endo-chitinase จะย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก ( $\beta$ -1-->4 glycosidic) ภายในโมเลกุลของไคตินแบบสุ่ม (Overdijk and Vansteijn.,1995)

Linsay และ Gooday (1985) ได้เสนอว่าการที่จะจำแนกชนิดของเอนไซม์ไคติเนสว่าเป็น exo หรือ endo-chitinase นั้นขึ้นอยู่กับการกระทำต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์เป็นหลัก เนื่องจากไคตินในธรรมชาตินั้นจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น ในแมลงองค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็นไคตินที่อยู่ร่วมกับโปรตีน หรือผนังเซลล์ของเชื้อรา ก็จะมีไคตินที่อยู่ร่วมกับโปรตีนและกลูแคน แต่การทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะมีผลกระทำอย่างจำเพาะเจาะจงต่อพันธะระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ NAG สองหน่วยย่อยที่ติดกันในเฉพาะสายไคตินเท่านั้น (Jolles, et al.,1984)

#### 1.2.3.1 การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส

สารตั้งต้นของเอนไซม์ไคติเนส คือไคติน ซึ่งในธรรมชาติไม่ละลายน้ำ หรือในตัวทำละลายทั่วไป จึงมีความยุ่งยากในการหาค่าความว่องไว เนื่องจากโครงสร้างภายในโมเลกุลจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนทั้งภายในและภายนอกทำให้ไคตินจับกันแน่น จนไม่สามารถละลายน้ำได้ มีผลให้การย่อยไคตินเกิดขึ้นได้ช้ามาก ดังนั้น การนำสารที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไคติน เช่น colloidal chitin หรือ regenerate chitin มาใช้เป็นสารตั้งต้นทำให้เอนไซม์ไคติเนสทำงานได้ดีกว่าไคตินในรูปธรรมชาติ (Malano, et al.,1979)



สารตั้งต้นอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้คือ glycol chitin เป็นไคติน ที่มีหมู่ hydroxyl มาจับตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของ NAG แทน การที่มีสารตั้งต้นหลากหลายในการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส จึงเป็นการยากที่จะเปรียบเทียบค่าความว่องไวของเอนไซม์ในแต่ละการทดลอง (Aribisala and Gooday.,1978 อ้างโดย Cabib,1987) มีรายงานการใช้ 3,4-dinitrophenyl-tetra-N-acetylglucosamine เป็นสารตั้งต้นด้วย อย่างไรก็ตามวิธีนี้ข้อเสียของสารตั้งต้นนี้คือ ความยาวของสายไซลันเกินไปที่จะทำให้ endo-chitinase ย่อยได้ และยังเป็นสารตั้งต้นของไคโตไบเอสด้วย (Stirling, et al.,1979 อ้างโดย Cabib,1987)

นอกจากนี้ O'Brien และคณะ (1987) ได้ศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรีย 101 ชนิด จากสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยหลักการเรืองแสงของสารตั้งต้น 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamininide เมื่อรวมกับแบคทีเรียที่ต้องการศึกษา ซึ่งแม้ว่าวิธีดังกล่าวจะมีความว่องไวต่อไคโตไบเอสมากกว่าไคติเนส แต่ก็สามารถใช้เป็นวิธีการทางอ้อมในการตรวจสอบไคติเนส เพราะแบคทีเรียที่ผลิตไคโตไบเอสส่วนใหญ่จะผลิตไคติเนสด้วย

หลักในการหาค่าความว่องไวของไคติเนสโดยทั่วไปมี 2 แบบ คือ ในแบบแรกวัดอัตราการลดลงของสารตั้งต้น ตัวอย่างเช่น วัดการเปลี่ยนแปลงความหนืดของ glycol chitin หลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนส วิธีนี้มีข้อเสียคือ ถ้าไคติเนสย่อย glycol chitin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ละลายได้จนถึงบริเวณที่อยู่ใกล้กับส่วนกลางของสายไซ ความไวของปฏิกิริยาจะลดลง สำหรับการวัดแบบที่ 2 คือ วัดอัตราการเพิ่มของผลผลิตจากการทำงานของไคติเนส ผลผลิตที่นิยมวัดด้วยหลักการนี้คือ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคตินด้วยวิธีการเทียบสี (colorimetric method) แต่มีข้อเสียคือ เป็นวิธีที่มีความไวต่ำ (sensitivity) ถ้าโกลิโกแซคคาไรด์นั้นมีขนาดใหญ่ ผลผลิตอีกชนิดหนึ่งที่สามารถวัดได้โดยการเทียบสี คือ การวัดปริมาณของ NAG โดยเกิดจากการทำปฏิกิริยากับ *p* - dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) เกิดเป็นสารละลายที่มีสีจำเพาะที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 585 นาโนเมตร ข้อเสียของวิธีการนี้คือ ถ้าคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ NAG มี side chain จะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะให้มีสีได้ นอกจากนี้ ไคติเนสเองก็ไม่สามารถย่อยสารตั้งต้นให้เป็น NAG อีสระได้ ถ้าไม่มีไคโตไบเอสร่วมด้วย (Cabib,1987)

จากการศึกษาการใช้ไคตินจากธรรมชาติที่เตรียมจากกระดองของปลาหมึก นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ไคติเนสพบว่า จะมีความไวของปฏิกิริยาสูงกว่าการใช้ไคตินจากธรรมชาติในแหล่งอื่น (ประสาท ศรประสิทธิ์, 2540)

นอกจากวิธีข้างต้นแล้ว ยังมีรายงานการตรวจหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้ tritiated chitin โดยเตรียมจาก reacetlyate ไคโตแซนซึ่งติดฉลากด้วย  $^3\text{H}$ -acetic anhydride และทำการวัด radioactivity ที่เกิดขึ้นของผลผลิต หรือที่หายไปของสารตั้งต้น วิธีนี้ถือว่าเป็นวิธีการที่ให้ผลดีที่สุด ทั้งในแง่ความไว และ specificity ของวิธีการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส (Malano, et al., 1979)

### 1.2.3.2 วิธีการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ไคติเนส

การแยกเอนไซม์ไคติเนสให้บริสุทธิ์จากโปรตีนอื่น ๆ มีหลักการเช่นเดียวกันกับการแยกโปรตีนอื่นโดยทั่วไป โดยอาจจะเริ่มต้นจากการนำสารตัวอย่างมาทำการกำจัดสารชีวโมเลกุลขนาดเล็ก โดยไดอะไลซิส (dialysis) การตกตะกอนตามลำดับส่วน (fractionated precipitation) ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ ultrafiltration (Thomas, 1990) จากนั้นจึงนำสารที่ได้ไปแยกให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี (chromatography) เช่น แบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange) และ เจลฟิลเตรชัน (gel filtration) เป็นต้น เช่น จากการศึกษาของ Yabuki และคณะ (1986) การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไคติเนสและไคโตไบเอส จากแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* sub sp. *Anarogene* A-52 โดยใช้วิธีการ การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมที่ 80 % และสามารถแยกเอนไซม์ไคติเนสออกจากเอนไซม์ไคโตไบเอส และโปรตีนชนิดอื่นได้ด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้ไคตินเป็นตัวดูดซับ (adsorption) และตามด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM-sephadex C-50) พบว่า ได้เอนไซม์กลับคืนมาร้อยละ 34.8 ของสารเริ่มต้น

Kono, et al., (1990) รายงานว่าการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไคติเนส จากตับอ่อน (hepatopancrease) ของกุ้ง *Peneaus japonicus* โดยใช้วิธีการการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0 ถึง 65 %, เจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี (sephadex G-100) และโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM-cellulose) ตามลำดับ พบว่าได้เอนไซม์ร้อยละ 20.9 ของสารเริ่มต้น และมีความบริสุทธิ์ 61.3 เท่า

Ulhoa และ Peberdy (1992) รายงานการแยกให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไคตินเนสจากเชื้อรา *Trichoderma hazinaum* โดยใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 75 %, โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Q-Sepharose), เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (Sephadex G-100 ) และ affinity chromatography (Sepharose CL4B) ตามลำดับ พบว่าได้เอนไซม์กลับคืนมาร้อยละ 10 ของสารเริ่มต้น และมีความบริสุทธิ์ 76 เท่า

Chen และคณะ (1997) ศึกษาวิธีการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไคตินเนสจาก *Cellomonas flavigena* NTOU 1 โดยใช้วิธีการ โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Q-cariladge), และ เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (Sephadex 75 HR) ตามลำดับ พบว่าได้เอนไซม์กลับคืนมาร้อยละ 5.64 ของสารเริ่มต้นและมีความบริสุทธิ์ 21.7 เท่า

การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ไคตินเนสจากเชื้อ *Aromonas* sp. CS-34 ในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีวเคมีของ เซาเนียร์ บุญช่วย (2539) โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE-Sepharcel) และ เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (Sephadex G-100 , G-200) พบว่าได้เอนไซม์กลับคืนมาร้อยละ 0.035 และมีความบริสุทธิ์ 7.234 เท่า

### 1.2.3.3 คุณสมบัติทางด้านกายภาพและเคมีของเอนไซม์ไคตินเนส

#### 1) น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไคตินเนส

เอนไซม์ไคตินเนสในสิ่งมีชีวิตที่แยกบริสุทธิ์จากหลาย ๆ แหล่ง มีความหลากหลายของน้ำหนักโมเลกุลอย่างมากมาดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.2 โดยเฉพาะเอนไซม์ไคตินเนสจากแบคทีเรียพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 5,200-115,000 Da และแบคทีเรียบางสายพันธุ์ก็สามารถที่จะผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้หลายไอโซไซม์ ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Watanabe และคณะ (1990) พบว่า *Bacillus circulans* WL-12 สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ถึง 5 ไอโซไซม์ คือขนาดโมเลกุล 38,000, 39,000, 52,000, 69,000 และ 74,000 Da *Streptomyces olivaceoviridis* สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ 5 ไอโซไซม์ที่มีขนาดโมเลกุล 20,500, 30,000, 47,000, 70,000 และ 92,000 Da (Romaguera, et.al.,1992) และ *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ 4 ไอโซไซม์ (Tsujiibo, et.al., 1993) เป็นต้น

ส่วนเอนไซม์ไคตินเนสที่ทำปฏิกิริยาได้จากพืชและสัตว์ขนาดน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไม่มากนักโดยน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไคตินเนสจากสัตว์จะอยู่ในช่วง 14,000-75,000 Da เช่น ใน Lobster : *Homarus americaus* 66,000 Da (Lynn, et al.,1990), Liver prawn : *Penaeus japonicus* 37,000 Da (Kono,et al.,1990), Red sea bream 46,000 Da และจากการศึกษาของ Escott และ Adams (1996) พบว่าเอนไซม์ไคตินเนสในเลือดมนุษย์มีน้ำหนักโมเลกุล 48,000 และ 14,000 Da ในเม็ดเลือดขาวและในไลโซซิมตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ไคตินเนสในพืชมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 30,000-66,000 Da เช่น *Hevia brazillensis latex* 29,000 Da (Roziboom, et al.,1990), *Arabidopsis thallana* 32,000 Da (Verburg and Huynh,1991), Maize seed 28,000 Da (Huynh, et al.,1992), Chickpea (*Cicer aretinum*) : 27,00 และ 30,000 Da ในฝัก และในส่วนใบตามลำดับ (Nehra, et al.,1994), *Lupinus albus* 36,000 Da (Regalado and Ricardo,1996) และในCotton :*Gossypium hisutum* 28,000 Da (Hudspeth, et al.,1996) เป็นต้น

## 2) จลนศาสตร์ของเอนไซม์ไคตินเนส

เอนไซม์ไคตินเนสมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิดในกลุ่มของไคติน และอนุพันธ์ของไคติน และมีค่า  $K_m$  ต่อสารตั้งต้นแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น Abdel-Naby และคณะ (1992) รายงานว่าค่า  $K_m$  ของเอนไซม์ไคตินเนสจาก *Aspergillus carneus* เท่ากับ 4.37 mM การศึกษาของ Yabuki และคณะ (1986) ค่า  $K_m$  ของเอนไซม์ไคตินเนส *Aeromonas hydrophilla* sub sp. *anaerogenes* A. 52 เท่ากับ 2.8 มก./มล. และจาก *Candida albicans* มีค่า 3.9 มก./มล. (Dickinson, et al., 1989) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาค่า  $K_m$  ของเอนไซม์ไคตินเนสจาก *Trichoderma hazianum* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มี 3 ไฮโซไซม์ โดยใช้ collidal chitin เป็นสารตั้งต้นจะมีค่า  $K_m$  เป็น 0.3 , 1.0 และ 0.5 มก./มล. ตามลำดับ (De-La-Cruz,et al.,1992) ค่า  $K_m$  ของเอนไซม์ไคตินเนสจาก *Aromonas* sp. CS-34 40 °ซ เท่ากับ 1.66 มก./มล. (เขาวนัพร บุญชาย, 2539) และการศึกษาค่า  $K_m$  ของเอนไซม์ไคตินเนสจาก *Streptomyces* sp. S-84 โดยใช้ 4-MU-disaccharide และ 4-MU-trisaccharide เป็นสารตั้งต้น พบว่า มีค่าเป็น 49 และ 14 mM. ตามลำดับ (Ueno, et al., 1990) ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.2 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โคติเนสจากแหล่งต่าง ๆ

| แหล่ง  | น้ำหนักโมเลกุล (Da)                       | อ้างอิง                         |
|--|---|---------------------------------|
| Animal   |   |                                 |
| Hom worm: <i>Meduca sexta</i> I                    | 75,000 <sup>d</sup>                       | Koga, <i>et al.</i> , 1983*     |
| II   | 62,000 <sup>d</sup>                       | Koga, <i>et al.</i> , 1983*     |
| III  | 50,000 <sup>d</sup>                       | Koga, <i>et al.</i> , 1983*     |
| Spider ( <i>Cupinnus salei</i> )                   | 48,000 <sup>d</sup>                       | Momsen, 1980*                   |
| Stable fly ( <i>Stomoxys calcitrans</i> )          | 48,000 <sup>d</sup>                       | Chen, <i>et al.</i> , 1982      |
| Lobster ( <i>Homarus americana</i> )               | 66,00 <sup>d</sup>                        | Lymn, <i>et al.</i> , 1990      |
| Hepatopancrease **<br>( <i>Penaeus japonicus</i> ) | 37,000 <sup>d</sup>                       | Kono, <i>et al.</i> , 1990      |
| Red sea bream                                      | 46,000 <sup>d</sup>                       | Flash, <i>et al.</i> , 1991     |
| Calf serum   | 47,000 <sup>a</sup>                       | Lundblan, <i>et al.</i> , 1979* |
| Human : granulocyte                                | 48,000 <sup>b</sup> , 48,000 <sup>d</sup> | Escott and Adams., 1996         |
| : Lysozyme   | 14,000 <sup>d</sup>                       |                                 |
| Plants   |   |                                 |
| <i>Hevia braziliensis</i> latex                    | 29,000 <sup>d</sup>                       | Roziboom, <i>et al.</i> , 1990  |
| <i>Arabidopsis thaliana</i>                        | 32,000 <sup>d</sup>                       | Verburg and Huynh, 1991         |
| Maize seed   | 28,000 <sup>d</sup>                       | Huynh, <i>et al.</i> , 1992     |
| Chikpea ( <i>Cicer aretinum</i> ) : pod            | 27,000 <sup>d</sup>                       | Nehra, <i>et al.</i> , 1994     |
| : leaf   | 30,000 <sup>d</sup>                       |                                 |
| <i>Lupinus albus</i>                               | 36,000                                    | Regalado and<br>Ricardo, 1996   |
| Cotton ( <i>Gossypium hisutum</i> )                | 28,000                                    | Hudspeth, <i>et al.</i> , 1996  |

\* อ้างอิงโดย Cabib (1987)

\*\* จากเอกสารต้นฉบับใช้คำว่า Liver

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

| แหล่ง                              | น้ำหนักโมเลกุล (Da)                         | อ้างอิง                         |
|------------------------------------|---|---------------------------------|
| Bateria                            |   |                                 |
| <i>Aeromonas sp.</i> 10s-24        | 114,000 <sup>a</sup> , 115,000 <sup>b</sup> | Ueda and Arai., 1992            |
| <i>Aeromonas sp.</i> strain 0-7    | 70,000 <sup>d</sup>                         | Tsujibo, <i>et al.</i> ,1992    |
| <i>Streptomyces erthraeus</i>      | 30,000 <sup>d</sup>                         | Tsujibo, <i>et al.</i> ,1992    |
| <i>Streptomyces sp.</i> 9463       | 43,700, 44,500 <sup>d</sup>                 | Wang, <i>et al.</i> ,1993       |
| <i>Bacillus stearothermophilus</i> | 74,000 <sup>d</sup>                         | Sakai, <i>et al.</i> ,1994      |
| CH -34                             |   |                                 |
| <i>Cellomonas flavigen</i>         | 34,200 <sup>b</sup> ,32,500 <sup>b</sup>    | Chen, <i>et al.</i> ,1997       |
| NTOU1                              |   |                                 |
| Fungi                              |   |                                 |
| <i>Aspergillus nidulans</i>        | 27,000 <sup>d</sup>                         | Reyes. <i>et al.</i> ,1989      |
| <i>Metarhizium anisopliae</i>      | 33,000 <sup>d</sup>                         | St. Leger, <i>et al.</i> ,1991  |
| <i>Trichoderma hazlanum</i>        | 44,500 <sup>d</sup> , 46,500 <sup>b</sup>   | Ulhoa and Peberdy.,1991         |
| <i>Aspergillus carneus</i>         | 25,000 <sup>d</sup>                         | Abdel-Naby, <i>et al.</i> ,1992 |
| <i>Myrothecium verurcaria</i>      | 30,000 <sup>d</sup>                         | Vyas, <i>et al.</i> ,1993       |
| <i>Tricoderma hazinum strain</i>   | 41,000 <sup>a</sup>                         | Hamman, <i>et al.</i> ,1993     |
| p-1                                |   |                                 |

<sup>a</sup> = วิเคราะห์โดย sedimentation analysis

<sup>b</sup> = วิเคราะห์โดย gel filtration

<sup>d</sup> = วิเคราะห์โดย SDS - PAGE

ตารางที่ 1.3 ตารางแสดงค่า  $K_m$  และ ของเอนไซม์ไคตินเนสจากแหล่งต่าง ๆ

| แหล่ง  | สารตั้งต้น               | $K_m$                 | อ้างอิง                    |
|--|--------------------------|-----------------------|----------------------------|
| <i>Drosophilla hydei</i>   | chitin                   | 5 มก./มล.             | Spindler.,1976             |
| <i>Aeromonase hydrophila</i><br>sub sp.<br><i>anaerogenes</i> A.52 | chitin                   | 2.8 มก./มล.           | Yabuki,et al.,1986         |
| <i>Streptomyces</i> sp. S-8  | 4-MU-<br>disaccharide    | 49 mM                 | Ueno, et al.,1990          |
|  | 4-MU-<br>trisaccharide   | 14 mM                 | Ueno, et al.,1990          |
| <i>Trichoderma hazianum</i> I                                      | colloidal chitin         | 0.3 มก./มล.           | De-La-Cruzet<br>al.,1992   |
|  | II colloidal chitin      | 1.0.มก./มล.           | De-La-Cruzet<br>al.,1992   |
|  | III colloidal chitin     | 0.5 มก./มล.           | De-La-Cruz, et<br>al.,1992 |
| <i>Aspergillus carneus</i>   |                          | 4.34 mM               | Abdel-Naby,<br>et,al.,1992 |
| <i>Streptomyces</i><br><i>antibloticus</i>                         | chitin                   | 0.01-0.011<br>g/100ml | Flash, et al.,1992         |
| Chick pea<br>( <i>Cicer Arictinum</i> L.)                          | chitin                   | 0.65 มก./มล.          | Nehra,et al.,1994          |
| <i>Aeromonas</i> sp.cs-34  | colloidal chitin         | 1.66 มก./มล.          | เชาวนีพร บุญช่วย.,<br>2539 |
| <i>Cellumonas flavigena</i><br>NTOU 1                              | 4-MU<br>diaceylcitobiose | 0.15 mM               | Chen, et al., 1997         |

### 1.2.3.4 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์ โคติเนส

ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โคติเนสขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ หลายประการ เช่น pH อุณหภูมิ ความคงสภาพของเอนไซม์ รวมทั้งอิออนและสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ ผลของปัจจัยเหล่านี้ต่อการทำงานของเอนไซม์โคติเนสได้แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

#### 1) ผลของ pH ต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส

pH เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์มากโดย พบว่าเอนไซม์โคติเนสจากจุลินทรีย์บางชนิดจะมีความทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เหมาะสมเป็นกลาง เช่น *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anaerogenes* A52 pH 7.0 (Yabuki, et al., 1986), และ *Streptomyces* sp. S-84 B pH 6.3-6.8 (Ueno, et al., 1990) หรือบางพวกทำงานในช่วง pH ที่ต่ำลงไปค่อนข้างมาก เช่น *Streptomyces erythracus* pH 5.0 (Hara, et al., 1989), *Metarhizium anisopliae* pH 5.3 (St-Legar, et al., 1991), *Bacillus amyloliquefaciens* pH 5.5-5.9 (El-Assar, et al., 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์โคติเนสจากจุลินทรีย์บางชนิดจะทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกรดมากเช่น *Streptomyces* sp. S-84 A pH 3.4-4.2 (Ueno, et al., 1990), *Trichoderma hazianum* pH 4.0 (De-La-Cruz, et al., 1992), *Aeromonas* sp. No. 10S-24 pH 4.0 (Ueda, et al., 1992) และเอนไซม์โคติเนสจากจุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถทำงานได้ดีที่ pH ในช่วงต่าง เช่น *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 pH 8.0-10.0 (Tsujiibo, et al., 1993) และในเชื้อ *Aeromonas* sp. CS-34 pH 7.0 มีค่าความเสถียรช่วง pH 5.0 -8.0 (เชาวนิพร บุญช่วย, 2539) เป็นต้น ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.4

#### 2) ผลของอุณหภูมิต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์ ส่วนใหญ่แล้วอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการการทำงานของเอนไซม์โคติเนสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 40-50 °C เช่น *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anaerogenes* A-52 45 °C (Yabuki, et al., 1986), *Bacillus amyloliquefaciens* 45 °C (El-Assar, et al., 1992), *Aeromonas* sp. 10s-24 50 °C (Ueda, et al., 1992), *Aeromonas* sp. strain



0-7 50 °ซ (Tsujiho, *et al.*,1992), *Aspergillus carneus* 50 °ซ (Abdel-Naby, *et al.*,1992), และในเชื้อ *Aeromonas sp.* CS-34 40 °ซ (เขานีพร บุญชาย, 2539) ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 แสดงผลของ pH และอุณหภูมิต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส

| แหล่ง  | pH      |          | Temp. (°C) |        | อ้างอิง                         |
|--|---------|----------|------------|--------|---------------------------------|
|  | Optimum | Stable   | Optimum    | Stable |                                 |
| <b>Animals</b>                                     |         |          |            |        |                                 |
| <i>Penaeus japonicus</i>                           | 6.85    | 5.0-8.0  | 50         | <70    | Kono, <i>et al.</i> , 1990      |
| <b>Plants</b>                                      |         |          |            |        |                                 |
| Chick pea ( <i>Cicer Arictinum L.</i> )            | 5.0     | -        | 37         | -      | Nehra, <i>et al.</i> , 1994     |
| <b>Microorganism</b>                               |         |          |            |        |                                 |
| <i>Aromonas hydrophila</i> sub sp. anarogenes A-52 | 7.0     | 6.0-9.0  | 45         | <55    | Yabuki, <i>et al.</i> , 1986    |
| <i>Trichoderma hazianum</i>                        | 4.0-4.5 | 4.0-7.0  | 40         | <35    | Ulhoa และ Peberty,1992          |
| <i>Aeromonas sp.strain</i> 0-7                     | 8.0     | 5.0-10.0 | 50         | 40     | Tsujiho, <i>et al.</i> , 1992   |
| <i>Asspergillus carneus</i>                        | 5.2     | 3.0-9.0  | 50         | <70    | Abdel-Naby, <i>et al.</i> ,1992 |
| <i>Aeromonas sp.</i> 10s-24                        | 4.0     | 4.0-9.0  | 50         | <45    | Ueda and Arai., 1992            |
| <i>Aeromonas sp.</i> CS-34                         | 7.0     | 5.0-8.0  | 50         | 40     | เขานีพร บุญชาย., 2539           |
| <i>Cellulomonas flavigina</i>                      | 10.0    | 6.0-10   | 50         | 45     | Chen, <i>et al.</i> , 1997      |

### 3) ผลของอิออนโลหะและสารประกอบอินทรีย์บางชนิดต่อ ค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส

อิออนและสารเคมีต่าง ๆ มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โคติเนส ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1.5 ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ที่แยกจากจุลินทรีย์พวก *Streptomyces* sp. S-84 (Ueno, et al., 1990), *Vibrio* sp. (Ontakara, 1979), *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (Tsujiibo, et al., 1993) ต้องการ  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  และ  $\text{Mg}^{2+}$  ในการกระตุ้นให้ทำงานได้ดีขึ้น ในขณะที่  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$  และ  $\text{Cu}^{2+}$  มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคติเนส ส่วนใน *Alteromonas* sp. strain 0-7  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  และ  $\text{Zn}^{2+}$  จะยับยั้งค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส (Tsujiibo, et al., 1992)

#### สารประกอบอินทรีย์ที่มีผลต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์

โคติเนส เช่น *p*-chloromercuribenzoic acid, monoiodoacetate, *N*-bromosuccinimide, 2-hydroxynitrobenzyl bromide, *N*-ethyl-5-phenylisoxazolium-3-sulfonate, phosphate, arsenate โดยมีผลยับยั้งค่าความว่องไวของของเอนไซม์โคติเนสจาก *Aeromonas hydrophilla* sub sp. *anaerogenes* A-52 (Yabuki, et al., 1986), *Alteromonas* sp. 0-7 (Tsujiibo, et al., 1992), *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (Tsujiibo, et al., 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบอินทรีย์บางตัวมีผลกระตุ้นค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสได้ เช่น Serum albumin (Tracy 1995 อ้างโดย Cabib, 1987), salicylate (Nasser, et al., 1990) และ dimyristoyl phosphatidylcholine (Humphreys, et al., 1984) เป็นต้น

ตารางที่ 1.5 ผลของอิออนโลหะ และสารประกอบบางชนิดต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส

| แหล่ง                            | อิออน                               |  | สารเคมี  | อ้างอิง                          |
|----------------------------------|-------------------------------------|--|--|----------------------------------|
|                                  | ตัวกระตุ้น                          | ตัวยับยั้ง   |  |                                  |
| <i>Aeromonas sp.</i> strain 0-7  | -                                   | Hg <sup>+</sup>  | Phosphate asenate ion,<br>N-ethylmercuribenzoate | Yubuki, <i>et al.</i> , 1986     |
| <i>Aeromonas sp.</i> 10s-24      | -                                   | Ag <sup>2+</sup>   | Iodoacetic, monoiodoacetic,                      | Ureda and Arai., 1992            |
| <i>Aspergillus carneus</i>       | Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> | Hg <sup>2+</sup>   | p-chlormercuribenzoate                           | Abdel-Naby, <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Aspergillus nidulans</i>      | -                                   | Ca <sup>2+</sup> , Hg <sup>2+</sup>                        | -  | Reyes, <i>et al.</i> , 1989      |
| <i>Bacillus amyloliqueficans</i> | -                                   | Co, Zn <sup>2+</sup>                                       | -  | El-Aslar, <i>et al.</i> , 1992   |
| <i>Peneaus japonicus</i>         | -                                   | Cu <sup>2+</sup> , Ag <sup>2+</sup>                        | -  | Kono, <i>et al.</i> , 1990       |
| <i>Trichoderma hazianum</i>      | -                                   | HgCl <sub>2</sub><br>ZnCl <sub>2</sub><br>Zn <sup>2+</sup> | -  | Ulhoa and Peberly., 1992         |
| <i>Cellulomonas flavigna</i>     | Na <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> | Fe <sup>3+</sup> , Hg <sup>2+</sup>                        | N-etylmaleimide, monoiodoacetic,                 | Chen, <i>et al.</i> , 1997       |
| NTOU1                            | Mg <sup>2+</sup>                    |  | β-mercaptoethanol                                |                                  |

### 1.2.4 เอนไซม์ไคโตไบเอส

ไคโตไบเอสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ไคตินไคติโนไลติก ซึ่งสามารถเร่งสลายพันธะไกลโคซิดิก ( $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 glycosidic) ของไคโตไบโอสให้เป็น NAG 2 โมเลกุล (Shaikh and Deshpande.,1993) มีชื่อรหัสตามการจัดตั้งของ Union of Biochemistry Nomenclature Committee (1984) ว่า EC 3.2.1.29 ได้มีการค้นพบครั้งแรก โดย Helferich และ Iloff (อ้างโดย Linker, *et al.*,1955) มีชื่อเรียกว่าเอนไซม์ exosaminidase

รายงานยุคก่อน ๆ นิยมเรียกเอนไซม์ไคโตไบเอสว่าเอนไซม์  $\beta$ -N-acetyl exosaminidase (EC 3.2.1.30) เนื่องจากเอนไซม์ไคโตไบเอสที่นักวิทยาศาสตร์เตรียมได้ นั้นไม่ได้แสดงความจำเพาะต่อน้ำตาล NAG เพียงอย่างเดียวแต่แสดงความจำเพาะต่อน้ำตาล  $\beta$ -N-acetylgalactosamine ซึ่งเป็นน้ำตาล Hexose ในสายโพลิไกลิโคแซคคาไรด์ด้วย

เอนไซม์ไคโตไบเอสแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามรูปแบบการเร่งของปฏิกิริยา คือ Endo - chitinase และ Exo-chitinase โดย Exo-chitinase ทำหน้าที่ตัดสายโพลิไกลิโคแซคคาไรด์ที่พันธะไกลโคซิดิก จากปลาย non-reducing sugar เข้ามาทีละหน่วย ได้ผลผลิตเป็น NAG ส่วน Endo-chitinase จะตัดสายโพลิไกลิโคแซคคาไรด์ที่พันธะระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลแบบสุ่ม

จากการศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide (*p*-NAG) ด้วยเอนไซม์ไคโตไบเอสจาก *Serratia marcescens* ในเบื้องต้นพบว่า การย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกในสายโพลิไกลิโคแซคคาไรด์ได้ต้องมีหมู่อะซิติลตรงคาร์บอนตำแหน่งที่สองของ non - reducing sugar ส่วนปลายเท่านั้น และปฏิกิริยานี้จะถูกยับยั้งด้วย โพลิไกลิโคแซคคาไรด์ที่ขาดหมู่อะซิติล ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่สองของ non - reducing sugar ส่วนปลาย ซึ่งเป็นโพลิไกลิโคแซคคาไรด์ที่มี NAG 2-5 โมเลกุล (Drouillard, *et al.*,1995 )

#### 1.2.4.1 การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคโตไบเอส

การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคโตไบเอสด้วยวิธีการเทียบสี โดยทั่วไปใช้ *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-glucosaminide เป็นสับสเตรท โดยอาศัยหลักการวัดผลผลิตที่เกิดจาก การทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสโดยตรง โดยจะให้ผลผลิตสุดท้ายเป็น *p*-nitrophenol ซึ่งจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 400 - 420 นาโนเมตร

#### 1.2.4.2 วิธีการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์โคโตไบเอส

การแยกเอนไซม์โคโตไบเอสให้บริสุทธิ์จากโปรตีนอื่น มีหลักการเหมือนกับการแยกโปรตีนอื่นดังที่กล่าวในข้อ 1.2.3.2 เช่น การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์โคโตไบเอสจากหอย *Helicella ericetorum* Muller โดยใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมที่ 30 ถึง 50 %, วิธีโครมาโตกราฟีเจลฟิวเทรชั่น (Sephadex G - 150 ) ตามด้วย sephadex G - 200 และ Isoelectric focusing chromatography พบว่าได้ ปริมาณเอนไซม์ เท่ากับ 15 % และ ให้ความบริสุทธิ์ถึง 309 เท่า (Calvo, et al., 1978)

จากการศึกษาของ Yabuki และคณะ (1986) การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอส จากเชื้อ *Aeromonas hydrophila* subsp. *anarogene* A - 52 . โดยใช้วิธีการ การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมที่ 80 % และแยกเอนไซม์โคติเนส ออกด้วยวิธี affinity chromatography โดยใช้โคตินเป็นตัวดูดซับ ( adsorption) หลังจากนั้นการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์โคโตไบเอสด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (CM -cellulose) ตามด้วย DEAE-sephadex A -50 พบว่า ให้ความบริสุทธิ์ 15.6 %

การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์โคโตไบเอส จากตับอ่อนของกุ้งลายเสือ (*Peneaus japonicus*) โดยใช้วิธีการการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมที่ 70 % , (Sephadex G - 100 ) hydroxylapatite chromatography และ โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE- cellofine) ตามด้วย DEAE- cellofine ตามลำดับ พบว่าได้ปริมาณเอนไซม์ เท่ากับ 15 % และ ให้ความบริสุทธิ์ถึง 699 เท่า (Koga, et al, 1996)

การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์โคติเนสจากเชื้อ *Aeromonas* sp. CS-34 วรรณนา นงษา (2538) โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE-cellulose) และเจลฟิวเทรชั่น (Sephadex G-100) พบว่าได้ปริมาณเอนไซม์ เท่ากับ 21.7 % และ ให้ความบริสุทธิ์ถึง 12.2 เท่า

#### 1.2.4.3 คุณสมบัติทางด้านกายภาพและทางด้านเคมีของเอนไซม์โคโตไบเอส

1) น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โคโตไบเอสที่พบในสิ่งมีชีวิตทั่วไปมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันตั้งแต่ มากกว่า 10,000 ถึง 240,000 Da ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1.6 ส่วนใหญ่มีการศึกษากันมากในสัตว์ และในกลุ่มพวกจุลินทรีย์

เอนไซม์โคโตไบเอสในแบคทีเรีย จาก *Streptomyces griseus* มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุด 23,500 Da (Tarentino and Maley,1994) และใน *Trichoderma hazianum* มีค่าสูงสุด 118,000 Da ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 64,000 Da (Ulhoa and Peberdy.,1991) ในสัตว์ชั้นสูง Kurunda และ Arosón (1986) รายงานว่าจากการศึกษาในตับหนูมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 37,000 Da *Helicella cricetorum* 120,000 Da (Calvo, et al.,1978), Rat liver 37,000 Da (Kurunda and Arosón,1986 ), Carp blood 240,000 Da (Ueno,et al,1987), America lobster (*Homarus amaricanus*) 116,000 Da (Lynn,1987), จากการศึกษาเอนไซม์โคโตไบเอสในตับอ่อนกุ้งลายเสือ (*Penaeus japonicus*) ของ Koga และคณะ (1996) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 110,000 Da ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (sub unit) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยละ 64,000 Da

ในพืชจากการศึกษาในยางพารา *Hevea brasillensis* มีน้ำหนักโมเลกุล 92,000 Da ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (sub unit) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลหน่วยละ 46,000 Da (Giordani, et al.,1992) เป็นต้น

ตารางที่ 1.6 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โคโตไบเอสจากแหล่งต่าง ๆ

| แหล่ง                       | น้ำหนักโมเลกุล<br>(Da)                     | อ้างอิง                  |
|-----------------------------|--|--------------------------|
| Animals                     |  |                          |
| <i>Helicella cricetorum</i> | 120,000 <sup>d</sup>                       | Calvo, et al.,1978       |
| Rat liver                   | 37,000 <sup>d</sup>                        | Kurunda and Arosón,1986  |
| America lobster             | 116,000 <sup>d</sup>                       | Lynn,1987                |
| Carp blood                  | 240,000 <sup>b</sup>                       | Ueno, et al.,1987        |
| <i>Penaeus japonicus</i>    | 64,000 <sup>d</sup> , 110,000 <sup>b</sup> | Koga, et al.,1996        |
| Plants                      |  |                          |
| <i>Hevea brasillensis</i>   | 46,000 <sup>d</sup> , 92,000 <sup>b</sup>  | Giordani, et al.,1992    |
| Bacteria                    |  |                          |
| <i>Streptomyces griseus</i> | 28,000 <sup>d</sup> , 23,500 <sup>b</sup>  | Tarentino and Maley,1974 |

ตารางที่ 1.6 (ต่อ)

| แหล่ง                           | น้ำหนักโมเลกุล<br>(Da)                      | อ้างอิง                 |
|---------------------------------|---|-------------------------|
| <i>Arthobacter otophoniae</i>   | 80,000 <sup>d</sup> , 80,000 <sup>b</sup>   | Takekava, et al.,1989   |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 64,000 <sup>d</sup>                         | Garcia, et al.,1989     |
| <i>Vibrio parahemolyticus</i>   | 80,000 <sup>d</sup>                         | Zhu, et al.,1992        |
| <i>Aeromonase sp. 10s-24</i>    | 100,000 <sup>d</sup> , 103,000 <sup>b</sup> | Ueda and Arai., 1992    |
| <i>Nocardia orientlis</i>       | 97,000 <sup>d</sup> , 70,000 <sup>b</sup>   | Nanjo,et al.,1994       |
| <i>Aeromonase sp. cs - 34</i>   | 12,000 <sup>d</sup>                         | วรรณนา หงษา.,2538       |
| Fungi                           |   |                         |
| <i>Aspergillus nidulans</i>     | 190,000 <sup>d</sup>                        | Reyes, et al.,1989      |
| <i>Trichoderma hazianum</i>     | 64,000 <sup>d</sup> ,118,000 <sup>b</sup>   | Ulhoa and Peberdy.,1991 |
| <i>Metarhizium anisopliae</i>   | 110,000 <sup>d</sup>                        | St.Leger,et al.,1991    |
| <i>Metarhizium anisopliae</i>   | 102,000 <sup>d</sup>                        | Haman,et al.,1996       |

<sup>b</sup> = by gel filtration

<sup>d</sup> = by SDS PAG

## 2) จลนศาสตร์ของเอนไซม์โคโตไบเอส

เอนไซม์โคโตไบเอสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิดที่เป็นอนุพันธ์ ของ N-acetyl-D-glucosamine และมีค่า  $K_m$  ต่อสับสเตรทแต่ละชนิดแตกต่างกัน และเอนไซม์โคโตไบเอสจากแต่ละแหล่งมีความจำเพาะต่อ p-NAG ได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1.7 Robinson และ Stirling (1968) เสนอว่า ไอโซไซม์ โคโตไบเอส B ที่ได้จากการกำจัดกรดอะมิโน sialic acid ออกจากไอโซไซม์โคโตไบเอส A ของม้าคนให้ค่า  $K_m$  ต่อ 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamininide เท่ากันคือ  $6.7 \times 10^{-4}$  mM มีค่า pH 4.5 สำหรับการเร่งปฏิกิริยาสูงสุดเหมือนกัน จากการศึกษาของ Zhu และ(1992) ได้รายงานว่โคโตไบเอสใน recombinant *Vibrio parahemolyticus* จาก transformed *E.coli* ให้ค่า  $K_m$  ต่อ p-NAG เท่ากับ 3 mM นอกจากนี้ Giordani,et al. (1992) รายงานว่

โคโตไบเอส A ที่ได้จาก *Hevea brasiliensis* latex ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วให้ค่า  $K_m$  ต่อ *p*-NAG เท่ากับ 1.13 mM และให้ค่า  $V_{max}$  เท่ากับ 185 mM

ตารางที่ 1.7 ตารางแสดงค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์โคโตไบเอสจากแหล่งต่าง ๆ

| แหล่ง   | $K_m$<br>(mM) | $V_{max}$<br>(U/ml) | อ้างอิง                     |
|---|---------------|---------------------|-----------------------------|
| Animals   |               |                     |                             |
| <i>Drosophilla hydei</i>                            | 5.7           |                     | Spindler.,1976              |
| Human spleen  | 0.67          | -                   | Robinson and Stirling.,1968 |
| Liver prawn ( <i>Penaeus japonicus</i> )            | 0.137         | -                   | Koga, et al.,1996           |
| Plants  |               |                     |                             |
| <i>Hevea brasiliensis</i>                           | 1.13          | 185                 | Giordani,et al.,1992        |
| Microorganism                                       |               |                     |                             |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. anarogenes A- 52 | 1.0           |                     | Yabuki,et al.,1986          |
| <i>Trichoderma hazlanum</i>                         | 0.25          |                     | Ulhoa และ Peberly.,1991     |
| <i>Aeromonas</i> sp.10 s - 24                       | 0.27          |                     | Ueda และ Arai.,1992         |
| <i>Aeromonas</i> sp.cs - 34                         | 1.82          | 0.0565              | วรรณภา ทงษา., 2538          |
| recombinant <i>Vibrio parahemolyticus</i>           | 3             | -                   | Zhu et al.,1992             |



#### 1.2.4.4 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์

##### โคโคโบเอส

ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โคโคโบเอส ขึ้นอยู่กับ

ปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ หลายประการ เช่น pH อุณหภูมิ ความคงสภาพของเอนไซม์ รวมทั้งอิออน และสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ ดังนี้

##### 1) ผลของ pH ต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโคโบเอส

เอนไซม์โคโคโบเอสจากจุลินทรีย์ส่วนมากทำงานได้ดีและมีความเสถียรที่สุดในช่วง pH เป็นกลาง ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.8 เช่น จาก *Aeromonas hydrophyla sub sp. anaerogenes* A-52 สูงสุดที่ pH 7.0 และมีความเสถียรในช่วงค่า pH 7.0-8.0 ในอุณหภูมิ 30 °ซ นาน 30 นาที (Yabuki ,et al.,1986) จากรายงานการศึกษาของ Tegawa และคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์โคโคโบเอสใน *Arthrobacter protophormiae* สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH กว้างตั้งแต่ 5-11 แม้แต่ pH 12 จะสามารถทำงานได้ถึง 90 % และสามารถทนต่อสภาวะต่างได้แต่ไม่คงทนในสภาวะกรด จากการศึกษาในเชื้อ *Aeromonas sp.* CS-34 ของวรรณา หงษา, (2538) รายงานว่าทำงานได้สูงสุดที่ pH 7.0 และสามารถทนทานได้ในช่วง pH 6.5-7.0 เมื่ออุณหภูมิไม่เกิน 45 °ซ

Koga และคณะ (1996) รายงานว่าเอนไซม์โคโคโบเอสในตับอ่อนของกุ้งลายเสือ (*Peneaus japonicus*) สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5-5.5 สามารถทนทานได้ในช่วง pH 4-11 ใน 50 mM โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

##### 2) ผลของอุณหภูมิต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโคโบเอส

ผลของอุณหภูมิต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโคโบเอสส่วนใหญ่ สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 °ซ และสามารถทนทานได้ในช่วงอุณหภูมิ 45- 55 °ซ เช่น *Drosophilla hydie* 50 °ซ (Spidler.,1976), *Trichoderma hazinum* 50 °ซ (Ulhoa และPeberty,1991),ในตับอ่อนของกุ้งลายเสือ (*Penaeus japonicus*) 50 °ซ (Koga, et al.,1996), *Aeromonase sp.*CS-34 50 °ซ (วรรณา หงษา, 2538) เป็นต้นดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.8

ตารางที่ 1.8 แสดงผลของ pH และอุณหภูมิต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโคโตโบเอส

| แหล่ง                                     | pH      |          | Temp. (°C) |        | อ้างอิง                      |
|---|---------|----------|------------|--------|------------------------------|
|   | Optimum | Stable   | Optimum    | Stable |                              |
| Animal                                    |         |          |            |        |                              |
| <i>Drosophila hydie</i>                   | 5.5-6.2 | -        | 50         | -      | Spidler.,1976                |
| Mollus<br>( <i>Helicella cricetorum</i> ) | 4.5     | 3.8-4.6  | 37         | -      | Calvo, <i>et al.</i> ,1978   |
| Human spleen                              | 4.5     | 3.0-7.0  | 37         | -      | Robinson and Stirling.,1968  |
| Liver prawn ( <i>Penaeus japonicus</i> )  | 5.0-5.5 | 4.0-11.0 | 50         | <55    | Koga, <i>et al.</i> , 1996   |
| Microorganism                             |         |          |            |        |                              |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> sub sp.       | 7.0     | 7.0-8.0  | 50         | <45    | Yabuki, <i>et al.</i> , 1986 |
| Anarogenes A-52                           |         |          |            |        |                              |
| <i>Nocardia orientalis</i>                | 5.5     | 3.0-8.0  | 60         | <60    | Nanjo. <i>et al.</i> , 1990  |
| <i>Trichoderma hazlanum</i>               | 5.5     | -        | 50         | -      | Ulhoa และ Peberly,1991       |
| <i>Aeromonas sp.</i> CS-34                | 7.0     |          | 50         | >50    | วรรณนา ทงษา, 2538            |
| <i>Aeromonas sp.</i> 10-24                | 7.0     | 7.0      | -          | -      | Ueda and Arai ., 1992        |

### 3). ผลของอิออนโลหะและสารประกอบบางชนิดต่อค่าความ ว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอส

อิออนโลหะและสารประกอบบางชนิดมีผลต่อค่าความว่องไวของโคโตไบเอส  $Hg^{2+}$  เป็นอิออนโลหะที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์โคโตไบเอสได้ดีที่สุด อิออนบางชนิด เช่น  $Mn^{2+}$  ที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ จะกระตุ้นค่าความว่องไวของเอนไซม์ แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นกลับยับยั้งค่าความว่องไว ส่วน N-acetylglucosaminolactone เป็นสารอินทรีย์ที่ยับยั้งค่าความว่องไวของโคโตไบเอสอย่างแรง และยังพบว่า NAG ที่เป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์โคโตไบเอสนั้นสามารถยับยั้งค่าความว่องไวของเอนไซม์ได้

Robinson and Sterling (1968) ได้เสนอผลการศึกษาเอนไซม์โคโตไบเอส A และโคโตไบเอส B จากม้าคนพบว่า N-acetylglucosaminolactone ที่เข้มข้น 0.1 mM สามารถยับยั้งค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอสได้ 100 % และถูกยับยั้งด้วย NAG ซึ่งเป็นผลผลิตของปฏิกิริยา และ N-acetylgalactosamine ที่มีความเข้มข้น 1 mM จะยับยั้งค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอส 30 %

จากการศึกษายับยั้งค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอสในเม็ดแดงจากปลาการ์ฟ ของ Ueno และคณะ (1987) พบว่า อิออนของ  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , และ  $Cu^{2+}$  ที่เข้มข้น 1 mM และ dithiothreitol และ 2-mercaptoethanol จะยับยั้งค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอส ในขณะที่  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ที่ความเข้มข้นเดียวกันกลับกระตุ้นค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอส

Wright และ Smuker (1986) รายงานว่า โคโตไบเอส จากหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) ถูกยับยั้งด้วย  $Cu^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 0.5-20 mM แต่  $Cu^{2+}$  ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 2.0 mM จะกระตุ้นค่าความว่องไวของโคโตไบเอส ตรงข้ามกับ  $Mg^{2+}$  ที่กระตุ้นค่าความว่องไวโคโตไบเอสที่ค่าความเข้มข้น 0.5-2 mM และจะยับยั้งค่าความว่องไว โคโตไบเอสเมื่อมีค่าความเข้มข้นมากกว่า 2.0 mM แต่เมื่อทดสอบอิออนทั้งสองชนิดพร้อมกันปรากฏว่าความสามารถในการกระตุ้นของอิออนชนิดหนึ่งจะถูกหักล้างจากความสามารถยับยั้งของอิออนอีกชนิดหนึ่ง ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1.9

ตารางที่ 1.9 ผลของอิออน และสารประกอบบางชนิดต่อค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโคไบเอส

| แหล่ง                                   | Ion                                 |  | Chemical   | อ้างอิง                      |
|---|-------------------------------------|--|--|------------------------------|
|   | Activation                          | Inhibition   |  |                              |
| Human spleen                            | -                                   | -  | N-acetylglucosaminolactone<br>N-acetylglucosamine<br>N-acetylgalactosamine | Robinson and Sterling., 1968 |
| Mollus ( <i>Hellicell erictorum</i> )   | -                                   | Hg <sup>2+</sup> Fe <sup>3+</sup>  | NAG, Acetate, lactone<br>N-acetylgalactosamine                             | Calva et al.,1978            |
| Mollus ( <i>Crassostrea virginica</i> ) | > 2.0 mM<br>Cu <sup>2+</sup>        | 0.5-2.0 mM<br>Cu <sup>2+</sup>   | -  | Wright and Smuker., 1986     |
| Fish (Carp)                             | Co <sup>2+</sup> Ca <sup>2+</sup>   | Mg <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup><br>Hg <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> | -  | Ueno,et al.,1987             |
| <i>Aeromonas hydrophila</i>             | AsO <sub>2</sub> , Mn <sup>2+</sup> | Hg <sup>2+</sup>   | monoiodoacetatic   | Ureda, and Arai.,1992        |

Yabuki, et al. (1986) รายงานว่า สารอินทรีย์ monoiodoacetate และ  $Hg^{+2}$  เป็นตัวยับยั้งค่าความว่องไวของโคโตไบเอส ที่ได้จาก *Aeromonas hydrophilla sub sp. anaerogenes* A-52 อย่างแรง ส่วน  $AsO_2$  และ  $Mn^{2+}$  มีผลกระตุ้นการทำงานของโคโตไบเอส เล็กน้อย

Zhu et al., (1992) รายงานว่า recombinant *Vibrio parahemolyticus* โคโตไบเอส ที่ได้จาก transformed *E.coli* มีความทนทานต่อเกลือได้สูง มีค่าความว่องไวสูงถึง 85 และ 56 % ที่ความเข้มข้น NaCl 1 และ 2 M ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า ผลผลิตจากปฏิกิริยา (NAG) สามารถยับยั้งค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอส ใน *Metarhizium anisopliae* (St.Leger et al.,1991) จากการศึกษาของ Findlay, และคณะ.(1958) อ้างโดย Pughand Walker,1961) รายงานว่าแลคตินของ N-acetylglucosaminic acid มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โคโตไบเอส แบบแข่งขันได้

### 1.3 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โคติโนไลติก

#### 1.3.1 ประโยชน์ของเอนไซม์โคติเนส

ได้มีการนำเอาเอนไซม์โคติเนสมาประยุกต์ใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวางในงานด้านต่าง ๆ คือ

##### 1.3.1.1 ใช้ในการตรวจหาตำแหน่งของโคติน -โคโตแซน ในรูป Chitinase-Chitosanase-gold complex

วิธีการนี้นิยมใช้กับเชื้อรามากที่สุด เพราะว่ามีผนังเซลล์ของเชื้อราประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์มากกว่า 80% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งประกอบด้วย hexose, pentose, hexuronic acid และ heteropolysaccharides (Sietsma and Wessels, 1977) นอกจากนี้โคติน และโคโตแซนเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อราด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการหาตำแหน่งหรือศึกษาโครงสร้างของสารที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราเหล่านี้จึงเกิดขึ้นได้หลายวิธี เช่น การศึกษาทาง infrared spectroscopy และ x-ray diffraction (Ruel, et al.,1977) หรือใช้แลคตินเป็นตัวจับที่จำเพาะต่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เข้ามาประยุกต์ใช้ร่วมกับ colloidal gold ในการตรวจหาน้ำตาลหลาย ๆ ชนิดของเชื้อราที่ต่างกัน (Benhamou and Ouellette, 1986) และสามารถนำ enzyme-gold cytochemistry มาใช้

สำหรับการตรวจหาโพลีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์เชื้อราได้เช่นกัน เช่นการนำ Wheatgerm agglutinin-gold complex และ chitinase-gold complex เข้ามาใช้เป็นตัวตรวจจับ NAG ใน secondary cell wall ของพืชและในเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืช (Benhamou, 1988) และมีการศึกษาการติดตามตำแหน่งของโคโตแซนด้วยโคโตแซนเนสกับส่วนของ colloidal gold ในสปอร์และ hyphal cell wall ของเชื้อราพวก *Ophiostoma ulmi* และ *Aspergillus niger* (Grenier, et al., 1991)

### 1.3.1.2 ใช้ในเทคโนโลยีการแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา

การแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อราเป็นเทคนิคที่ทำกันอย่างแพร่หลาย เช่น การศึกษาโครงสร้างผนังเซลล์ และการหลั่งเอนไซม์ (Kelkar, et al., 1990) เอนไซม์โคติเนสเข้ามามีบทบาทสำคัญในการแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา เนื่องจากโคตินซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์เป็นองค์ประกอบโครงสร้างหลักของผนังเซลล์เชื้อรา Yanagi และ Takebe (1984) ได้ทำการทดลองนำเอนไซม์หลายชนิดทั้งที่ใช้เพียงเดี่ยว ๆ หรือทำงานร่วมกับตัวอื่นมาทำการแยกโปรโตพลาสต์ จาก *Coprinus macrorhizus* และ *Basidiomycetes* พบว่าเอนไซม์โคติเนสมีประสิทธิภาพในการแยกโปรโตพลาสต์ได้ดี อย่างไรก็ตามวิธีวิธีการแยกโปรโตพลาสต์ที่ใช้เอนไซม์โคติเนสอย่างเดียวเกิดขึ้นช้า และใช้เวลานานเนื่องจากไม่ซีเลียมของเชื้อรามีองค์ประกอบโครงสร้างอื่นนอกเหนือไปจากโคตินที่เป็นองค์ประกอบหลัก ดังนั้น Kawasumi และคณะ (1987) จึงได้พัฒนาวิธีการแยกโปรโตพลาสต์โดยการผสม mycolytic enzyme กับเอนไซม์โคติเนสที่มีค่าความว่องไวสูง ๆ และพบว่าวิธีการนี้สามารถให้จำนวนของโปรโตพลาสต์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งปัจจุบันเทคนิคนี้ได้ถูกใช้เป็นหลักการแยกโปรโตพลาสต์ที่นิยมทำกันมาก

### 1.3.1.3 ใช้ในระบบควบคุมทางชีวภาพ

เนื่องจากโคตินเป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญของผนังเซลล์เชื้อรา และเปลือกนอกของแมลงศัตรูพืช เช่น เชื้อราสายพันธุ์ *Rhizoctonia solani* Kuhn ที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ (sheath blight) ในพืชหลายชนิด รวมทั้งก่อให้เกิดความเสียหายในหลายประเทศ เช่น จีน, เวียดนาม, เกาหลี, ญี่ปุ่น, สหรัฐอเมริกา และอินเดีย จึงต้องใช้สารเคมีเพื่อควบคุมการระบาดของของโรค วิธีการเช่นนี้ยังนอกทำให้สูญเสียงบประมาณอย่างมหาศาลแล้วยังทำลายสิ่งแวดล้อมด้วย (Thara and Gnanamanickam, 1994)

ปัจจุบันจึงมีการศึกษาวิธีการควบคุมศัตรูพืชด้วยชีววิธี

(biological control) เพื่อช่วยให้ประหยัด ปลอดภัยแก่ผู้บริโภค และไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการทำลายแมลงและเชื้อราที่เป็นศัตรูพืชจึงสามารถใช้เอนไซม์โคติเนสเข้ามาเกี่ยวข้องกับ จึงมีการศึกษากัน 3 รูปแบบดังนี้

1) ศึกษาเอนไซม์โคติเนสที่พืชสร้างขึ้นมาเองเมื่อมีการบุกรุกของ เชื้อโรค Roberts และ Selitrennikoff (1988) พบว่าเอนไซม์โคติเนสจากพืชสามารถยับยั้ง การเจริญเติบโตของเชื้อราไม่เหมือนกัน ซึ่งมีสาเหตุมาจากความต้องการสารตั้งต้นที่จำเพาะ หรือลักษณะของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็ได้ เอนไซม์โคติเนสจากพืชสามารถยับยั้งการ เจริญเติบโตของเชื้อรา โดยเข้าไปมีผลกระทบท่อนั่งเซลล์ของเชื้อราที่มีโคตินรวมอยู่ เช่น เอนไซม์โคติเนสจาก *Arabidopsis thaliana* สามารถป้องกันการติดเชื้อของ *Botrytis cinereanapus* ได้ (Samae and shan, 1994) เอนไซม์โคติเนสจาก *Brassica napus* ก็ สามารถแสดงผลในการตอบสนองต่อการติดเชื้อของ *Phoma lingam* ได้เช่นกัน (Rasmussen, et al., 1992) และเอนไซม์โคติเนสที่ได้จากใบมันเทศ (*Solanum tuberosum*) เมื่อทำงานร่วมกับ  $\beta$ -1,3 glucanase ก็สามารถที่จะยับยั้งการติดเชื้อ *Phytophthora infestans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Beerhues and Kombrink., 1994)

2) ศึกษาเอนไซม์โคติเนสจากแบคทีเรียที่ต้านเชื้อราที่ก่อโรคพืช เช่น เอนไซม์โคติเนสจาก *Serratia marcescens* เมื่อนำมาใช้ผสมกับ  $\beta$ -glucanase, propan-2-ol และ polyoxyethylene lauryl ether และนำไปฉีดพ่นบริเวณทุ่งข้าวจะสามารถควบคุม อาการของโรคใบไหม้ (rice-blight) อันเนื่องมาจากเชื้อ *Pyricularia oryzae* ได้ (Tanaka, et al., 1970) การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โคติเนสจาก *Serratia marcescens* ในการทดลอง ภายในเรือนกระจก (green house) พบว่าสามารถควบคุมเชื้อรา *Soleytilum rolfsii* ที่ก่อให้เกิดโรคในถั่วและ *Rhizoctonia solani* ที่ก่อโรคในฝ้ายได้ (Ordentlich, et al., 1988) นอกเหนือไปจากการนำเอนไซม์โคติเนสจากแบคทีเรียมาควบคุมเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืชแล้ว เอนไซม์โคติเนสจากเชื้อราบางชนิดโดยเฉพาะ *Trichoderma harzianum* ก็สามารถควบคุม เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ด้วย จึงนำมาใช้เป็นสารควบคุมชีวภาพ (biocontrol agent) ที่สำคัญมากทางการเกษตรในปัจจุบัน (Ridout, et al., 1988) การ พัฒนาทางเทคนิคของ protoplast fusion ก็สามารที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ของ

*Trichoderma harzianum* ให้สามารถที่จะต้านเชื้อราที่ก่อโรคพืชได้โดยตรง เช่น *Rhizoctonia solani*, *Soleytrium rolfsii* และ *Phythium ultimum* ในกรณีการกำจัดแมลงที่ก่อให้เกิดโรคมักมีการทดลองให้เอนไซม์ไคตินเนสให้ย่อยสลายคิวติเคิลของแมลง และพบว่าถ้าหากมีเอนไซม์โปรตีเอสเข้าไปทำงานร่วมด้วยจะทำให้ผลของการย่อยสลายคิวติเคิลของแมลงเป็นไป得更เร็วขึ้น (St.Leger, et al., 1986)

Thara และ Gnanamanickam (1994) ได้ทำการการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส และตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *Rhizoctonia solani* จากแบคทีเรียที่เรืองแสง และไม่เรืองแสง 1,757 ชนิด พบว่าสามารถผลิตไคตินเนสได้ 31 % และสามารถยับยั้งเชื้อราได้ 12 % เมื่อนำมาตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* จากนาข้าวในธรรมชาติ เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี validamycin พบว่าแบคทีเรียชนิด *Pseudomonase putida* และ *P. fluorescens* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุดสามารถยับยั้งได้ 68 % ในขณะที่การใช้สารเคมีสามารถยับยั้งได้เพียง 17 % แบคทีเรียทั้งสองชนิดเป็นเป้าหมายสำคัญต่อการควบคุมทางชีวภาพ

3) การศึกษาการถ่ายโอนยีนจากสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ เข้าสู่พืชเศรษฐกิจเพื่อให้พืชนั้นมีความต้านทานต่อโรค และแมลงที่เป็นศัตรูพืช เช่น การศึกษาการความต้านทานต่อโรคในพืชที่มีการถ่ายโอนยีน (trangenic plant) ของ Panja และคณะ (1996) โดยนำยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสที่มีคุณสมบัติเป็นกรด (acidic protein) จาก *Pitunia* และยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสที่มีคุณสมบัติเป็นเบส (basic protein) จากมะเขือเทศ และ ถั่ว โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่แตงกวา (Cucumber cv. Endiavor) แล้วนำไปเปรียบเทียบความสามารถในการต้านทานเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค 4 ชนิดคือ *Alternaria cucummerrina*, *Botrytis cineria*, *Contectotrihum largenarium* และ *R. solani* พบว่า เชื้อราทั้ง 4 ชนิดสามารถเจริญได้ดีทั้ง ในพืชที่มีการถ่ายโอนยีน (trangenic plant) และไม่มีถ่ายโอนยีน (nontrangenic plant) และทำการทดลองในแครอท (Carrot cvs.) โดยใช้ยีนจาก *Pitunia* และ มะเขือเทศ เพื่อดูการตอบสนองในเชื้อรา 5 ชนิด คือ *Alternaria radicini*, *B. cineria*, *Scleraria rolfsii*, *R. solani* และ *Thelaviopsis basicola* พบว่าแครอทที่มีการถ่ายโอนยีนที่ที่ควบคุมการสร้าง



โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส (basic protein) จากมะเขือเทศสามารถต้านทานต่อเชื้อราได้ 3 ชนิด คือ *B. cinerea*, *S. rolfisii*, และ *R. solani* จากการทดลองนี้จึงสรุปว่า การแสดงออกของพืชที่มีการถ่ายโอนยีน เพื่อให้ต้านทานต่อเชื้อราที่เป็นศัตรูนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น ชนิดของพืช, ชนิดของโปรตีน และคุณลักษณะของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค

### 1.3.2 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไคโตไบเอส

#### 1.3.2.1 ประโยชน์ในงานวิจัย

ในการศึกษาชนิดและลำดับของน้ำตาลที่จับกับสารโปรตีนในไกลโคโปรตีน และการกำจัดสายโซ่น้ำตาลเพื่อให้เอนไซม์เปปติเดส (peptidase) เข้าย่อยสลายโปรตีนหลัก เพื่อศึกษาชนิดและลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างไกลโคโปรตีน, การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ (cell surface) ในระหว่างการเจริญเปลี่ยนแปลงของ diploid cells เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างของสายโพลิไกลิโคแซคคาไรด์กับกิจกรรมของมัน การศึกษาเหล่านี้ในห้องปฏิบัติการนิยมใช้เอนไซม์ไกลโคไซด์หลายชนิดรวมทั้งไคโตไบเอสเข้าย่อยสลายสายโซ่น้ำตาลบนแกนโปรตีน

Sprio (1970 อ้างโดย Mescher and Strominger, 1976) กล่าวว่าเนื่องจากไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ของยูคาริโอตจะมี 2 ชนิด คือ N-linked glycoprotein และ O-linked glycoprotein ดังนั้นนักเซลล์วิทยาจึงนิยมใช้เอนไซม์ไกลโคไซด์และไคโตไบเอส ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ระหว่างการเจริญเติบโตของเซลล์

Hickman และคณะ (1972) ศึกษาโครงสร้างสายโซ่น้ำตาลบนไกลโคโปรตีนของ human  $\mu$ M-immunoglobulin โดยใช้เอนไซม์ไคโตไบเอส ร่วมกับเอนไซม์ไกลโคไซด์หลายชนิดย่อยสลายสายโซ่น้ำตาลด้วยเทคนิค sequential enzymatic degradation ทำให้สามารถทราบถึงลำดับการเรียงตัวของโมเลกุลน้ำตาลแต่ละชนิดบนสายโซ่น้ำตาลได้

Tarentino และคณะ (1972) ได้ทำการศึกษาลำดับโครงสร้างน้ำตาลบนสายโซ่น้ำตาลของ N-linked glycoprotein โดยใช้เอนไซม์ endo chitinase สามารถลำดับตำแหน่งของน้ำตาลบนสายโพลิไกลิโคแซคคาไรด์ของไกลโคเปปไทด์นี้ได้อย่างถูกต้องว่า

หน่วย polymannosyl unit ยึดติดอยู่กับส่วน distal end ของโครงสร้าง di-N-acetylchitobiose core region ไม่ใช่ส่วน proximal part ดังรายงานที่ได้จากการศึกษาโดยใช้การย่อยสลายโครงสร้างสายโซ่น้ำตาลด้วยวิธีทางเคมีของ Huang และคณะ(1970 อ้างโดย Tarentino, *et al.*, 1972) ; Makino and Yamashina, 1966 อ้างโดย Tarentino, *et al.*, 1972)

Trimble และ Tarentino (1991) รายงานว่าได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดสสำหรับงานวิจัยทางด้านชีววิทยามานานนับ 10 ปีแล้ว การศึกษาทางด้านชีวเคมีในยุคแรก ๆ ได้ใช้ประโยชน์จากความสามารถของเอนไซม์ endoglycosidase สำหรับแยกสายคาร์โบไฮเดรต และสายโปรตีนในไกลโคโปรตีนออกจากกันเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้าง และบทบาทของสายคาร์โบไฮเดรตที่มีต่อการทำงานของไกลโคโปรตีน เนื่องจากการแยกสายคาร์โบไฮเดรตออกจากสายโปรตีนด้วยวิธีทางเคมีมักจะให้ผลผลิตที่ไม่สมบูรณ์เพียงพอ และหากได้สายคาร์โบไฮเดรตสมบูรณ์สายโปรตีนก็ต้องเสียหาย หากได้สายโปรตีนสมบูรณ์สายคาร์โบไฮเดรตก็จะเสียหายอยู่เสมอไป

### 1.3.2.2 ประโยชน์ในทางการแพทย์

ระดับโคโคไลโบเอสที่เพิ่มสูงขึ้นในเลือด หรือปัสสาวะสามารถใช้ประโยชน์ช่วยในการวินิจฉัยโรคได้ ตัวอย่างเช่น Khan, และคณะ (1989) รายงานว่าในผู้ป่วยที่มี oxalate เพิ่มขึ้นในระบบทางเดินปัสสาวะจะพบมีเอนไซม์โคโคไลโบเอสเพิ่มขึ้นพร้อม ๆ กับ oxalate ที่เพิ่มขึ้นในปัสสาวะด้วย

Antoniello และคณะ (1989) รายงานว่าในผู้ป่วยที่เป็น โรคตับแข็ง (liver cirrhosis), และทางเดินน้ำดีอุดตัน (cholestasis) และโรคตับอักเสบเฉียบพลันจาก แอลกอฮอล์ (acute alcohol intoxication) พบว่ามีเอนไซม์โคโคไลโบเอสเพิ่มขึ้นในซีรัมของผู้ป่วยเช่นเดียวกับหนูทดลองที่เป็นโรคตับแข็งเนื่องจากสาร  $CCl_4$

## 1.4 สรุปการตรวจเอกสาร

โคตินเป็นสารอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่ผนังเซลล์ของสัตว์ที่มีโครงสร้างแข็งภายนอกในพวกอาร์โทรพอด ซึ่งเป็นองค์ประกอบร่วมกับสารอื่น ๆ เช่น โปรตีนแคลเซียมคาร์บอเนต ฯลฯ พบว่ามีปริมาณมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากเซลลูโลส จึงมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางมากในปัจจุบัน เพื่อหาวิธีการเปลี่ยนแปลงสาร

ดังกล่าวจากสิ่งเหลือทิ้ง ให้อยู่ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น โคติน หรืออนุพันธ์ของโคติน ไคโตแซน และหน่วยย่อย NAG ตามความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งในปัจจุบันมีการนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมที่หลากหลาย เช่น ด้านอาหาร, ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม, ด้านเครื่องสำอาง และการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น การเตรียมโคติน หรืออนุพันธ์ของโคตินนั้น มีวิธีการเตรียมที่แตกต่างกันตามความต้องการของผลิตภัณฑ์ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากโคตินเป็นสารที่ไม่สามารถละลายน้ำหรือตัวทำละลายทั่วไปได้ โดยทั่วไปอาศัยขบวนการทางเคมี โดยการใช้กรดแก่ และต่างแก่ซึ่งอาจมีผลทำให้คุณสมบัติเปลี่ยนไป

ในทางชีวภาพโคตินถูกย่อยสลายได้ในธรรมชาติด้วยระบบของเอนไซม์โคติโนไลติก ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอส ที่มีลักษณะการทำงานร่วมกันอย่างต่อเนื่องในการเปลี่ยนแปลงโคตินให้เป็นหน่วยย่อยได้ ซึ่งถือว่ามีบทบาทสำคัญในการกำจัดสิ่งเหลือทิ้งที่เกิดขึ้นในธรรมชาติได้ มีผลต่อการช่วยรักษาสิ่งแวดล้อม และก่อให้เกิดการหมุนเวียนสารในระบบนิเวศให้อยู่ในสภาวะที่สมดุลได้ จากบทบาทที่สำคัญของเอนไซม์ดังกล่าวจึง มีการศึกษาเอนไซม์โคติโนไลติกอย่างกว้างขวางมากยิ่งขึ้น และมีการนำเอนไซม์

โคติโนไลติกไปประยุกต์ใช้งานได้อย่างหลากหลาย เช่น ใช้ในการเตรียมโคติน , เตรียม NAG , ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชในทางชีวภาพ (biological control) และใช้ในเทคโนโลยีการแยก โพรโตพลาสของเชื้อรา เป็นต้น

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมี และกายภาพของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอส
3. ศึกษาวิธีการเตรียมเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอสให้บริสุทธิ์จากเลือด

กั๋งกุลาดำ

## 2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

### วัสดุ

#### สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ทดลองเป็นชนิด analyticals grade ที่ซื้อมาจากบริษัทต่าง ๆ ดังนี้

| ชื่อสารเคมี                           | บริษัทผู้ผลิต  |
|---------------------------------------|----------------|
| Acetic acid                           | Merck          |
| Acetone                               | Baker Analyzed |
| N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine      | Sigma          |
| Bovine serum albumin                  | Sigma          |
| Catalase                              | Pharmacia      |
| Citric acid                           | Analyticals    |
| Chitin ที่เตรียมจากกระดองปลาหมึกกล้วย | เตรียมเอง      |
| Copper sulphate                       | Merck          |
| Di-potassium hydrogen phosphate       | Fluka          |
| DEAE sephadex A - 50                  | Sigma          |
| Ethanol (absolute)                    | Merck          |
| $\beta$ -D-glucosidase                | Sigma          |
| Glycine                               | Merck          |
| Hepase                                | Gibco          |
| Hydrochloric acid                     | Merck          |
| L-glutamine                           | Sigma          |
| M-199                                 | Gibco          |
| Magnesium chloride                    | Merck          |
| Magnesium sulphate                    | Fluka          |
| Mathanol                              | Baker Analyzed |

| ชื่อสารเคมี  | บริษัทผู้ผลิต |
|--|---------------|
| <i>p</i> -dimethyl - aminobenzaldehyde (DMAB)              | Sigma         |
| <i>p</i> -nitrophenol                                      | Aldirch       |
| <i>p</i> -nitrophenol-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamininide | Sigma         |
| Potassium chloride   | Fluka         |
| Potassium dihydrogen phosphate                             | Merck         |
| Potassium hydroxide  | BDH           |
| Potassium tetraborate                                      | Ajax          |
| Sephadex G - 200   | Sigma         |
| Sodium bicarbonate   | H&W           |
| Sodium carbonate   | Fluka         |
| Sodium chloride  | Analyticals   |
| L - cysteine   | Sigma         |
| Tris-hydroxymethylaminometain                              | Fluka         |

### อุปกรณ์

1. เครื่องเซนตริฟิวจ์ ของ Kokusan รุ่น 2110
2. เครื่องเซนตริฟิวจ์รุ่น Hemle Z 203 A
3. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของ Precisa รุ่น Junior 2000 c
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ แบบเขย่า
6. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงมองเห็น และอุลตราไวโอเล็ตของ Milton roy รุ่น Spectronic 21 D
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงมองเห็น และอุลตราไวโอเล็ตของ Phamacia รุ่น Ultraspec III
8. เครื่องเก็บ fraction แบบอัตโนมัติของ BIO-RAD รุ่น 1000/500

## วิธีการ

### 2.1 การเตรียมตัวอย่างจากเลือดกุ้งกุลาดำ

#### 2.1.1 การเตรียมตัวอย่างจากเลือดกุ้งกุลาดำเพื่อหาคุณลักษณะทางกายภาพ และทางเคมี

ตัวอย่างเลือดที่นำมาใช้ทดลองนี้ได้มาจากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ขนาดประมาณ 25 - 35 กรัม มีความยาวของเปลือกคลุมหัว (carapace length ประมาณ 2.5 ซม.) เป็นกุ้งซึ่งเลี้ยงด้วยระบบหนาแน่น (intensive system) ในบ่อดินตั้งแต่ระยะ post larva (PL15) จากบริษัท ซีคิงฟาร์ม จำกัด บริเวณอำเภอนิวไทร จังหวัดนครศรีธรรมราช เพื่อสามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้สะดวก และรวดเร็ว จึงคัดกุ้งตามขนาดที่ต้องการมาเลี้ยง ภายใต้ห้องปฏิบัติการในบ่อคอนกรีตขนาด 175 X 570 ซม. บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 25-28 ppm ให้มีระดับ 50 ซม. รักษาคุณภาพน้ำด้วยระบบ biological filter ให้มีระดับ ammonia, nitrate ไม่เกิน 0.2 ppm และ pH อยู่ในช่วง 7.8 - 8.1 กุ้งได้รับอาหารอัดเม็ด เช่นเดียวกับที่เคยได้รับในบ่อเลี้ยงซึ่งผลิตโดย บริษัท เจริญโภคภัณฑ์ จำกัด วันละ 4 มื้อ (ประมาณ 8.00 , 11.30 , 14.30 และ 17.00 น.)

ตัวอย่างเลือดที่ดูดจาก pericardium หรือขาเดินคู่ที่ 3 โดยใช้ syringe ขนาด 1 มล. และเข็มขนาด 24 G ความยาว 1 นิ้ว ภายใน syringe จะมีสารละลาย K-199 เพื่อป้องกันการแข็งตัว และการแตกของเซลล์เม็ดเลือด (ดูวิธีการเตรียม และส่วนผสมจากภาคผนวก) ประมาณ 25 % ของปริมาตรเลือดที่ดูดได้ เนื่องจากผลการศึกษาเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ พบว่าทั้งโคติเนสและโคโตไบเอสอยู่ในซีรัมเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้น เพื่อลดการปนเปื้อนจากโปรตีนบางชนิดในเม็ดเลือดลดการทดลองนี้จึงใช้เฉพาะส่วนของซีรัมซึ่งจะถูกแยกออกจากเลือด (hemolymph) โดยการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

เนื่องจากเกลือบางชนิดซึ่งเป็นส่วนผสมของ K-199 รบกวนปฏิกิริยาในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน รวมทั้งการหาค่าความว่องไวของแอนไซม์ใน ซีรัมจึงกำจัดสารดังกล่าวโดย dialysis ผ่าน membrane ซึ่งมี exclusion limited 20,000 Da เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัวอย่างซีรัมที่เตรียมได้จะถูกแบ่งออกเป็นส่วนๆ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 70 °ซ เพื่อนำมาศึกษาคุณลักษณะและคุณสมบัติแต่ละชั้นตอนของแอนไซม์ทั้งสองชนิด

## 2.1.2 การเตรียมตัวอย่างจากเลือดกึ่งกลาดำเพื่อการแยกให้บริสุทธิ์

ตัวอย่างเลือดกึ่งที่นำมาใช้ทดลองจากปอเลี้ยงกึ่งอำเภอย่านตาขาว จังหวัดตรัง ซึ่งครบกำหนดจับพอดีมีขนาดเฉลี่ย 30-50 กรัม เก็บตัวอย่างโดยใช้ syringe ขนาด 1 มล. และเข็มขนาด 24 G ดูดเลือดกึ่งทันทีที่จับขึ้นมาผสมกับน้ำกลั่นสัดส่วน 2 ต่อ 1 เพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดในเลือดกึ่งจึงปล่อยให้เม็ดเลือดแตก และเลือดแข็งตัว โดยเก็บสารตัวอย่างแช่ในน้ำแข็งตลอดเวลา หลังจากนั้นนำไปทำให้เลือดที่แข็งตัวแยกออกจากกัน โดยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonicate) 5 ครั้ง ครั้งละ 10 วินาที แล้วนำไปการปั่นเหวี่ยง 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาเศษชิ้นส่วนของเซลล์ที่แตกออกจากซีรัม จึงนำเอาสารละลายส่วนบนไปใช้ในการศึกษาการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

## 2.2 การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติโนไลติก

### 2.2.1 การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Jeuniaux et al., 1966)

#### 2.2.1.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน NAG

เตรียมสารละลาย 0.1 M N-acetyl-D-glucosamine (NAG) ในน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วย สารละลาย 0.1 M citric acid - 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 5.0 ให้ได้ความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้ คือ 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 และ 0.20  $\mu\text{mol/ml}$  นำสารละลายดังกล่าว 0.5 มล. ใส่ในหลอดทดลอง เต็ม 0.1 มล. 0.8 M สารละลายโปแตสเซียมเตตระโบเรต ( $\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วทำให้เกิดสีโดยการเติมสารละลาย *p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) 3 มล. (ดูวิธีการเตรียมจากภาคผนวก) ไปแช่และเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร

#### 2.2.1.2 วิธีการตรวจสอบความว่องไวเริ่มต้นของเอนไซม์โคติเนส

โดยใช้ 2 วิธี ดังนี้คือ

- 1) วิธีการตรวจสอบความว่องไวเริ่มต้นของเอนไซม์โคติเนสเพื่อหาคุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมี

นำซีรัมที่เตรียมได้จากข้อ 2.1.1 มีการเจือจางอย่างเหมาะสมผสม

ในสารก่อกำเนิดปฏิกิริยาปริมาตร 0.5 มล. ผสมกับโคตินจากกระดองปลาหมึกในปริมาณ



5 มก./ มล. ปริมาตร 1.0 มล. และเติม 1.0 มล.บัฟเฟอร์ 0.1 M citric acid -0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 5.0 และน้ำกลั่น 0.8 มล. คนให้เข้ากันในหลอดแรกต้มในน้ำเดือดทันทีเพื่อนำมาใช้เป็น Blank เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ และอีกส่วนหนึ่งนำลงแช่และเขย่าเบา ๆ ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 °ซ ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.7 มล. สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % นำไปใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 มล. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนใส 0.5 มล. ผสมกับ 0.1 มล. 0.8 M. สารละลายโปแตสเซียมเตตระโบเรต และต้ม ในอ่างน้ำเดือด 10 นาที หลังจากนั้นเติม 3 มล. สารละลาย DMAB แล้วนำไปเขย่า ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 15 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณ NAG โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน NAG

## 2) วิธีการตรวจสอบความว่องไวเริ่มต้นของเอนไซม์โคติเนสเพื่อ การทำให้บริสุทธิ์

เนื่องจากวิธีการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสขึ้นอยู่กับ

กำลังอิออน (ionic strength) ดังนั้นในการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จะต้องผ่านวิธีการต่าง ๆ หลายขั้นตอนทำให้เอนไซม์เจือจางมากจึงต้องปรับวิธีการตรวจสอบให้อยู่ในระดับที่น่าเชื่อถือ โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เพื่อเพิ่มกำลังอิออนให้สูงขึ้นจาก 0.1 M citric acid -0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  เป็น 0.6 M citric acid -1.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  และปรับปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีก 1 เท่า ตามวิธีการดังนี้ นำสารตัวอย่างตั้งแต่เริ่มต้น (crude) ที่มีการเจือจางอย่างเหมาะสมและจากการทดลองในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ผสมในสารก่อกำเนิดปฏิกิริยาปริมาตร 1.0 มล. ผสมกับโคติเนสจากกระดองปลาหมึกในปริมาณ 5 มก./ มล. ปริมาตร 1.0 มล.เติม 1.0 มล. บัฟเฟอร์ 0.6 M citric acid-1.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 5.0 และ 0.3 มล. เอนไซม์เบต้า-กลูโคไซด์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำงานเหมือนกับโคติเนส คนให้เข้ากันในหลอดแรกต้มในน้ำเดือดทันทีเพื่อนำมาใช้เป็น Blank เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ และอีกส่วนหนึ่งนำลงแช่และเขย่าเบา ๆ ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 °ซ นำที่เวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม 0.7 มล. สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 10 % นำไปใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 มล.ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนใส

0.5 มล. ผสมกับ 0.1 มล. 0.8 M สารละลายโปแตสเซียมเตตระโบเรต และต้ม ในอ่าง  
น้ำเดือด 10 นาที หลังจากนั้นเติม 3 มล. สารละลาย DMAB แล้วนำไปเขย่าในอ่างน้ำ  
ควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 15 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  
585 นาโนเมตร วิเคราะห์หาปริมาณ NAG โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน NAG

กำหนดให้ความว่องไวของเอนไซม์ 1 ยูนิต เท่ากับความสามารถ  
ของเอนไซม์ที่ย่อยโคตินให้เป็น NAG 1  $\mu\text{mol}$  ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ในเวลา 1 ชั่วโมง  
ค่าความว่องไวจำเพาะ (Specific activity) ของเอนไซม์โคตินเนส  
มีค่าเป็นจำนวนยูนิตของเอนไซม์/มล.โปรตีน

## 2.2.2 การหาความว่องไวเริ่มต้นของเอนไซม์โคโตไบเอส

### 2.2.2.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของ *p*-Nitrophenol

เตรียมสารละลาย 0.1 M *p*-Nitrophenol ละลายในบัฟเฟอร์ 0.1 M  
citric acid-0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  หลังจากนั้นนำมาทำการเจือจางด้วยบัฟเฟอร์เดิม 5 ความ  
เข้มข้น คือ 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 และ 0.25  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  ตามลำดับ นำสารตัวอย่างดังกล่าว  
ปริมาตร 0.58 มล. เติม 2.4 มล. 1 M สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต นำไปอ่านค่าการดูด  
กลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

### 2.2.2.2 วิธีการตรวจสอบความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอส

ใช้สารตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม ผสมในสารก่อปฏิกิริยา  
100 ไมโครลิตร ผสมกับ *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamininide ที่มีความเข้มข้น  
5 mM ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เติมบัฟเฟอร์ 0.1 M citric acid-0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  420  
ไมโครลิตร คนให้เข้ากัน นำลงแช่ และเขย่าเบา ๆ ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50 °ซ ที่เวลา 5,  
10, 15, 20, 25 และ 30 นาทีตามลำดับ หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 2.4 มล.  
1.0 M สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  
420 นาโนเมตร โดยใช้โซเดียมคาร์บอเนตเป็น Blank วิเคราะห์หาปริมาณ *p*-nitrophenyl-  
N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamininide โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

กำหนดให้ความว่องไวของเอนไซม์ 1 ยูนิต เท่ากับความสามารถของ  
เอนไซม์ที่ย่อย *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamininide ให้เป็นเป็นผลิตภัณฑ์

*p*-nitrophenol 1  $\mu\text{mol}$  ที่อุณหภูมิ 50 °ซ ในเวลา 1 นาที

ค่าความว่องไวจำเพาะ (Specific activity) ของเอนไซม์โคโตไบเอส  
มีค่าเป็นจำนวนยูนิตของเอนไซม์/มล.โปรตีน

## 2.3 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์โคติโนไลติก

### 2.3.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์โคติเนส

นำสารตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 ผสมในสารก่อกิจกรรมตามข้อ 2.2.1 นำไป  
ปมที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 และ 65 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้น  
หยุดปฏิกิริยา และนำมาหาค่าความว่องไว

### 2.3.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์โคโตไบเอส

นำสารตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 ผสมในสารก่อกิจกรรมตามข้อ ข้อ 2.2.2 ปม  
ที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 และ 65 °ซ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นหยุด  
ปฏิกิริยา และนำมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์

## 2.4 การหา pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์โคติโนไลติก

### 2.4.1 การหา pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์โคติเนส

นำสารตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 มาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ ส่วนผสมใน  
สารก่อกิจกรรมตามข้อ 2.2.1 นำไปปมที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้  
บัฟเฟอร์แตกต่างกันตั้งแต่ 3.5 ถึง 8.5 ดังนี้ 0.1 M Citric acid-0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> สำหรับ  
pH 3.5-5.5 และ 0.1 M Tris-HCl สำหรับ pH 6.0-8.5 แล้วนำมาหาค่าความว่องไว  
ของเอนไซม์

### 2.4.2 การหา pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์โคโตไบเอส

นำสารตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 มาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ ส่วนผสมใน  
2.2.2 ปมที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 5 นาที โดยใช้บัฟเฟอร์แตกต่างกันตั้งแต่ 3.5 ถึง  
8.5 ดังนี้ 0.1 M Citric acid-0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> สำหรับ pH 3.5-5.5 และ 0.1 M Tris-  
HCl สำหรับ pH 6.0-8.5 แล้วนำมาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์

## 2.5 การหาการคงสภาพของเอนไซม์ไคติโนไลติกเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ

### 2.5.1 การหาการคงสภาพของเอนไซม์ไคติเนส

นำสารตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 มาแบ่งเป็น 3 ส่วน นำแต่ละส่วนไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง (28), 4 และ  $-20^{\circ}\text{C}$  ตามลำดับ โดยทำการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส ตามข้อ 2.2.1 ทุก ๆ 5 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

### 2.5.2 การหาการคงสภาพของเอนไซม์ไคโตไบเอส

นำสารตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 มาแบ่งเป็น 3 ส่วน นำแต่ละส่วนไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง (28), 4 และ  $-20^{\circ}\text{C}$  ตามลำดับ โดยทำการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส ตามข้อตามข้อ 2.2.2 ทุก ๆ 5 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน

## 2.6 วิธีการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติโนไลติก

### 2.6.1 วิธีการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติเนส

การศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติเนสโดยใช้สารตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 ผสมกันในสารก่อกปฏิกิริยาซึ่งมีไคตินที่มีปริมาณแตกต่างกัน คือ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 มก./มล. นำไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ตามข้อ 2.2.1 แล้วนำผลที่ได้ไปเขียนกราฟ Lineweaver - Burk double reciprocal plot แสดงความสัมพันธ์ของ  $1/[S]$  และ  $1/V$  เพื่อหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์ไคติเนส

### 2.6.2 วิธีการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ไคโตไบเอส

การศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ไคโตไบเอสโดยใช้สารตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 ผสมกันในสารก่อกปฏิกิริยา ซึ่งมี *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamininide ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 6 ความเข้มข้นคือ 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 mM นำไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ ตาม ข้อ 2.2.2 แล้วนำผลที่ได้ไปเขียนกราฟ Lineweaver-Burk double reciprocal plot แสดงความสัมพันธ์ของ  $1/[S]$  และ  $1/V$  เพื่อหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์ไคโตไบเอส

## 2.7 การบริสุทธิ์เอนไซม์โคติโนไลติก

### 2.7.1 การกำจัดสารที่มีโมเลกุลเล็กออกโดยการกรองด้วย Ultrafiltration

นำเลือดที่เตรียมได้จากข้อ 2.1.2 มากำจัดสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่า 30,000 Da ออกโดยใช้หลอดปั่นเหวี่ยงเพื่อกรองสาร (Centricon concentrator) เบอร์ 30 ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที และทำการเจือจางสารดังกล่าวถึง 3 เท่า เพื่อให้กำจัดสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กให้ได้มากที่สุด ทั้งนี้เพื่อลดปริมาตรของสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นมากขึ้นเหมาะที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป และสารที่ผ่านการกรองด้วย Centricon-30 แล้วนำมาทำให้เข้มข้นอีกครั้งด้วย ultrafiltration ที่กำจัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,000 Da นำไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสอง

### 2.7.2 การทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน

ซึ่ง Sephadex G-200 9 กรัม แขนในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เทส่วนที่แขวนลอยอยู่ทั่วไปแล้วเติมบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-HCl pH 7.0 ติดตั้งระบบต่างของโครมาโตกราฟีไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 °C บรรจุเจลคอลัมน์ ขนาด 2 X 84 ซม. ซึ่งมีปริมาตรเนื้อเจลจากการแทนที่น้ำ 294 มล. ปรับการเรียงตัวของเม็ดเจลในคอลัมน์ให้สมดุลด้วยการชะโดยบัฟเฟอร์เดิมวัดโดยปริมาตรปริมาณ 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ให้มีอัตราไหล 13 มล./ชม. ด้วย hydrostatic pump จากนั้นหาปริมาตรของเหลวออกเจล (Void volum) โดยใช้ blue dextran MW. 2,000,000 Da และ หาปริมาตรรวมทั้งหมดของคอลัมน์โดยการใช้  $K_2Cr_2O_7$  MW. 294 Da วิเคราะห์ประสิทธิภาพและคุณลักษณะการแยกสารจากคอลัมน์โดยใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันดังนี้ ribonuclease A MW. 13,700 Da, albumin MW. 67,000 Da, ferritin 440,000 Da และ thyroglobulin 669,000 Da ทำการชะด้วยบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-HCl ที่มีส่วนผสมของ 0.2 M NaCl pH 7.0 โดยเก็บสารละลายที่ชะออก 2.6 มล./หลอด ด้วยเครื่องเก็บสารแยกส่วน (fraction collector) นำไปวัด OD<sub>280</sub> นาโนเมตร หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย ( $K_{av}$ ) ของโปรตีนมาตรฐานโดยใช้สูตร

$$K_{av} = V_e - V_o / V_t - V_o$$

$K_{av}$  = ค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย ซึ่งเป็นค่าคงที่เฉพาะของสาร

$V_0$  (elution volum) = ปริมาตรสารที่ถูกชะ

$V_0$  (void volum) = ปริมาตรของของเหลวที่อยู่รอบ ๆ เจล

$V_t$  (total volum) = ปริมาตรของของเหลวทั้งหมดในคอลัมน์

นำค่า  $K_{av}$  ที่หาได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\log$  ของน้ำหนักโมเลกุลกับ  $K_{av}$  เพื่อใช้เป็นมาตรฐาน ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส

ทำการแยกเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอสจากตัวอย่างเลือดกึ่งที่ผ่านการกรองจาก 7.2.1. ค่อย ๆ หยอดสารตัวอย่างปริมาตร 9 มล. ลงในคอลัมน์ที่ยังคงสภาพเดิม เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมา 2.6 มล./หลอด เช่นเดียวกับการแยกโปรตีนมาตรฐานนำสารละลายแต่ละหลอดมาหาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส

รวมสารละลายจากหลอดทดลองที่ตรวจพบค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส นำสารละลายที่รวมกันมาทำการวิเคราะห์รวมหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการของ Lowry และหาค่าความว่องไวของเอนไซม์อีกครั้งหลังจากผ่านการแยกด้วยเลพิลเตรชันเพื่อคำนวณหาค่าปริมาณเอนไซม์ที่ได้กลับคืนมา รวมทั้งค่าความว่องไวจำเพาะ

### 2.7.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน

ซึ่ง DEAE sephadex A - 50 ปริมาณ 6 กรัม แขนในบัฟเฟอร์ 25 mM tris-HCl pH 7.0 ตั้งทิ้งไว้ให้เจลพองตัว และต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 2 ชม. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ติดตั้งระบบต่างของโครมาโตกราฟฟีไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 °ซ แล้วบรรจุลงคอลัมน์แก้วขนาด 2.0 X 10 ซม. มีปริมาตรจากการแทนที่น้ำ 35 มล. จากนั้นจึงปรับสมดุลของคอลัมน์โดยบัฟเฟอร์ เดิมปริมาตร 3 เท่า ของปริมาตรคอลัมน์ด้วยอัตราการไหล 10 มล./ชั่วโมง

นำสารตัวอย่างจากข้อ 7.2.2 ปริมาตร 9 มล. ค่อย ๆ หยอดลงในคอลัมน์ชะสารที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 25 mM Tris-HCl pH 7.0 เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาในหลอดแก้วปริมาตร 5 มล./หลอด ด้วยเครื่องเก็บสารแยกส่วน (fraction collector) เมื่อปริมาณโปรตีนจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร มีค่าเป็นศูนย์ ทำการชะ

โปรตีนที่เกาะอยู่ในคอลัมน์แบบเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเรื่อย ๆ (linear gradient) ด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นตั้งแต่ 0.0-1.0 M ควบคุมโดยใช้ Maker gradient บรรจุสารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ในบัฟเฟอร์ต่อกับ peristalsis pump กำหนดอัตราการไหลของสาร นำสารละลายแต่ละหลอด มาหาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และกำจัดเกลือและสารอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการออกโดยผ่านถุงไดอะไลซิส หาค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสและโคโตโบเอส

รวมสารละลายจากหลอดทดลองที่ตรวจพบค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสองนำสารละลายที่รวมกันมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry และหาค่าความว่องไวของเอนไซม์อีกครั้งหลังจากผ่านโครมาโตกราฟฟีแบแลกเปลี่ยนประจุ เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณเอนไซม์ที่ได้กลับคืนมา รวมทั้งค่าความว่องไวจำเพาะ

### 3. ผลการทดลอง

#### 3.1 ผลการเตรียมตัวอย่างจากเลือดกึ่งกลาดำ

การเตรียมตัวอย่าง จากเลือดกึ่งกลาดำที่มีส่วนผสมของสาร K-199 ปริมาตร 40 มล. มาปั่นด้วยความเร็ว 6,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เลือดจะถูกแบ่งเป็นสองส่วนดังนี้ ส่วนใสตอนบนคือซีรัมมีปริมาตร 37 มล. และส่วนตะกอนคือส่วนของเม็ดเลือดปริมาตร 13 มล. พบว่า ปริมาณโปรตีน และปริมาณของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส ส่วนใหญ่อยู่ในซีรัม ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ผลการหาปริมาณโปรตีน และค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอส ในเลือดกึ่งกลาดำ

| สารตัวอย่าง       | ส่วนใส (ซีรัม) | ส่วนตะกอน (เม็ดเลือด) |
|-------------------|----------------|-----------------------|
| โปรตีน (มก.)      | 3,085          | 528                   |
| โคติเนส (ยูนิต)   | 6.5            | 1.25                  |
| โคโตไบเอส (ยูนิต) | 151            | 6                     |

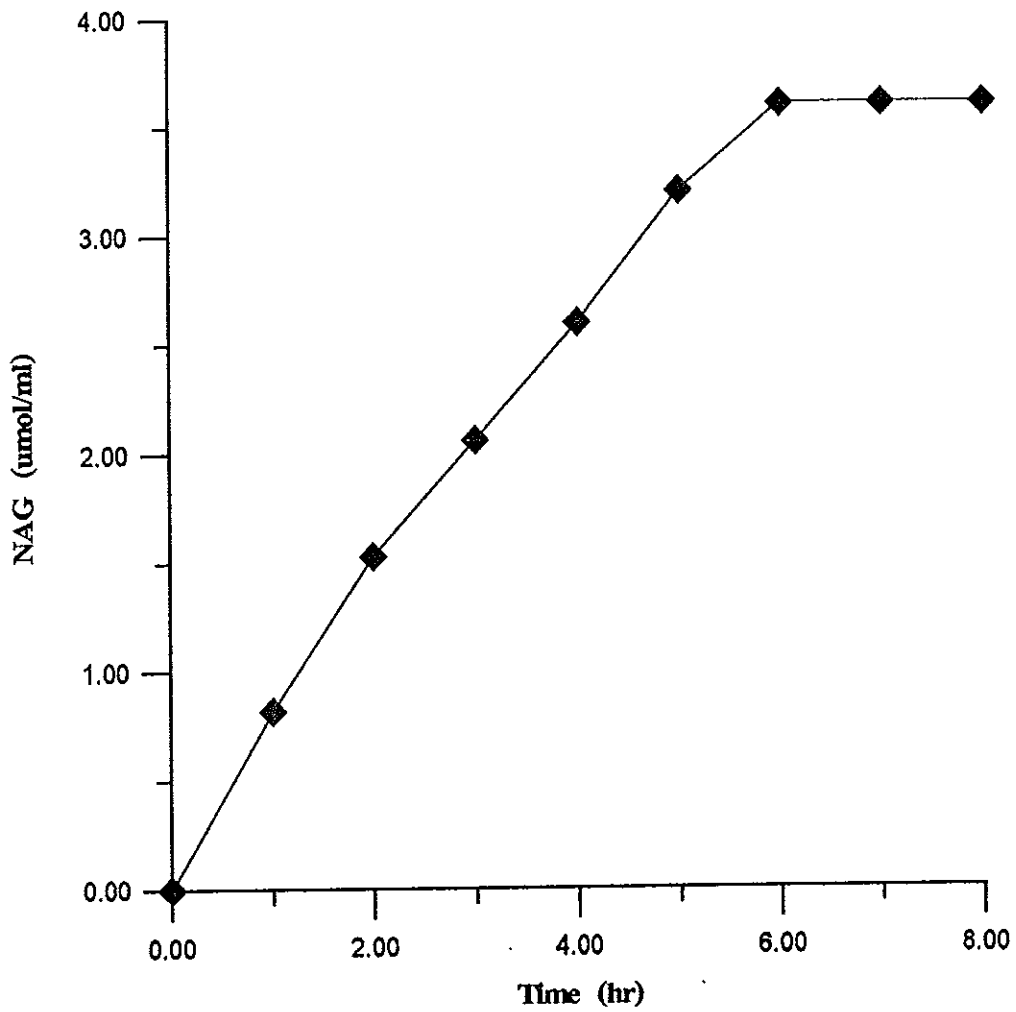
#### 3.2 การหาความว่องไวของเอนไซม์โคติโนไลติก

##### 3.2.1 การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส

ความว่องไว (Activity) ของเอนไซม์โคติเนสใช้วิธีการตรวจวัดโดยดัดแปลงวิธีการของ Jeuniaux, (1966) นำเอนไซม์ตัวอย่างจากข้อ 2.1.1 มาหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสตามหัวข้อที่ 2.2.1 นำไปบ่ม ที่เวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ และกำหนดให้ 1 ยูนิต เท่ากับ 1  $\mu\text{mol}$  ของ NAG ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์ในเวลา 1 ชั่วโมง ใน 0.1 M Citric acid-0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 40 °ซ

จากการทดลอง พบว่า เวลาที่เหมาะสมในการหาความว่องไวเริ่มต้น (Initial velocity) ของเอนไซม์โคติเนส เท่ากับ 1-4 ชั่วโมง ดังผลกราฟในรูปที่ 3.1



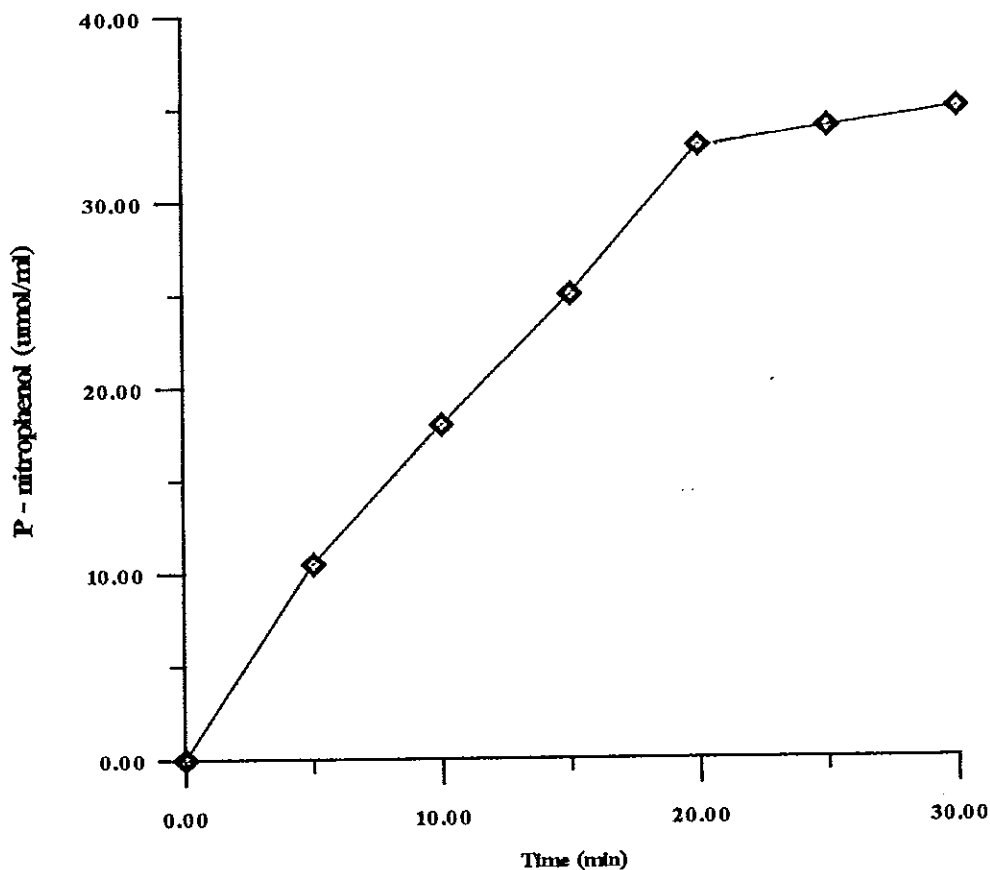


รูปที่ 3.1 ผลของค่าความว่องไวเริ่มต้นของเอนไซม์โคติเนส โดยวัดจากผลิตผล NAG ( $\mu\text{mol/ml}$ ) ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์โคติเนส และกำหนดหน่วยเวลาเป็น ชั่วโมง

### 3.2.2 การหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคโตไบเอส

การหาค่าความว่องไว (Activity) ของเอนไซม์ไคโตไบเอส ตามข้อ 2.2.2 โดยป่มที่เวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาทีตามลำดับ ใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ของ *p*-nitrophenol ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของเอนไซม์ไคโตไบเอส โดยกำหนดให้ 1 ยูนิต เท่ากับ 1 ไมโครโมล ของ *p*-nitrophenol ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์ในเวลา 10 นาที ใน 0.1 M Citric acid - 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 5.5 ที่อุณหภูมิ 50 °ซ

จากการทดลอง พบว่า เวลาที่เหมาะสมในการหาค่าความว่องไวเริ่มต้น (Initial velocity) ของเอนไซม์ไคโตไบเอส เท่ากับ 10 นาที ดังผลกราฟในรูปที่ 3.2

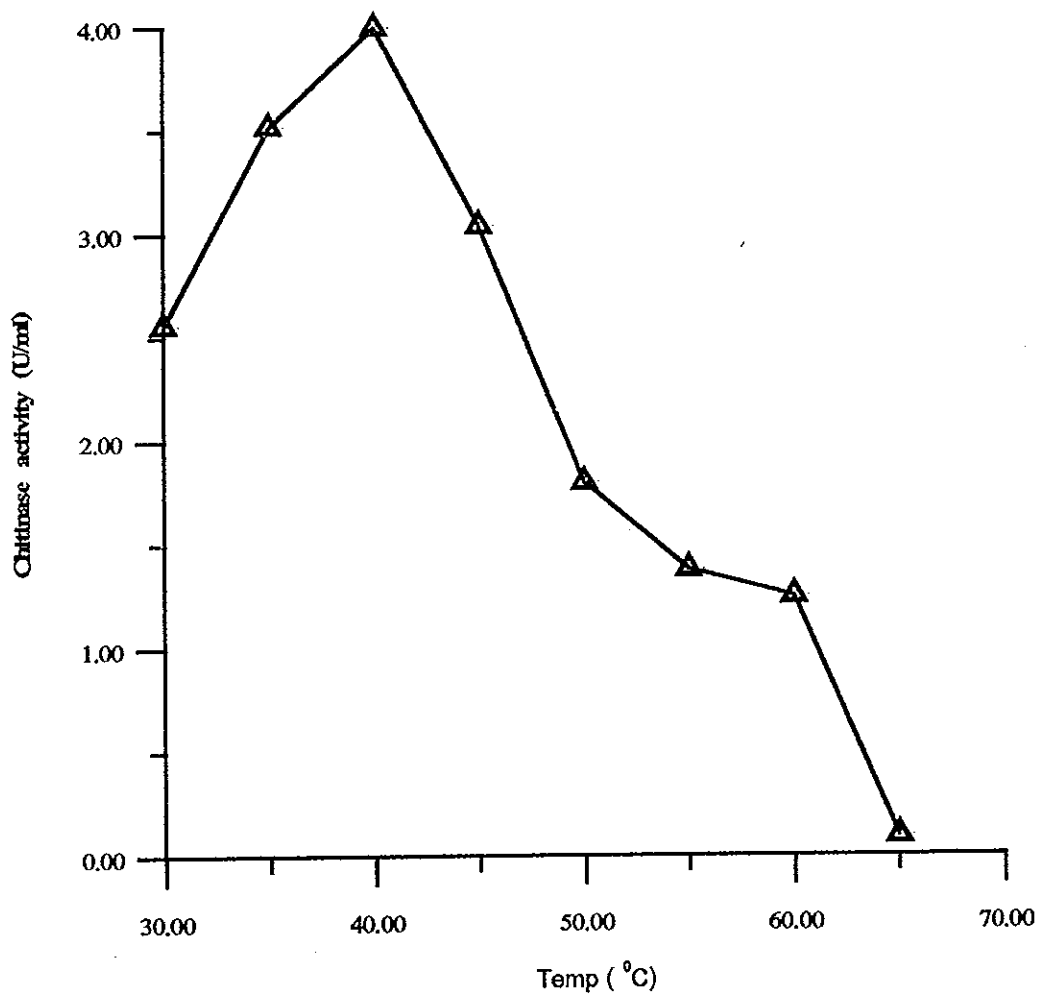


รูปที่ 3.2 ผลของความว่องไวเริ่มต้นของเอนไซม์ไคโตไบเอส วัดจากผลิตภัณฑ์ *p*-nitrophenol ( $\mu\text{mol/ml}$ ) ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส และกำหนดหน่วยเวลาเป็นนาที

### 3.3 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความว่องไวของเอนไซม์ไคติโนไลติก

#### 3.3.1 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส

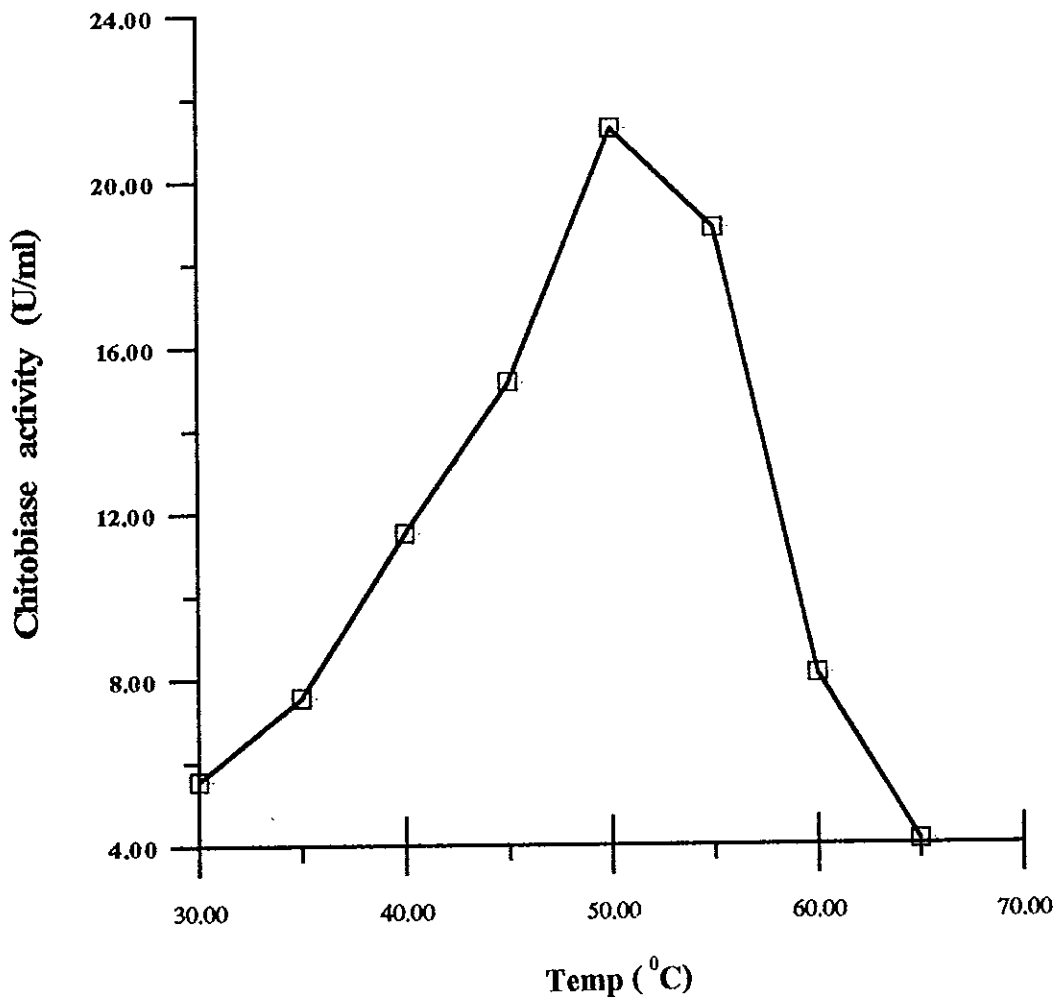
ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนสในซีรัมของเลือดกิ้งกูดดำ โดยใช้เวลาในการบ่มสารก่อนปฏิกริยานาน 2 ชั่วโมง พบว่า มีความว่องไวสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 °ซ ดังผลในกราฟรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสม กับความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส เมื่อนำสารก่อนปฏิกริยาบ่มที่อุณหภูมิ 30 - 65 °ซ

### 3.3.2 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความว่องไวของเอนไซม์ ไคโตไบเอส

ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อความว่องไวของเอนไซม์ไคโตไบเอส  
ในซีรัมของเลือดกึ่งกลาดำ โดยใช้เวลาในการปม 5 นาที พบว่ามีความว่องไวสูงสุดที่  
อุณหภูมิ 50 °ซ ดังผลในกราฟรูปที่ 3.4

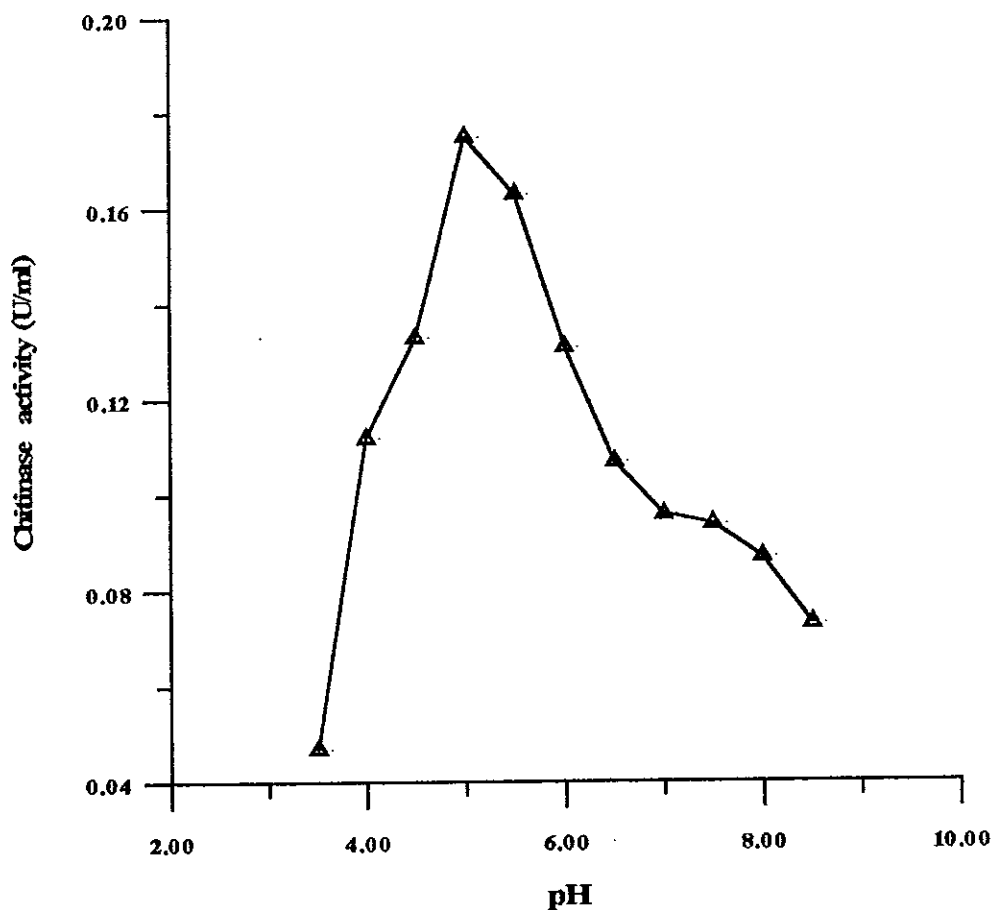


รูปที่ 3.4 กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสม กับความว่องไวของเอนไซม์ไคโตไบเอส เมื่อนำ  
สารก่อบปฏิกิริยาปมที่อุณหภูมิ 30 - 65 °ซ

### 3.4. ผลการทดสอบ pH ที่เหมาะสมกับความว่องไวของเอนไซม์ไคติโนไลติก

#### 3.4.1 ผลการทดสอบ pH ที่เหมาะสมกับความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส

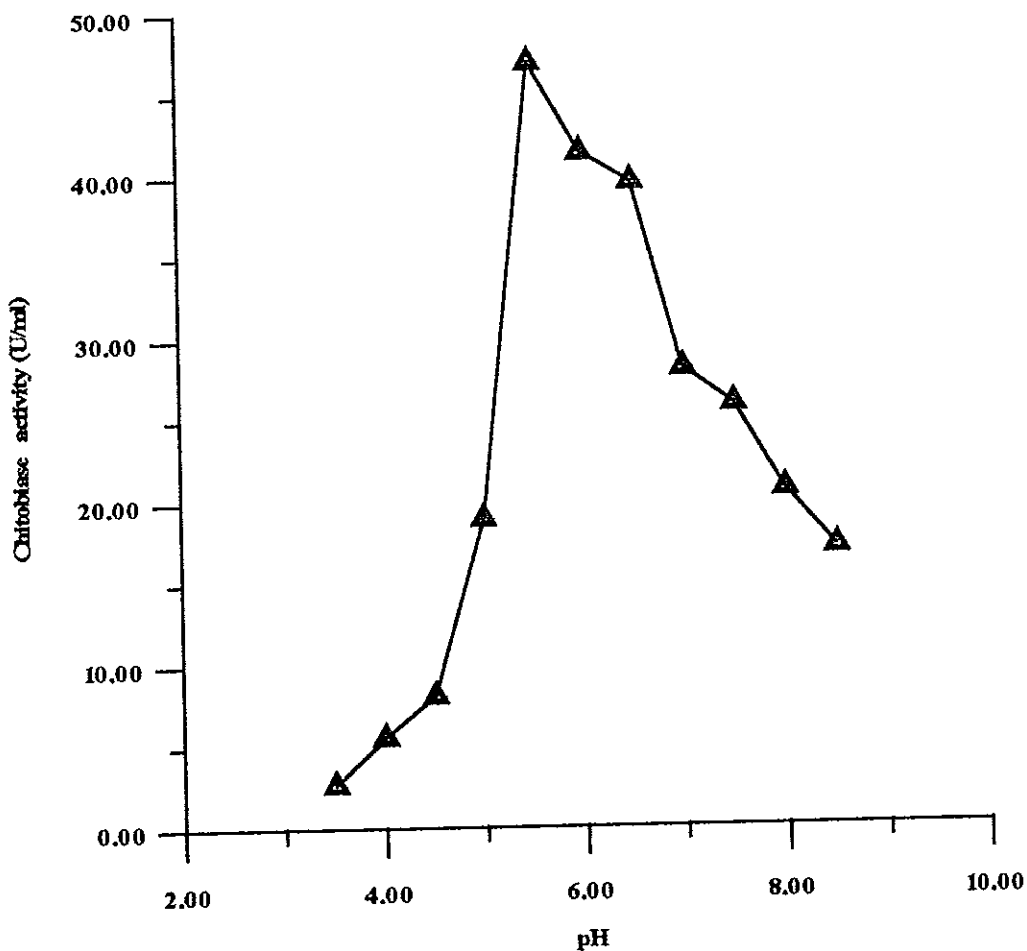
ผลการทดสอบ pH ที่เหมาะสมกับความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนสในซีรัมจากเลือดกึ่งกลาดำ โดยใช้เวลาในการปมสารก่อนปฏิกิริยา 4 ชั่วโมง ใน บัฟเฟอร์แตกต่างกัน ตั้งแต่ 3.5 ถึง 8.5 ดังนี้ 0.1 M Citric acid - 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  สำหรับ pH 3.5 - 5.5 และ 0.1 M Tris-HCl สำหรับ pH 6.0 - 8.5 พบว่า ค่าความว่องไวสูงสุดที่ pH 5.0 ดังผลกราฟในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 กราฟแสดง pH ที่เหมาะสม กับความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนส เมื่อนำสารก่อนปฏิกิริยา ปมที่ pH 3.5 - 8.5

### 3.4.2 ผลการทดสอบ pH ที่เหมาะสมกับความว่องไวของเอนไซม์ไคโตไบเอส

ผลการทดสอบ pH ที่เหมาะสมกับความว่องไวของเอนไซม์ไคโตไบเอสในซีรัมของเลือดกิ้งกูดดำ โดยใช้เวลาในการป้อนสารก่อนปฏิกิริยา 10 นาที บัฟเฟอร์แตกต่างกันตั้งแต่ 3.5 ถึง 8.5 ดังนี้ 0.1 M Citric acid - 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  สำหรับ pH 3.5 - 5.5 และ 0.1 M Tris-HCl สำหรับ pH 6.0 - 8.5 พบว่า ค่าความว่องไวสูงสุดที่ pH 5.5 ดังผลกราฟในรูปที่ 3.6

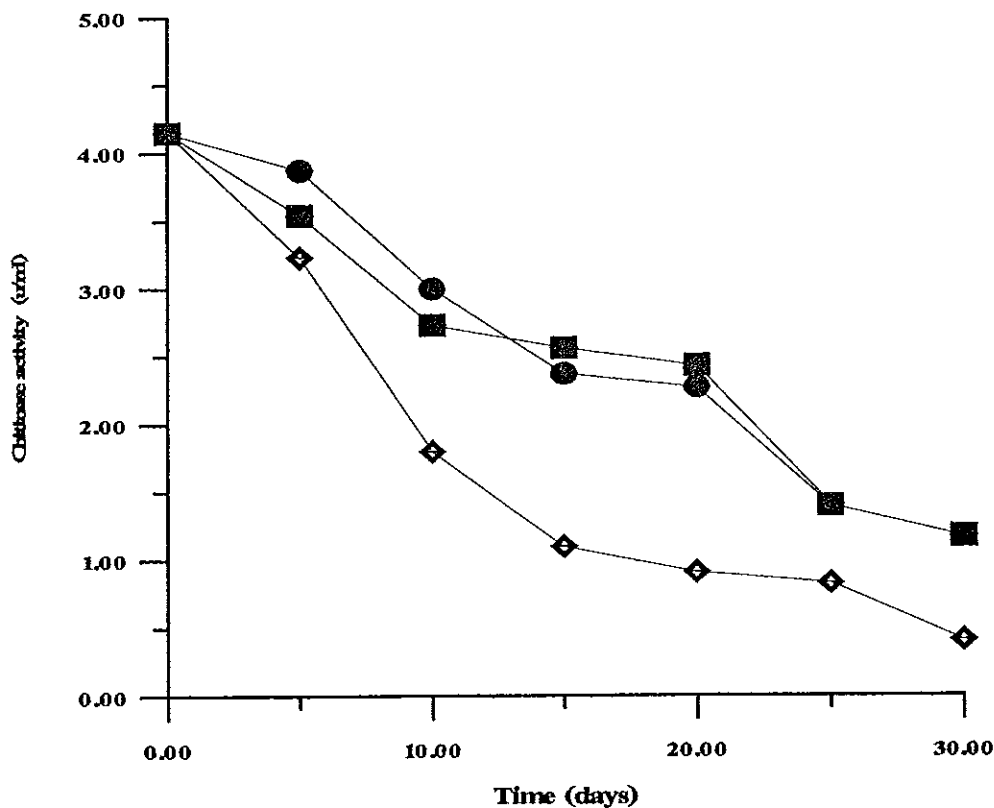


รูปที่ 3.6 กราฟแสดง pH ที่เหมาะสม กับความว่องไวของเอนไซม์ไคโตไบเอส เมื่อนำสารก่อนปฏิกิริยาป้อนที่ pH 3.5 - 8.5

### 3.5 ความคงสภาพของเอนไซม์โคติโนไลติกเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ

#### 3.5.1 ความคงสภาพของเอนไซม์โคติเนสเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ

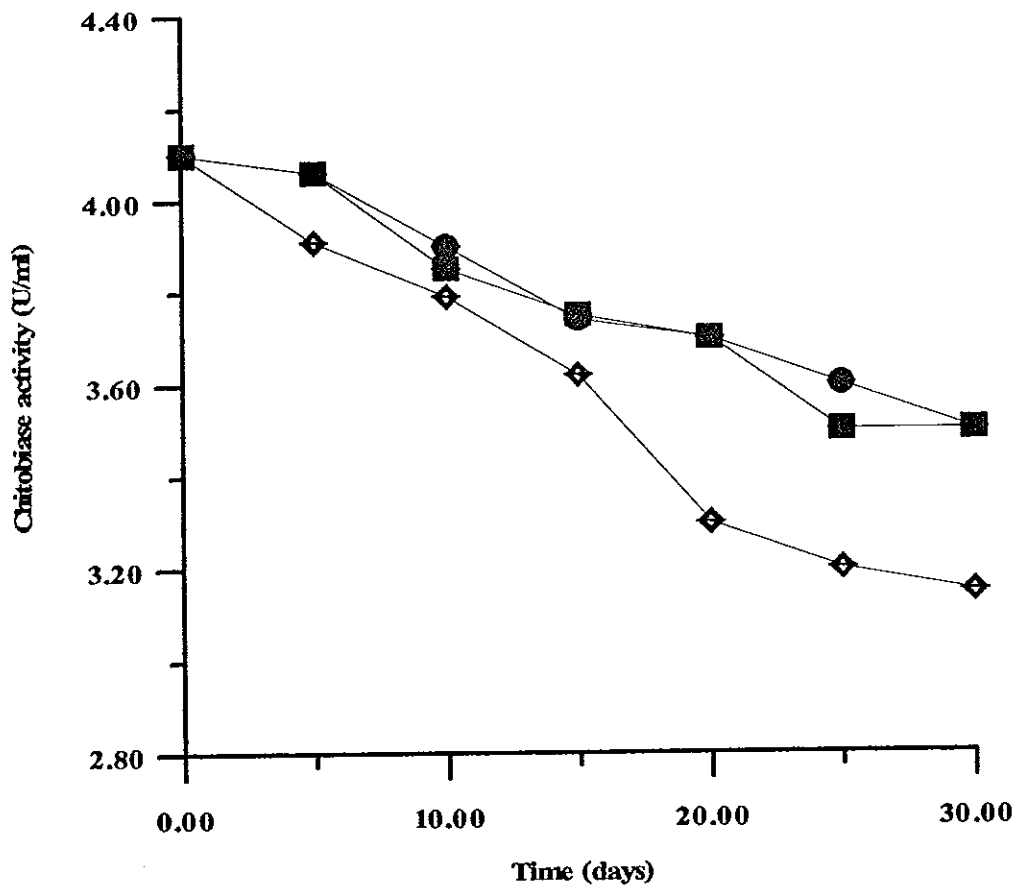
ผลการศึกษาความคงสภาพของเอนไซม์โคติเนส เมื่อนำเอนไซม์โคติเนสเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ ที่ อุณหภูมิ 28, 4, -20 °ซ โดยนำมาตรวจหาค่าความว่องไว ทุก ๆ 5 วันเป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์โคติเนสที่จัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ -20 °ซ ไม่มีความแตกต่างกัน จากความว่องไวเริ่มต้น 4.1 ยูนิต/มล. เหลือค่าความว่องไว 1.4 ยูนิต/มล. หรือมีการสูญเสียค่าความว่องไวไป 65 % ส่วนเอนไซม์โคติเนสที่เก็บที่อุณหภูมิต้องมีค่าความว่องไว 0.4 ยูนิต/มล.พบว่า มีการสูญเสียความว่องไวไป 90 % เมื่อเก็บเอนไซม์ดังกล่าวไว้เป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 3.7 กราฟแสดงผลการคงสภาพของเอนไซม์โคติเนสจากserumของเลือดกิ้งกูดดำเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต้อง 28 °ซ (◆) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ (■) และ -20 °ซ (●)

### 3.5.2 ผลของความคงสภาพของเอนไซม์โคโตไบเอสเมื่อเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ผลการศึกษาความคงสภาพของเอนไซม์โคโตไบเอส เมื่อนำเอนไซม์เก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ ที่อุณหภูมิ 28, 4, -20 °ซ โดยนำมาตรวจสอบหาค่าความว่องไว ทุก ๆ 5 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์โคโตไบเอสที่จัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 และ -20 °ซ ไม่มีความแตกต่างกัน จากความว่องไวเริ่มต้น 4.2 หน่วย/มล. เหลือค่าความว่องไว 3.5 หน่วย/มล.หรือยังคงมีค่าความว่องไวเหลืออยู่ 86 % ส่วนเอนไซม์โคโตไบเอส ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องยังคงมีค่า ความว่องไว 3.15 หน่วย/มล. ซึ่งมีการสูญเสียความว่องไวไป 22 % เมื่อเก็บเอนไซม์ดังกล่าวไว้เป็นเวลา 1 เดือน



รูปที่ 3.8 กราฟแสดงผลการคงสภาพของเอนไซม์โคโตไบเอสจากซีรัมจากเลือดกึ่งกลาดำ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง 28 °ซ (◆) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ (■) และ -20 °ซ (●)



### 3.6 สมบัติทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติโนไลติก

#### 3.6.1 สมบัติทางจลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติเนส

##### 3.6.1.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารตั้งต้นต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

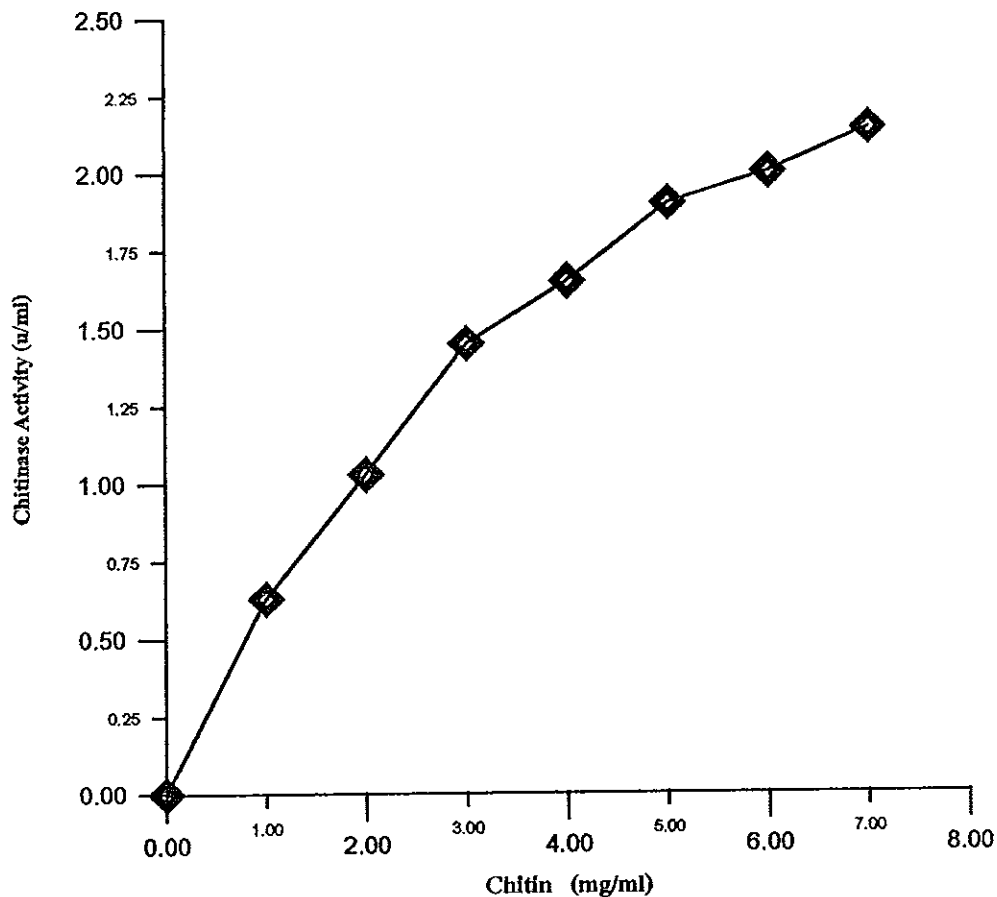
ผลจากการนำเอนไซม์ไคติเนสมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่มีปริมาณไคติโนแตกต่างกัน คือ 1, 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 มก./มล. แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์ไคติเนสได้ 0.63, 1.03, 1.45, 1.58, 1.9, 1.98 และ 2.14 ยูนิต/มล. ดังแสดงในตารางที่ 3.2 นำผลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความว่องไวกับปริมาณของไคติโน ดังแสดงในรูปที่ 3.9

ตารางที่ 3.2 ผลของการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติเนสจากเลือดกุ้งกุลาดำ โดยแปรปริมาณไคติโน จาก 1.0 - 7.0 มก./มล

| Chitin (mg/ml) | Activity (U/ml) | 1/[S] (mg/ml) <sup>-1</sup> | 1/V (U/ml) |
|----------------|-----------------|-----------------------------|------------|
| 1              | 0.63            | 1                           | 1.58       |
| 2              | 1.03            | 0.5                         | 0.97       |
| 3              | 1.45            | 0.33                        | 0.69       |
| 4              | 1.58            | 0.25                        | 0.63       |
| 5              | 1.9             | 0.2                         | 0.53       |
| 6              | 1.98            | 0.17                        | 0.51       |
| 7              | 2.14            | 0.14                        | 0.47       |

$$1/K_m = 0.28 \text{ (มก./มล.)}^{-1} ; K_m = 3.57 \text{ มก./มล.}$$

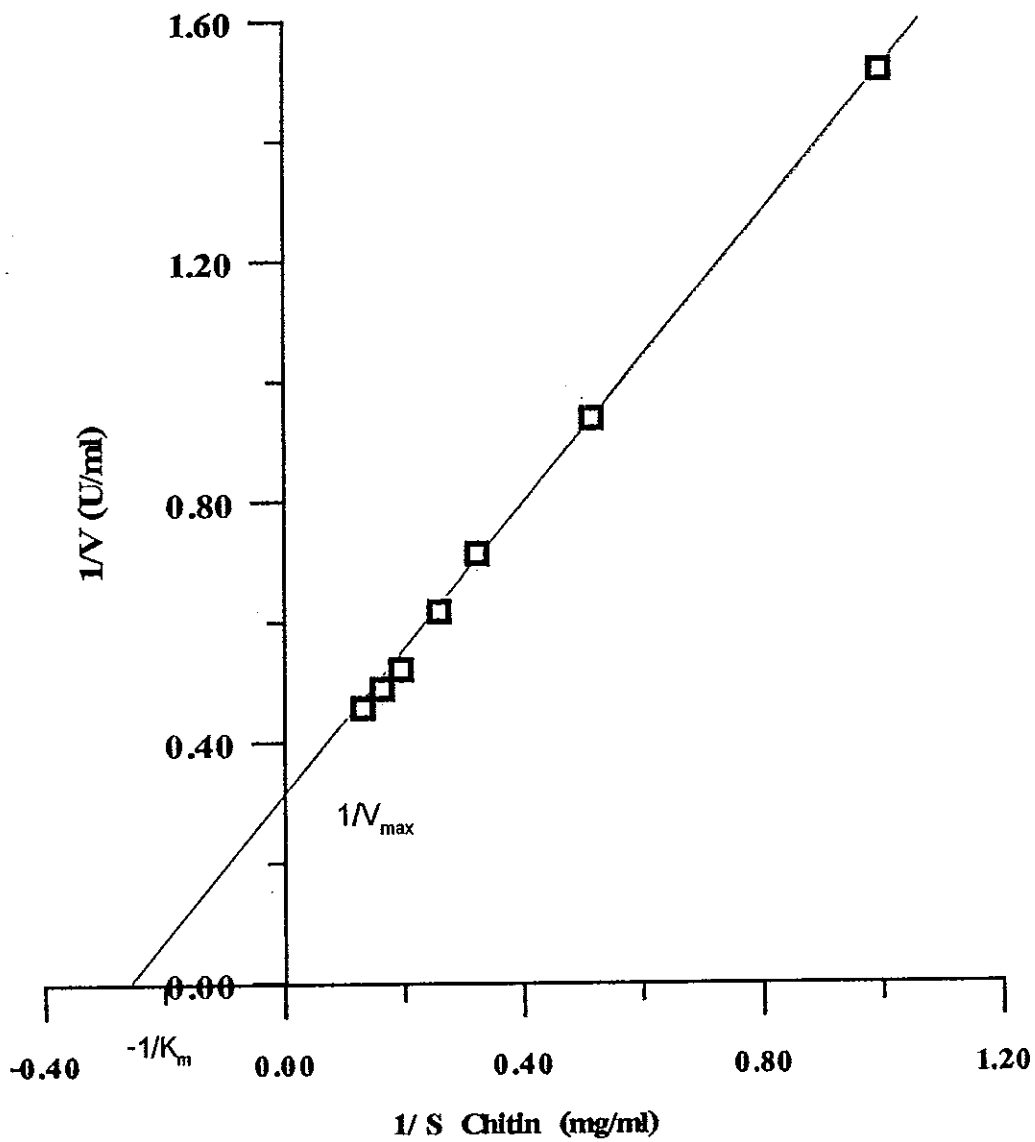
$$1/V_{\max} = 0.32 \text{ (ยูนิต/มล.)}^{-1} ; V_{\max} = 0.32 \text{ (ยูนิต/มล.)}$$



รูปที่ 3.9 กราฟแสดงความว่องไวของเอนไซม์ไคตินเนส เมื่อใช้สารตั้งต้นที่มีปริมาณแตกต่างกันตั้งแต่ 1 - 7 มก./มล. ตามลำดับ

### 3.6.1.2 ผลการหาพารามิเตอร์ $K_m$ และ $V_{max}$ ของเอนไซม์ไคตินเนส

เมื่อเขียนกราฟระหว่างค่าส่วนกลับของอัตราเร็วของปฏิกิริยา ( $1/V$ ) กับส่วนกลับของความเข้มข้นของสารตั้งต้น ( $1/[S]$ ) Lineweaver-Burk double reciprocal plot จะได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงมีค่าความชัน (slope) เท่ากับ  $K_m/V_{max}$  จุดตัดบนแกนตั้ง เท่ากับ  $1/V_{max}$  เท่ากับ  $0.32$  (ยูนิต/มล.)<sup>-1</sup>, และจุดตัดบนแกนนอน เท่ากับ  $1/K_m$  มีค่าเท่ากับ  $0.28$  (มก./มล.)<sup>-1</sup> ทำให้คำนวณหาค่าอัตราเร่งปฏิกิริยามีความเร็วสูงสุด ( $V_{max}$ ) ของเอนไซม์ไคตินเนสเท่ากับ  $3.13$  ยูนิต/มล. และค่าสัมพรรคภาพของการจับของเอนไซม์กับสารตั้งต้น ( $K_m$ ) เท่ากับ  $3.57$  มก./มล. ดังที่แสดงไว้ในรูปที่ 3.10



รูปที่ 3.10 กราฟแสดงการหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์ไคติเนส

$$1/K_m = 0.28 \text{ (มก/มล.)}^{-1} ; K_m = 3.57 \text{ มก/มล. และ}$$

$$1/V_{max} = 0.32 \text{ (ยูนิต/มล.)}^{-1} ; V_{max} = 3.13 \text{ ยูนิต/มล.}$$

### 3.6.2 สมบัติทางจลศาสตร์ของเอนไซม์โคโตไบเอส

#### 3.6.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา

ผลจากการนำเอนไซม์โคโตไบเอสมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่มี

ความเข้มข้น ของ *p*-nitrophenyl-N-acetyl-glucosaminide แตกต่างกัน 6 ความเข้มข้น, คือ 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, mM แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที นำไปหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอสได้ 0.203, 0.376, 0.808, 1.013, 1.349 และ 1.464 ยูนิต/มล. ดังแสดงในตารางที่ 3.2 นำผลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความว่องไวกับความเข้มข้นของโคโตไบเอสดังแสดงในรูปที่ 3.11

#### 3.6.2.2 ผลการหาพารามิเตอร์ $K_m$ และ $V_{max}$ ของเอนไซม์โคโตไบเอส

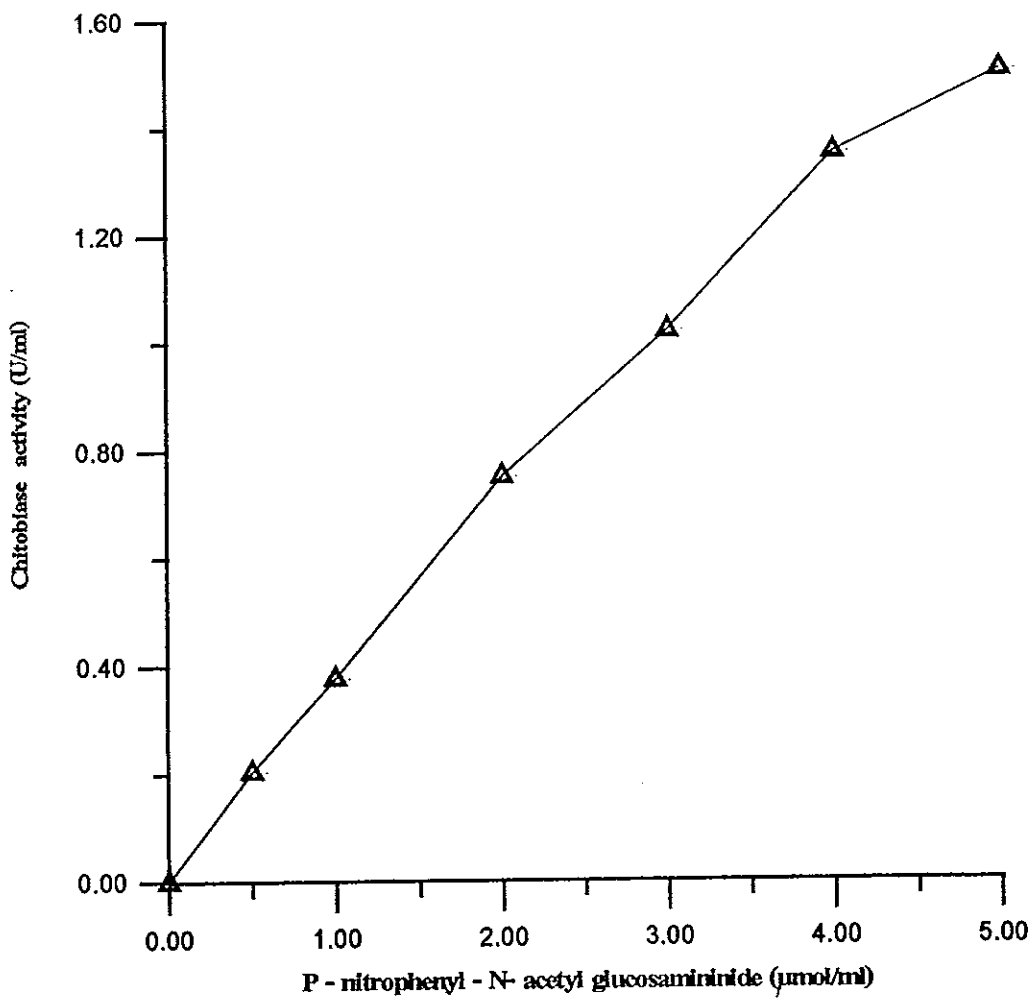
เมื่อเขียนกราฟระหว่างค่าส่วนกลับของอัตราเร็วของปฏิกิริยา ( $1/V$ ) กับส่วนกลับของความเข้มข้นของสารตั้งต้น ( $1/[S]$ ) Lineweaver-Burk double reciprocal plot จะได้กราฟที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงมีค่าความชัน (slope) เท่ากับ  $K_m/V_{max}$  จุดตัดบนแกนตั้ง เท่ากับ  $1/V_{max}$  เท่ากับ 0.02 , และจุดตัดบนแกนนอน เท่ากับ  $1/K_m$  มีค่าเท่ากับ  $0.09 \text{ (mM)}^{-1}$  ทำให้คำนวณหาค่าอัตราเร่งปฏิกิริยามีความเร็วเร็วสูงสุด ( $V_{max}$ ) ของเอนไซม์โคโตไบเอสเท่ากับ 5.0 ยูนิต/มล. และค่าสัมพรรคภาพของการจับของเอนไซม์กับสารตั้งต้น ( $K_m$ ) เท่ากับ 11 mM ดังแสดงในรูปที่ 3.12

ตารางที่ 3.3 ผลของการศึกษาจลศาสตร์ของเอนไซม์โคโตไบเอสจากเลือดกึ่งกุลาดำ

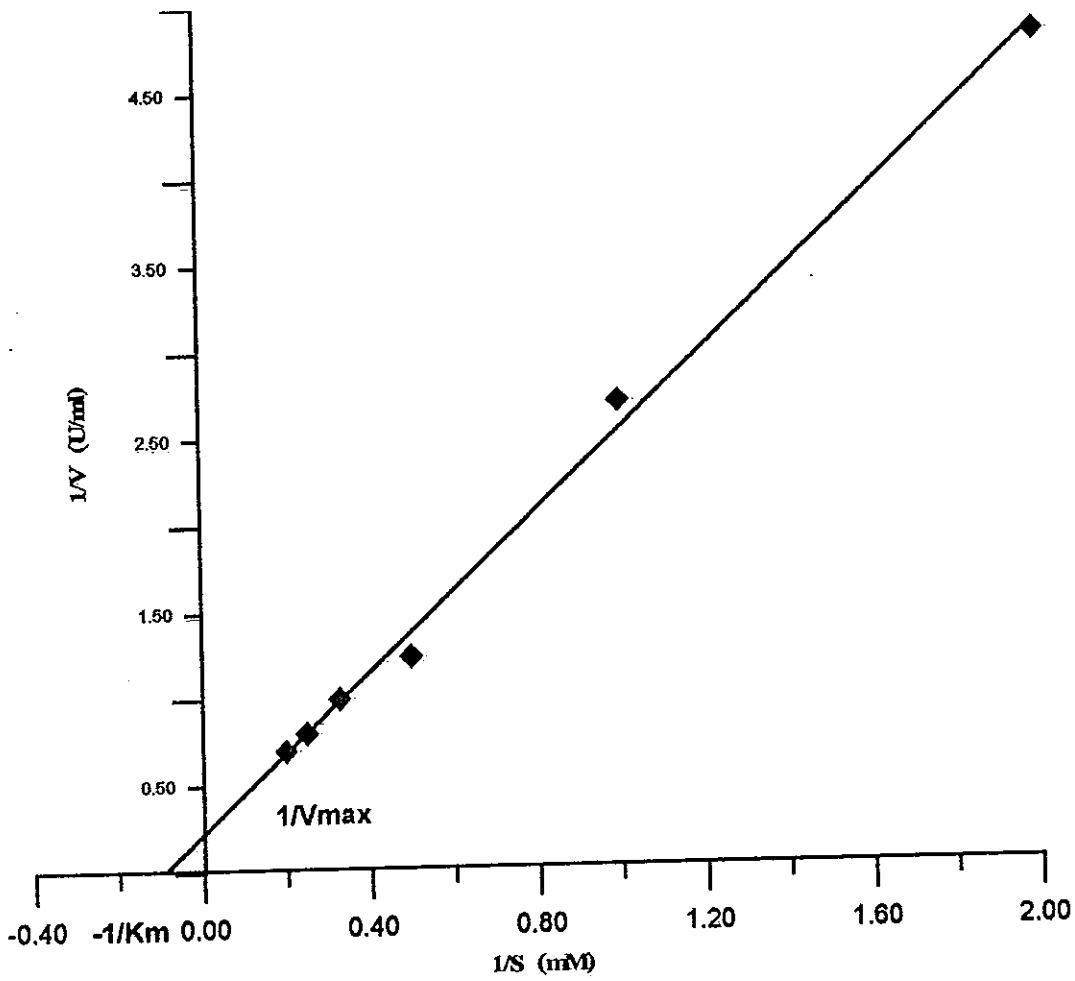
โดยแปรความเข้มข้นของ *p*-nitrophenyl-N-acetyl-glucosaminide จาก

0.5 - 5.0 mM

| <i>p</i> -NAG (mM) | Activity (U/ml) | $1/[S](\text{mM})^{-1}$ | $1/V \text{ (U/ml)}^{-1}$ |
|--------------------|-----------------|-------------------------|---------------------------|
| 0.5                | 0.203           | 2                       | 4.394                     |
| 1                  | 0.376           | 1                       | 2.61                      |
| 2                  | 0.808           | 0.5                     | 1.24                      |
| 3                  | 1.013           | 0.33                    | 0.987                     |
| 4                  | 1.349           | 0.25                    | 0.741                     |
| 5                  | 1.464           | 0.2                     | 0.683                     |



รูปที่ 3.11 กราฟแสดงความว่องไวของเอนไซม์ไคโตไบเอส เมื่อใช้สารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นต่างกัน ตั้งแต่ 0.5 - 5.0 mM



รูปที่ 3.12 กราฟแสดงการหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์โคโคโตไบเอส

$$1/K_m = 0.09 \text{ (mM)}^{-1} \quad ; \quad K_m = 11 \text{ mM} \quad \text{และ}$$

$$1/V_{max} = 0.2 \text{ (ยูนิต/มล.)}^{-1} \quad ; \quad V_{max} = 5 \text{ ยูนิต/มล.}$$

### 3.7 ผลของการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์โคติโนไลติก

#### 3.7.1 การแยกสารที่มีขนาดเล็กด้วยการกรองด้วย Ultrafiltration

ผลจากการแยกสารที่มีขนาดเล็กที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าและสูงกว่า 30,000 Da ออกจากกัน เพื่อกำจัดโปรตีนส่วนที่ไม่ต้องการออก โดยการนำซีรัมที่เตรียมจาก 2.1.2 ซึ่งเจือจางด้วยน้ำกลั่นสัดส่วน 2 ต่อ 1 ปริมาตร 21 มล. มีเอนไซม์โคติเนส 10.5 ยูนิต และมีเอนไซม์โคติเนส 25.2 ยูนิต กรองด้วย Centricon – 30 ซึ่งแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 Da และเติมบัฟเฟอร์ 41 มล. เพื่อเจือจางสารตัวอย่างให้ผ่านการกรองได้มากที่สุด ปริมาตรของซีรัมที่ไม่สามารถกรองผ่านเมมเบรนได้ 8 มล. และส่วนที่ผ่านการกรองปริมาตร 54 มล. ซึ่งนำไปทำให้เข้มข้นอีกครั้งด้วย Ultrafiltration ที่แยกสารที่มีขนาดโมเลกุล 3,000 Da จนเหลือปริมาตร 14 มล. พบว่า มีเอนไซม์โคติเนสทั้งสองส่วน ซึ่งส่วนที่กรองผ่านเมมเบรนมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30,000 Da เท่ากับ 2.38 ยูนิต และส่วนที่ไม่สามารถกรองผ่านเมมเบรนได้ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 30,000 Da เท่ากับ 6.88 ยูนิต ส่วนโคโตไบเอสไม่สามารถกรองผ่านเมมเบรนได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.4 เมื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวมาหาปริมาณโปรตีนของโคติเนสและโคโตไบเอสเท่ากับ 1,473 และ 1,440 มก. ตามลำดับ และความว่องไวรวมของโคติเนสและโคโตไบเอสเท่ากับ 9.28 และ 22.24 ยูนิตตามลำดับ และค่าความว่องไวจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส เท่ากับ 0.006 และ 0.015 ยูนิต/มก.โปรตีน และได้ปริมาณเอนไซม์สุทธิของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส เท่ากับ 88.38 และ 88.25 % ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ทั้งสองเท่ากับ 1 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และ 3.6

ตารางที่ 3.4 แสดงปริมาณเอนไซม์โคติโนไลติกที่ผ่านการกรองด้วย Centricon – 30

| น้ำหนักโมเลกุล<br>(Da) | โคติเนส<br>(ยูนิต) | โคโตไบเอส<br>(ยูนิต) |
|------------------------|--------------------|----------------------|
| มากกว่า<br>30,000      | 6.88               | 22.4                 |
| ต่ำกว่า<br>30,000      | 2.38               | -                    |

### 3.7.2 ผลการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน Sephadex G - 200

นำสารตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วย Centricon-30 ปริมาตร 8 มล. มีค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส เท่ากับ 9.26 และ 22.24 ยูนิตามลำดับ ผ่านคอลัมน์ Sephadex G - 200 ซึ่งมีช่วงของการแยกสาร 5,000-600,000 Da ขนาดคอลัมน์ 2 X 84 ซม. ใน 25 mM Tris-HCl ใน 0.2 M โซเดียมคลอไรด์ pH 7.0 อัตราการไหล 13 มล./ชั่วโมง เก็บสารที่ถูกระยะ 2.6 มล. ต่อหลอดนำสารละลายที่ได้แต่ละหลอดไปวัด OD<sub>280</sub> และหาค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอส ดังแสดงในรูปที่ 3.13 ซึ่งมีโปรตีนถูกระยะออกเป็นพีคใหญ่ และกว้างเพียงพีคเดียว ผลจากการตรวจสอบค่าความว่องไวของเอนไซม์ทั้งสอง พบว่า มีเอนไซม์โคติเนสสองพีคโดยพีคแรกจะพบบริเวณกึ่งกลางของพีคโปรตีน ซึ่งมีค่าความว่องไวสูงสุดหลอดที่ 54 ส่วนพีคที่สองพบตรงส่วนปลายของพีค ซึ่งมีค่าความว่องไวสูงสุดหลอดที่ 75 และเอนไซม์โคโตไบเอสพบตรงส่วนปลายของพีคมีค่าความว่องไวสูงสุดในหลอดที่ 67 และเอนไซม์ทั้งสองยังไม่สามารถแยกออกจากกันได้

นำสารตัวอย่างที่มีค่าความว่องไวมารวมกันจากหลอดที่ 45-72 ได้ปริมาตร 43 มล. และนำมากำจัดเกลือโดยใช้ถุงไดอะไลซิส หลังจากนั้นนำมาทำให้เข้มข้นโดยใช้แป้งผง CM - cellulose เป็นตัวดูดซับ จนเหลือปริมาตร 9 มล. มีค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์โคติเนส เท่ากับ 7.88 ยูนิต และค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์โคโตไบเอส เท่ากับ 19.89 ยูนิต มีปริมาณโปรตีนของโคติเนสและโคโตไบเอส เท่ากับ 622 และ 585 มก. ตามลำดับ ค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส เท่ากับ 0.013 และ 0.034 ยูนิต/มก.โปรตีน และได้ปริมาณเอนไซม์สุทธิเท่ากับ 75.04 และ 29.4 % ตามลำดับ มีค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส เท่ากับ 2.17 และ 2.27 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และ 3.6



### 3.7.3 ผลของโครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE sephadex

#### A - 50

นำสารตัวอย่างที่ผ่านเจลฟิลเตรชัน Sephadex G - 200 ปริมาตร 9 มล. มีค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอส เท่ากับ 7.88 และ 19.89 หน่วยตามลำดับ ทำให้บริสุทธิ์โดยแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE sephadex A-50 ขนาดคอลัมน์ 2 X 12 ซม. ซึ่งมีปริมาตรเจล เท่ากับ 35 มล. ใน 25 mM Tris-HCl pH 7.0 ในอัตราการไหล 10 มล./ชั่วโมง เก็บสารตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บสารแยกส่วน หลอดละ 5 มล. หลังจากใช้บัฟเฟอร์ล้างเอาส่วนที่ไม่จับกับ DEAE sephadex A - 50 ออกหมดแล้ว จะเอาสารตัวอย่างที่จับอยู่กับตัวแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้ 0-1.0 M โซเดียมคลอไรด์ ใน 25 Tris-HCl pH 7.0 โดยเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเรื่อย ๆ (linear gradient) พบว่า ทั้งโคติเนสและโคโตไบเอสจะถูกชะออกมาในช่วงที่มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.35-0.5 M นำสารตัวอย่างที่ได้แต่ละหลอดไปหาโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และค่าความว่องไวของเอนไซม์ ดังรูปที่ 3.14

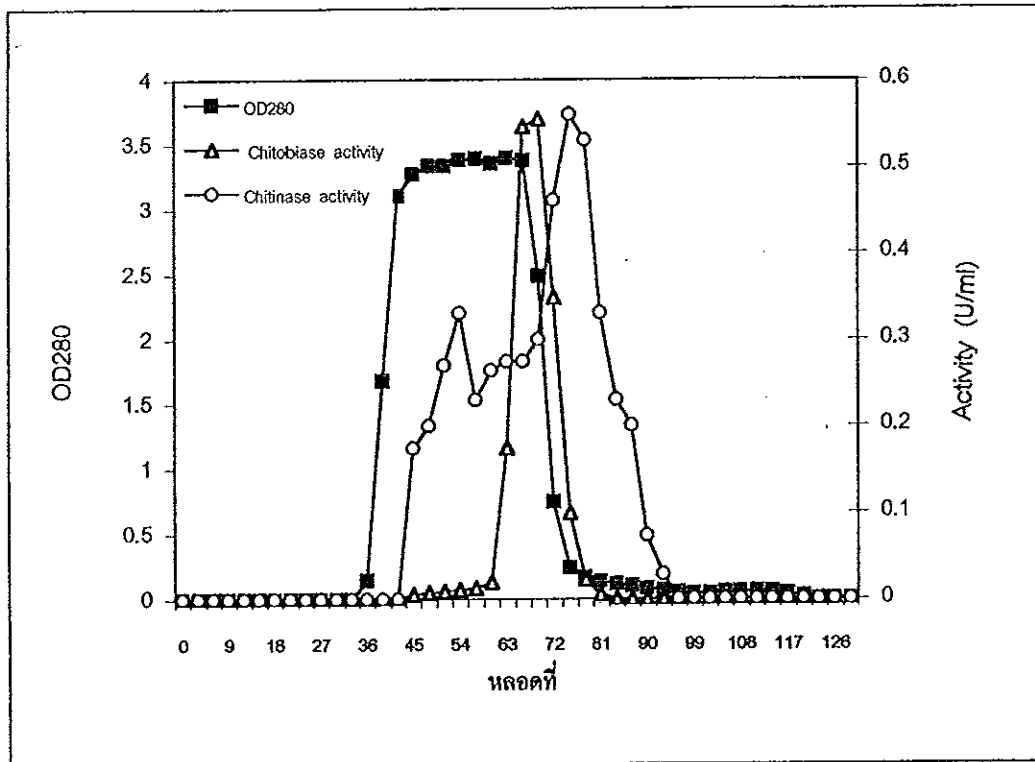
นำสารตัวอย่างที่มีค่าความว่องไวรวมกันจากหลอดที่ 31-34 มล. ได้ปริมาตร 20 มล. นำมากำจัดเกลือโดยใช้ถุงไดอะไลซิส มีค่าความว่องไวรวมของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส เท่ากับ 6.63 และ 15.80 หน่วย ตามลำดับ มีปริมาณโปรตีนของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส เท่ากับ 64.5 และ 27.6 มก. ตามลำดับ ค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส เท่ากับ 0.11 และ 0.572 หน่วย/มก.โปรตีน และได้ปริมาณเอนไซม์กลับคืนจากสารเริ่มต้นของเอนไซม์ทั้งสองร้อยละ 63.14 และ 62.70 ค่าความบริสุทธิ์ ของเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอส เท่ากับ 18.33 เท่า และ 38 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 3.5 และ 3.6

ตารางที่ 3.5 แสดงปริมาณสุทธิของเอนไซม์โคติเนสที่แยกให้บริสุทธิ์ แต่ละขั้นตอน

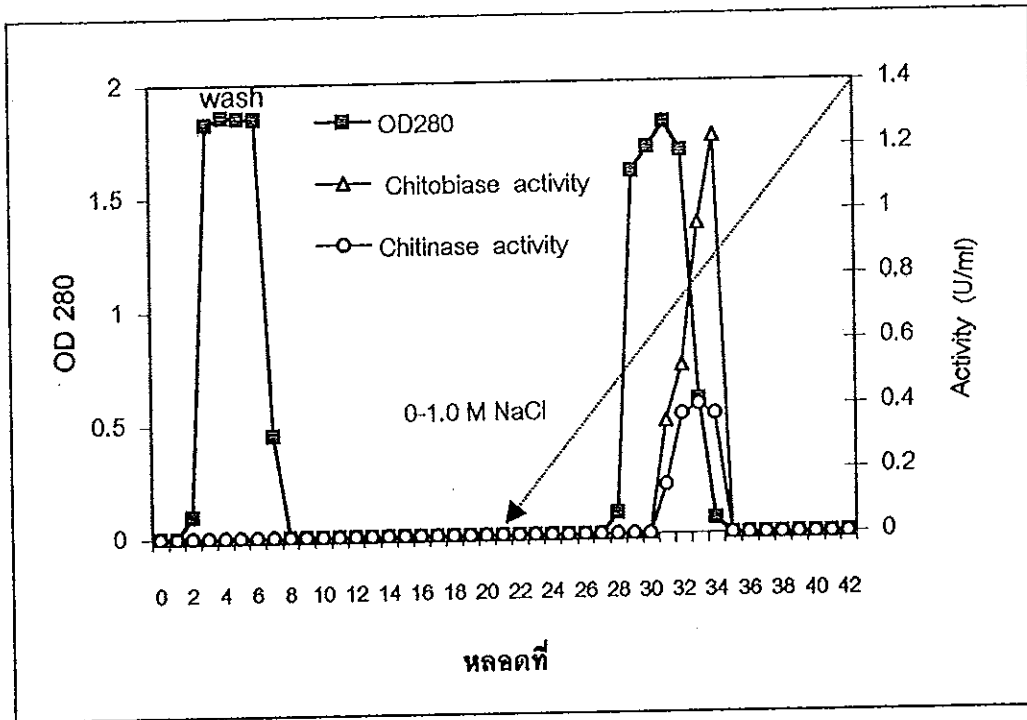
| ขั้นตอนการทำให้<br>บริสุทธิ์ | โปรตีน<br>(มก.) | ความ<br>ว่องไว<br>(ยูนิต) | ความว่องไว<br>จำเพาะ<br>(ยูนิต/มก.โปรตีน) | ปริมาณ<br>สุทธิ<br>(%) | ค่าความ<br>บริสุทธิ์<br>(เท่า) |
|------------------------------|-----------------|---------------------------|---|------------------------|--------------------------------|
| Crude                        | 1,680           | 10.5                      | 0.006                                     | 100                    | 1                              |
| Filtration                   | 1,473           | 9.26                      | 0.006                                     | 88.38                  | 1                              |
| Sephadex G-200               | 622             | 7.88                      | 0.013                                     | 75.04                  | 2.17                           |
| DEAE Sephadex<br>A-50        | 64.5            | 6.63                      | 0.11                                      | 63.14                  | 18.33                          |

ตารางที่ 3.6 แสดงปริมาณสุทธิของเอนไซม์โคโตโบเอสที่แยกให้บริสุทธิ์แต่ละขั้นตอน

| ขั้นตอนการทำให้<br>บริสุทธิ์ | โปรตีน<br>(มก.) | ความ<br>ว่องไว<br>(ยูนิต) | ความว่องไว<br>จำเพาะ<br>(ยูนิต/มก.โปรตีน) | ปริมาณ<br>สุทธิ<br>(%) | ค่าความ<br>บริสุทธิ์<br>(เท่า) |
|------------------------------|-----------------|---------------------------|---|------------------------|--------------------------------|
| Crude                        | 1,680           | 25.2                      | 0.015                                     | 100                    | 1                              |
| Filtration                   | 1,440           | 22.24                     | 0.015                                     | 88.25                  | 1                              |
| Sephadex G-200               | 585             | 19.89                     | 0.034                                     | 78.93                  | 2.27                           |
| DEAE Sephadex<br>A-50        | 27.6            | 15.8                      | 0.572                                     | 62.7                   | 38                             |



รูปที่ 3.13 แสดงผลการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไคตินเนสโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบ gel filtration sephadex G - 200 มีความสามารถในการแยกสาร 5,000 - 600,000 ขนาดคอลัมน์ 2 X 84 ซม. ใน 25 mM Tris-HCl ใน 0.2 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ pH 7.0 ด้วยความเร็ว 13 มล.ต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 2.6 มล.



รูปที่ 3.14 แสดงผลการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไคตินโนไลติก โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟี

แบบแลกเปลี่ยนประจุ DEAE sephadex A - 50 ขนาดคอลัมน์ 2 X 12 ซม. ใน 25 mM บัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก pH 7.0 ด้วยความเร็ว 10 มล.ต่อ ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 5 มล. พีก 1 เป็น โปรตีนที่ไม่ แลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE sephadex A - 50 พีก 2 เป็น โปรตีนที่แลกเปลี่ยน ประจุกับ DEAE sephadex A - 50 ที่ถูกชะด้วย 0.0 - 1.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ ใน 25 mM บัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก

### 3.8 ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไคตินเนสและไคโตไบเอสโดยการผ่าน

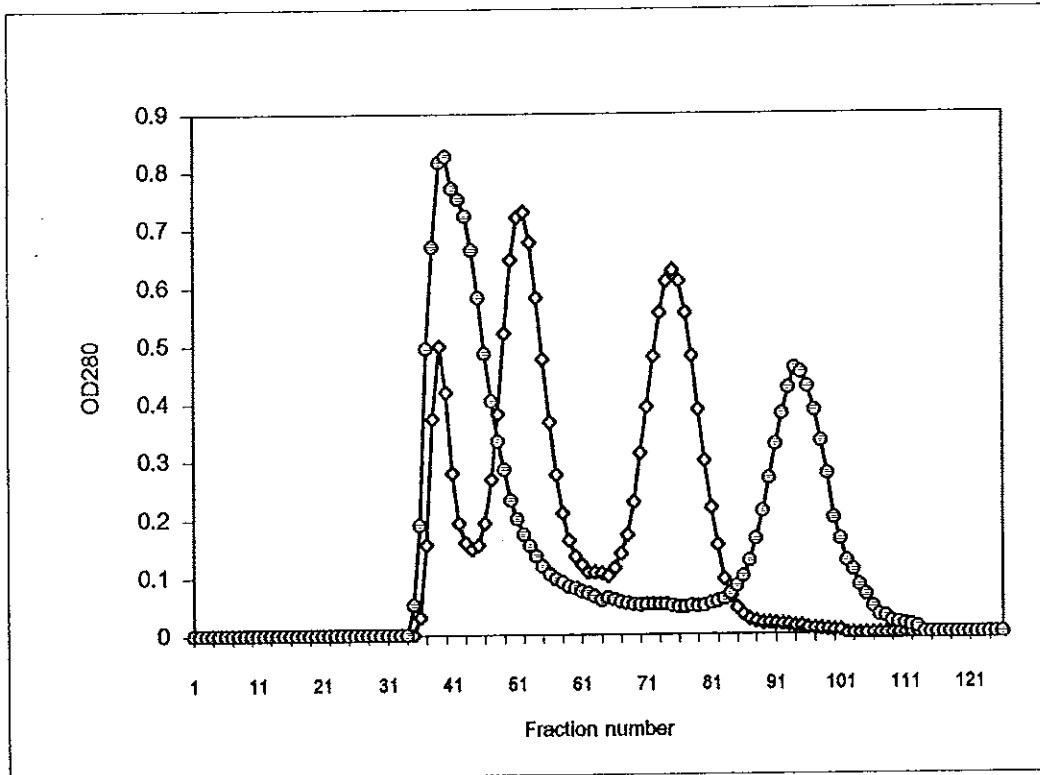
#### Gelfiltration sephadex G - 200

ผลจากการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน G-200 มาเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานมาตรฐาน ดังที่แสดงในรูปที่ 3.15 ประกอบด้วย 4 ชนิด คือ Ribonuclease A (MW. 13,700 Da) ปริมาตรระ 244 มล., Albumin (MW. 67,000 Da) ปริมาตรระ 195 มล. Ferritin (MW. 232,000Da) ปริมาตรระ 135 มล. และ Thyroglobulin (MW. 669,000 Da) ปริมาตรระ 104 มล. ส่วนไคตินเนสฟิคแรกมีปริมาตรระ 140.4 และไคตินเนสฟิคที่สองมีปริมาตรระ 195 มล. และไคโตไบเอส มีปริมาตรระ 174 มล. ดังแสดงในตารางที่ 3.7 เมื่อนำผลที่ได้คำนวณตามสูตรการหาค่า  $K_{av}$  และนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $K_{av}$  กับ Log MW. แล้วนำสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไคตินเนสในสภาพธรรมชาติน่าจะประกอบด้วย 3 ไอโซไซม์ ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 199,000 และ 50,000 Da และยังมีส่วนที่ผ่านการกรองด้วย Centricon-30 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 Da ส่วนไคโตไบเอสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 83,000 Da ดังที่แสดงในรูปที่ 3.16

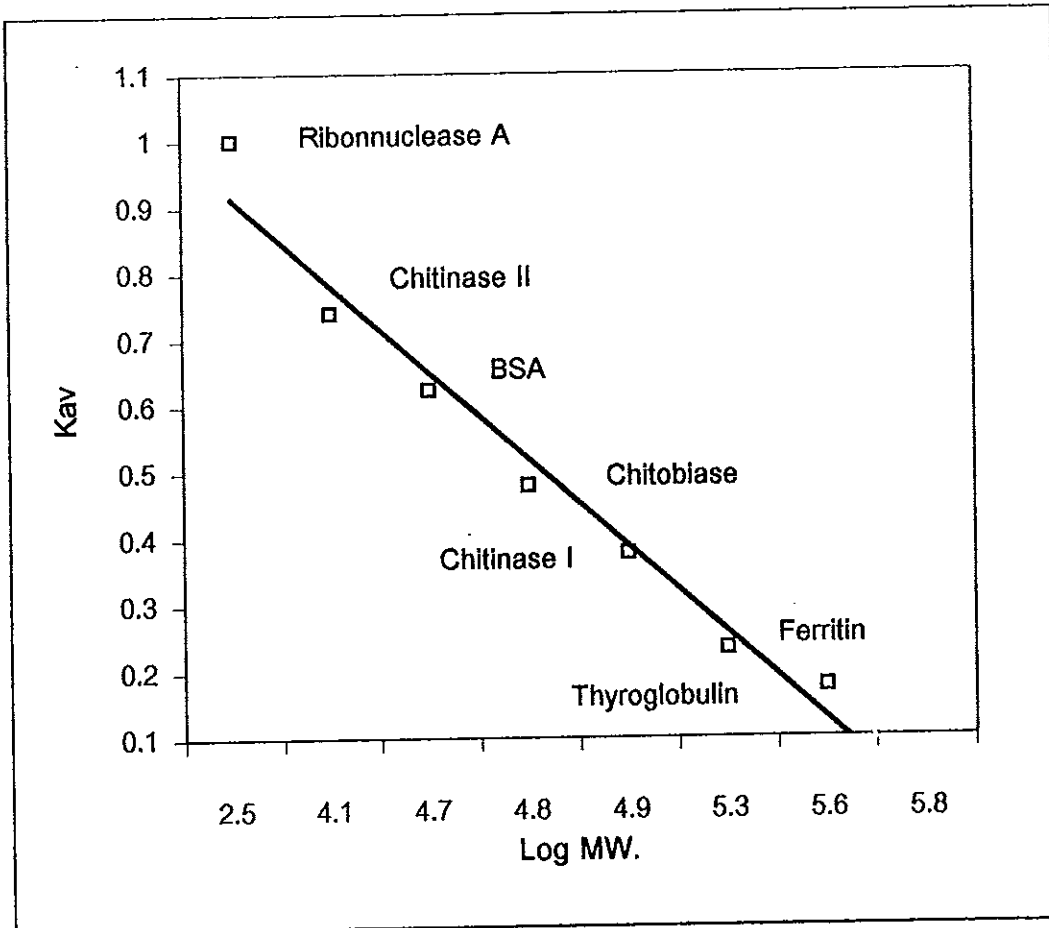
ตารางที่ 3.7 ค่า  $K_{av}$  ที่คำนวณได้จากปริมาตรระ ( $V_o$ ) ของโปรตีน และสารตัวอย่าง

แต่ละชนิดของคอลัมน์ Sephadex G-200

| สารตัวอย่าง          | MW.(Da)   | Log MW. | $K_{av}$ | $V_o$ |
|----------------------|-----------|---------|----------|-------|
| Blue dextran         | 2,000,000 | -       | -        | 101   |
| Potassium dichromate | 294       | -       | -        | 294   |
| Ribonuclease A       | 13,700    | 2.5     | 0.74     | 244   |
| Albumin              | 67,000    | 4.8     | 0.48     | 195   |
| Ferritin             | 440,000   | 5.6     | 0.176    | 135   |
| Thyroglobulin        | 669,000   | 5.8     | 0.015    | 104   |
| Chitinase I          | 199,000   | 5.3     | 0.2      | 140.4 |
| Chitinase II         | 50,000    | 4.7     | 0.487    | 195   |
| Chitobiase           | 83,000    | 4.9     | 0.378    | 174   |



รูปที่ 3.15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $OD_{280}$  กับโปรตีนมาตรฐานที่ใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน Sephadex G-200 ช่วงของการแยกสาร 5,000-600,000 Da ขนาดคอลัมน์ 2 X 84 ซม. ใน 25 mM Tris-HCl ใน 0.2 M โซเดียมคลอไรด์ pH 7.0 ด้วยความเร็ว 13 มล.ต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาหลอดละ 2.6 มล. (◇) ผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 1 Blue dextran (MW. 2,000,000 Da), Ferritin (MW. 232,000 Da) และ Albumin (MW. 67,000 Da) (○) ผ่านคอลัมน์ครั้งที่ 2 Thyroglobulin (MW. 669,000 Da) และ Ribonuclease A (MW. 137,000 Da)



รูปที่ 3.16 กราฟแสดงน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไคตินเนสและโคโตไบเอสจาก  
เลือดกิ้งกูดำโดยการผ่านเจลฟิลเตรชัน (Sephadex G - 200)

## 4. วิจัยรณ

### 4.1 แหล่งของเอนไซม์ไคติโนไลติกในเลือดกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาปริมาณของเอนไซม์ไคติโนไลติกในเลือดกุ้งกุลาดำ โดยการบั่นเหวียงแยกเม็ดเลือดแดงออกจากซีรัม พบว่า ปริมาณเอนไซม์ไคติเนสและไคโตไบเอสจะมีปริมาณมากในส่วนซีรัมจะมีไคติเนสประมาณ 84 % และไคโตไบเอส 96 % ของเลือดกุ้งทั้งหมด และปริมาณโปรตีนในซีรัม เท่ากับ 3,085 มก. และส่วนเม็ดเลือดเท่ากับ 528 มก. จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองพบในส่วนซีรัม มากกว่าเม็ดเลือดแดง ฉะนั้นการใช้สาร K-199 เพื่อรักษาสภาพเม็ดเลือดสามารถช่วยกำจัดปริมาณโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ไปได้ส่วนหนึ่ง เพื่อไม่ให้ปนเปื้อนกับโปรตีนเอนไซม์ที่ต้องการนำมาศึกษา

### 4.2 คุณสมบัติโดยทั่วไปของเอนไซม์ไคติโนไลติกในสภาพธรรมชาติ

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดก้อนกลม (globular protien) ที่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งมีบริเวณเร่ง (active site) ซึ่งเป็นร่องบนผิวของโมเลกุลที่จับกับสารตั้งต้น ซึ่งสารตั้งต้นนั้นจะถูกยึดไว้โดยแขนงข้างของกรดอะมิโนที่อยู่ในร่อง และถูกชักนำให้เปลี่ยนสภาพได้ง่าย และรวดเร็วเพื่อที่จะเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลผลิตของปฏิกิริยา (Product) แต่อัตราการเร่งของปฏิกิริยาดังกล่าว จะขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาหลายชนิด นอกจากปริมาณของเอนไซม์ และความเข้มข้นของสารตั้งต้นแล้ว ยังมีปัจจัยที่สำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยา คือ pH และ อุณหภูมิ เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่า pH ที่ทำงานได้ดีที่สุดแตกต่างกัน ทั้งนี้เพราะว่า ความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสารตั้งต้น และในการเร่งปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับ ประจุของเอนไซม์หรือสารตั้งต้น ที่ pH ต่ำหรือสูงเกินไปจะทำให้ประจุเปลี่ยนแปลงไป ไม่เหมาะสมที่จะทำปฏิกิริยากัน และถ้า pH ต่ำ หรือ สูงเกินไปอาจมีผลทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้

#### 4.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส และ ไคโตไบเอส

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ การเพิ่มอุณหภูมิจะมีผลต่อการอัตราเร่งปฏิกิริยาทางเคมีของเอนไซม์ จากผลการทดลองดังกล่าวมีการเพิ่มอุณหภูมิจากต่ำไปสูง 30-65 °C พบว่าเมื่อค่อย ๆ เพิ่มอุณหภูมิ อัตราการเร่งปฏิกิริยาค่อย ๆ สูงขึ้น เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเพิ่มพลังงานจลน์ ช่วยทำให้เอนไซม์จับกับ



สารตั้งต้นได้เร็วขึ้น พบว่า เอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ อุณหภูมิ 40 °ซ และ 50 °ซ ตามลำดับ และค่าความว่องไวของปฏิกิริยานี้จะลดลงเมื่อเพิ่ม อุณหภูมิสูงกว่านี้ ทั้งนี้เพราะอุณหภูมิสูงเกินไปมีผลทำให้โครงรูป (Conformation) ของ เอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป (denature) ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลงจน กระทั่งไม่สามารถย่อยสารตั้งต้นได้

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองเหมือนกับแหล่ง เอนไซม์โคติเนสในไลติกหัว ๆ ไป มักทำงานได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 40-50 °ซ เช่น ในตับอ่อนของกุ้ง (*Peneus japonicus*) ทั้งโคติเนสและโคโตไบเอสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 °ซ (Kono, et al., 1990 และ Koga, et al., 1996) และในกลุ่มจุลินทรีย์เช่น *Aeromonas hydrophilla* sub sp. *anarogenes* A-52 เอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอสทำงาน ทำงานได้ ดีที่อุณหภูมิ 45 °ซ และ 50 °ซ ตามลำดับ (Yabuki, et al., 1986) ใน *Aeromonas* sp. CS-34 ทั้งโคติเนสและโคโตไบเอสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 °ซ (เขาวนิพร บุญช่วย, 2538. วรรณมา หงษา, 2538) นอกจากนี้ในกลุ่มเชื้อราเช่น *Trichoderma hazianum* ก็เช่น เดียวกันทั้งโคติเนสและโคโตไบเอส สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 °ซ และ 50 °ซ ตาม ลำดับเช่นเดียวกับในกุ้งกุลาดำ (Ulhoa and Peberly, 1992)

#### 4.2.2 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ โคติเนส และ โคโตไบเอส

โดยทั่วไป pH เป็นปัจจัยสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่า pH ที่ทำงานได้ดีที่สุด (optimum pH) แตกต่างกันไปบ้าง เพราะค่าความสามารถของ เอนไซม์ในการจับกับสารตั้งต้น และในการเร่งปฏิกิริยาอาจขึ้นอยู่กับประจุของเอนไซม์ หรือสารตั้งต้นที่ pH ต่ำหรือสูงเกินไปมักทำให้ประจุเปลี่ยนไปจนไม่เหมาะสมที่จะทำ ปฏิกิริยา หรือถ้าสูงหรือต่ำมากอาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไปด้วย

จากการศึกษาผลของ pH ต่อความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส จากเลือดกุ้งกุลาดำในธรรมชาติ พบว่า สามารถทำงานได้ดีที่ pH เป็นกรดเล็กน้อย คือ pH 4.0-6.5 พบว่าเมื่อเพิ่ม pH สูงขึ้น จาก 3.5-8.0 อัตราการเกิดปฏิกิริยาก็จะเพิ่มขึ้น และ ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 และ 5.5 ตามลำดับ เมื่อเพิ่ม pH สูงกว่านี้จะมีผลทำให้อัตรา การเกิดปฏิกิริยาลดลง ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวเหมือนกับเอนไซม์จากแหล่งอื่นโดยทั่วไป เช่น ตับอ่อนของกุ้ง (*Peneus japonicus*) เอนไซม์โคติเนส เท่ากับ 6.85 (Kono, et al., 1990)

และโคโตไบเอส เท่ากับ 5.0-5.5 (Koga, et al., 1996) กลุ่มจุลินทรีย์ เช่น *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anarogenes* A-52 ทั้งเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส ทำงานได้ดีที่ pH 7 (Yabuki, et al., 1986) และ *Aeromonas* sp. CS-34 ทั้งโคติเนสและโคโตไบเอส ทำงานได้ดี ที่ pH 7.0 (เขานีพร บุญช่วย, 2538. วารณา หงษา, 2538) นอกจากนี้ในกลุ่มเชื้อรา เช่น *Trichoderma hazlanum* เช่นเดียวกันทั้งโคติเนสและโคโตไบเอสสามารถทำงานได้ดีที่ pH 4.0-4.5 และ 5.5 ตามลำดับ (Ulhoa and Peberly, 1992) ผลการทดลองดังกล่าว สอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่โดยทั่วไปมักทำงานได้ดีในช่วง pH 5.0-9.0 ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์จากแหล่งที่ต่างกัน อาจมีคุณสมบัติทางด้านเคมี และกายภาพที่แตกต่างกันด้วย ทั้งนี้เกิดจากชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนที่ต่างกัน เมื่อถูกผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกัน การเปลี่ยนแปลงประจุในโครงสร้าง โมเลกุลเอนไซม์เอง ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์โดยรวมจนทำให้ขาดความเหมาะสมในการจับกับสารตั้งต้นจนทำให้เอนไซม์เสียสภาพไปจนทำงานไม่ได้

#### 4.3 ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส

ระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาการคงสภาพของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอสจากเลือดกุ้งกุลาดำที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่า การคงสภาพของเอนไซม์ที่เก็บที่ 4 °ซ และ 20 °ซ ไม่มีความแตกต่างกัน และมีผลให้การคงสภาพของเอนไซม์ดีกว่าที่เก็บที่อุณหภูมิ 28 °ซ นอกจากนี้ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ทั้งสองดังกล่าว พบว่า ในการเก็บรักษาสภาพเอนไซม์ในสภาวะเดียวกัน เอนไซม์โคโตไบเอสจะคงสภาพดีกว่าโคติเนส กล่าวคือ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ และ 20 °ซ โคติเนสจะคงสภาพอยู่ได้นานประมาณ 20 วัน ในขณะที่โคโตไบเอส สามารถคงสภาพอยู่ได้นานกว่า 30 วัน จะเห็นได้ว่าที่ระยะเวลา 30 วัน ค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนสเหลืออยู่ 35 % และโคโตไบเอสเหลืออยู่ 86 %

#### 4.4 ผลการศึกษาจุลศาสตร์ของเอนไซม์ไคติโนไลติกเอนไซม์

##### 4.4.1 ผลการหาค่า $K_m$ และ $V_{max}$ ของเอนไซม์ไคติเนส

เนื่องจากเอนไซม์ไคติเนสมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิดในกลุ่มของไคติิน และอนุพันธ์ของไคติิน ทำให้ค่า  $K_m$  ต่อสารตั้งต้นแต่ละชนิดแตกต่างกันเปรียบเทียบกันได้ จากการศึกษาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  จากเลือดกุ้งกุลาดำ เมื่อใช้ไคติินผงที่เตรียมจากกระดอง ปลานมึกเป็นสารตั้งต้น มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 3.57 มก./มล. และ  $V_{max}$  เท่ากับ 3.13 ยูนิต/มล. ค่าพารามิเตอร์ดังกล่าวเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไคติเนสจากแหล่งอื่นที่ใช้สารตั้งต้นเป็นที่เตรียมเหมือนกันแต่เตรียมจากเปลือกกุ้ง เช่น *Drosophila hydei* มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 5 มก./มล. (Spindler,1976) และ *Aeromonas hydrophila* sub sp. *anaerogenes* A.52 มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 2.8 มก./มล. พบว่า มีค่า  $K_m$  ที่ใกล้เคียงกัน แต่เมื่อนำ  $K_m$  ดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับ  $K_m$  ที่ใช้กับสารตั้งต้นที่ต่างกัน เช่น ใช้ colloidal chitin เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ไคติเนสจาก *Aeromonas* sp. CS 34 มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 1.16 มก./มล (เขาวนีย์พร บุญช่วย, 2538) และใน *Trichoderma hazlanum* ซึ่ง 3 ไอโซไซม์ มีค่า  $K_m$  0.3, 1.0 และ 0.5 มก./มล ตามลำดับ (De-La-Cruz, et al.,1992) แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้สารตั้งต้นเหมือนกัน ค่า  $K_m$  ของเอนไซม์ไคติเนสจากเลือดกุ้งกุลาดำ ใกล้เคียงกับค่า  $K_m$  จากแหล่งอื่น ๆ และ  $K_m$  ดังกล่าวจะมีค่าสูงกว่า  $K_m$  ที่ใช้สารตั้งต้นไคติินที่เปลี่ยนรูป เช่น colloidal chitin ซึ่งให้เห็นว่าความสามารถของเอนไซม์ไคติเนสที่จับกับสารตั้งต้นที่เป็นไคติินที่เปลี่ยนรูปได้ดีกว่าไคติินผง

##### 4.4.2 ผลการหาค่า $K_m$ และ $V_{max}$ ของเอนไซม์ไคติโตไบเอส

จากการหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์ไคติโตไบเอส โดยใช้ *p*-nitrophenyl N-acetylglucosamininide เป็นสารตั้งต้น พบว่า ค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  จากเอนไซม์แต่ละแหล่งแตกต่างกัน ผลการศึกษาเอนไซม์ไคติโตไบเอสจากเลือดกุ้งกุลาดำ มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 11 mM และ  $V_{max}$  เท่ากับ 5 ยูนิต/มล. ซึ่งมีค่าสูงกว่าเอนไซม์จากแหล่งอื่น ๆ เช่น *Drosophila hydei* มีค่า  $K_m$  เท่ากับ 5.7 mM (Spindler,1976), ในตัวอ่อนของกุ้ง (*Peneus japonicus*) เท่ากับ 0.137 mM (Koga, et.al.,1996) ใน *Vibrio parahemolyticus* เท่ากับ 3 mM (Zhu,et al.,1992) โดยใช้สารตั้งต้นตัวเดียวกัน แสดงให้เห็นความสามารถในการจับของเอนไซม์กับสารตั้งต้น (ES- complex)

## 4.5 การทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส

### 4.5.1 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการกรองด้วย Ultrafiltration

การทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกรองด้วย Centricon-30 ทำให้แยกโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30,000 Da ออกจากโปรตีนอื่นได้ในปริมาณน้อย เท่ากับ 207 มก. แสดงให้เห็นว่าโปรตีนในซีรัมของเลือดกึ่งกลาดำส่วนใหญ่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ แต่วิธีการดังกล่าว สามารถแยกเอนไซม์โคติเนสที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30,000 Da ออกจากโปรตีนรวมได้ส่วนหนึ่ง และในขั้นตอนนี้มีค่าความว่องไวจำเพาะของเอนไซม์ และค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ทั้งสองไม่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าวิธีการดังกล่าวไม่ได้ช่วยทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เนื่องจากว่าเอนไซม์ที่นำมาใช้ศึกษาเก็บไว้ระยะเวลาานาน 15 วันทำให้มีการเสียดสภาพไปบางส่วน ในขณะที่ปริมาณโปรตีนมีความเข้มข้นมากขึ้นเนื่องจากการใช้วิธีนี้เพื่อลดปริมาตรของสารให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

### 4.5.2 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน

ผลการทดลองจากกราฟรูปที่ 3.13 พบว่าปริมาณโปรตีนมีเพียงพีคเดียวเป็นพีคใหญ่ และกว้าง ส่วนปลายค่อย ๆ ลาดลงเป็นหางยาว แสดงให้เห็นว่าโปรตีนในเลือดกึ่งกลาดำ ส่วนมากมีขนาดใหญ่ น้ำหนักอยู่ในช่วง มากกว่าหรือเท่ากับ 6,00,000 Da เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวถูกชะออกมาในช่วงปริมาตรระของใกล้เคียงกับของเหลวออกเจล ( $V_0$ ) เมื่อทำการวิเคราะห์เอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอส พบว่าเอนไซม์โคติเนสมีสองพีค แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โคติเนสมีมากกว่าหนึ่งไอโซไซม์ ซึ่งพีคแรกจะถูกชะออกมาตรงกึ่งกลางของพีคโปรตีนส่วนพีคที่สองถูกชะออกมาตรงส่วนปลายของพีคของโปรตีนซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าไอโซไซม์ของโคติเนสมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ส่วนเอนไซม์โคโตไบเอสถูกชะออกตรงส่วนปลายของกราฟ และลักษณะของกราฟเป็นพีคกว้างอาจเป็นไปได้ว่าทั้งโคติเนสและโคโตไบเอสเป็นเอนไซม์ที่มีหลายไอโซไซม์

นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าพีคของเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอสยังคงซ้อนทับกัน จึงไม่สามารถแยกเอนไซม์ทั้งสองออกจากกันได้ อาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีแรงยึดเหนี่ยวหรือจับกันด้วยพันธะไดพันธะหนึ่งเนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองเป็นกลุ่มของเอนไซม์ชนิดเดียวกัน และจะหลั่งออกมา พร้อมกันเพื่อร่วมกันทำหน้าที่ในการย่อยสลายโคติน จึงไม่สามารถแยกเอนไซม์ดังกล่าวออกจากกันได้ด้วยวิธีนี้ และหลาย ๆ วิธีตามที่เคยตรวจสอบ

มาแล้ว เช่น ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งไม่ได้แสดงผล

#### 4.5.2 การทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

จากผลกราฟการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ โดยวิธีการแลกเปลี่ยนประจุโดยใช้ ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก DEAE sephadex A - 50 พบว่า เอนไซม์ทั้งสองสามารถจับกับประจุบวกได้ดีที่ pH 7.0 แต่ไม่สามารถชะออกได้ด้วยสารละลาย 25 mM Tris-HCl จนกว่าจะเพิ่ม NaCl ลงไป แสดงให้เห็นว่า ทั้งเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอสจะถูกชะออกเมื่อเพิ่มความเข้มข้น NaCl 0.35-0.5 M ที่ความเข้มข้นดังกล่าว จะมีความแรงของประจุมากพอที่จะไปแย่งจับกับประจุในตัวกลางค้ำจุน DEAE sephadex A-50 แทนที่เอนไซม์ เอนไซม์ดังกล่าวจึงถูกชะออกมา ซึ่งให้เห็นว่าเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอสมีคุณสมบัติเป็น acidic protein ซึ่งมีประจุเป็นลบในภาวะที่มี pH 7.0 นั่นคือ pH จะต้องสูงกว่า pI ของเอนไซม์ทั้งสอง และสรุปได้ว่า pI ของเอนไซม์ทั้งสองมีค่าต่ำกว่า 7

จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าทั้งเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอส จะถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของ NaCl เดียวกันใกล้เคียงกับทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์โคติเนสในตับอ่อนของกุ้ง (*Peneus japonicus*) ซึ่งเอนไซม์โคติเนสจะถูกชะออกมาที่ 0.3 M NaCl (Kono et al., 1990) ส่วนโคโตไบเอสถูกชะออกมาได้ที่ 0.5 M NaCl (Koga et al., 1996) นอกจากนี้พบว่า พีคของเอนไซม์ทั้งสองซ้อนทับกันเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองมีค่า pI ที่ใกล้เคียงกัน จึงไม่สามารถแยกเอนไซม์ทั้งสองออกจากกันได้

อย่างไรก็ตามการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธีนี้ก็สามารกำจัดโปรตีนอื่น ๆ ที่ไม่จับกับตัวกลางที่มีประจุบวกได้ในปริมาณมาก พบว่า ผลการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ทำให้เอนไซม์โคติเนสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิม 18.33 เท่า และได้ปริมาณเอนไซม์กลับคืนมาจากสารเริ่มต้นร้อยละ 63.14 และเอนไซม์โคโตไบเอสมีความบริสุทธิ์ 38 เท่า และได้ปริมาณเอนไซม์กลับคืนมาจากสารเริ่มต้นร้อยละ 62.70

#### 4.6 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไคตินเนส และไคโตไบเอส

ผลจากการแยกสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกพบว่าพบเอนไซม์ไคตินเนสทั้งสองส่วน ส่วนหนึ่งสามารถผ่านเมมเบรนไปได้ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30,000 Da ส่วนที่ไม่สามารถกรองผ่านเมมเบรนได้ซึ่งมีขนาดมากกว่า 30,000 Da แสดงให้เห็นว่าไคตินเนสในเลือดกุ้งกุลาดำมีมากกว่าหนึ่งไอโซไซม์ เมื่อนำส่วนที่ไม่สามารถกรองผ่านเมมเบรนได้ ไปแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเจลฟิลเตรชัน ดังรูปที่ 3.13 พบว่า มีสองพีคซึ่งมีปริมาตรระต่างต่างกัน แสดงว่าเอนไซม์ไคตินเนสแต่ละไอโซไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่าง โดยไคตินเนสที่ออกพีคแรก (chitinase I) มีน้ำหนักโมเลกุล 199,000 Da ไคตินเนสที่ออกในพีคหลัง (chitinase II) มีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 Da ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์ไคตินเนสในเลือดกุ้งมังกรในสภาพธรรมชาติโดยใช้เทคนิคเดียวกัน เท่ากับ 66,000 Da (Lynn, et al., 1990) ส่วนเอนไซม์ไคตินเนสที่ผ่านการกรอง (chitinase III) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 Da ใกล้เคียงกับเอนไซม์ไคตินเนสจากตัวอ่อนของกุ้ง (*Peneus japonicus*) ซึ่งเป็นโปรตีนโมเลกุลเดี่ยว (monomeric protein) ที่มีน้ำหนัก 37,000 Da (Kono, et al., 1990) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองเอนไซม์ไคตินเนสในน้ำยางพาราซึ่งประกอบด้วยสามไอโซไซม์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันแต่แต่ละไอโซไซม์มีค่า pI แตกต่างกัน (Panja, et al., 1994)

ส่วนเอนไซม์ไคโตไบเอสถูกชะออกตรงส่วนปลายพีคของกราฟเช่นเดียวกับเอนไซม์ไคตินเนส แต่มีน้ำหนักโมเลกุล 83,000 Da ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับเอนไซม์ไคโตไบเอสในสภาพธรรมชาติในตัวของกุ้ง (*Peneus japonicus*) พบว่า เป็นโปรตีนโมเลกุลคู่ (dimeric protein) ที่เกิดจากโปรตีนโมเลกุลเดี่ยว 64,000 Da สองโมเลกุล และผลจากการตรวจสอบในสภาพธรรมชาติพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 110,000 Da (Koka, et al., 1996) นอกจากนี้จากการศึกษาเอนไซม์ไคโตไบเอสในเลือดของกุ้งมังกรของ Lynn และคณะ (1990) พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับจากตัวอ่อนของกุ้ง (*Peneus japonicus*) คือ เท่ากับ 116,000 Da

## 5. สรุป

จากการศึกษาเอนไซม์โคติเนส และโคโตไบเอส จากเชื้อดักแด้กุลาดำสามารถสรุปได้ดังนี้

1. ในเชื้อดักแด้กุลาดำมีปริมาณเอนไซม์โคติเนส 84 % และโคโตไบเอส 96 % อยู่ใน ส่วน ซีรัม และในส่วนที่เป็นเม็ดเลือดมีโคติเนส 16 % และ โคโตไบเอส 4 %
3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โคติเนส เท่ากับ 40 °ซ และโคโตไบเอส เท่ากับ 50 °ซ
3. pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โคติเนส เท่ากับ 5.0 และโคโตไบเอส เท่ากับ 5.5
4. ค่า  $K_m$  ของเอนไซม์โคติเนส เท่ากับ 3.57 มก/มล และโคโตไบเอส เท่ากับ 11 mM ตามลำดับ ส่วนค่า  $V_{max}$  ของโคติเนส เท่ากับ 3.13 ยูนิต/มล. และโคโตไบเอส 5.0 ยูนิต/มล.
5. การเก็บรักษาเอนไซม์ในระยะเวลา และอุณหภูมิที่เหมาะสมควรเก็บที่อุณหภูมิ 4 °ซ หรือ -20 °ซ
6. การทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์โคติเนสและโคโตไบเอสด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน Sephadex G-200 และแบบแลกเปลี่ยนประจุ DEAE sephadex A-50 และ พบว่า มีความบริสุทธิ์ 18.33 เท่า และ 38.0 เท่า ตามลำดับ ได้ปริมาณเอนไซม์กลับคืนมาจากสารเริ่มต้นร้อยละ 63.14 และ 62.70 ตามลำดับ
7. น้ำหนักโมเลกุลในสภาพธรรมชาติโดยผ่านการกรองด้วย Centricon-30 และเจลฟิลเตรชันเอนไซม์โคติเนสน่าจะมีขนาดโมเลกุลประมาณ 199,000, 50,000 และ ต่ำกว่า 30,000 Da และโคโตไบเอส ประมาณ 83,000 Da

## เอกสารอ้างอิง

- เชาวนีพร บุญช่วย, 2539. ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ไคตินเนสใน *Aeromonas* sp. CS-34 และการศึกษาลักษณะของเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์  
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ประสาธ ศรประสิทธิ์, 2540. การศึกษาคุณลักษณะของไคตินและไคโตแซนจากกระดองปลาหมึก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทัศนัย วาณะ, 2537. ไคตินเนสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และตะกอนดินจากป้อเลี้ยงกุ้ง วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ธีระพล ประมวลกิจจา. 2534. จุดสาคกรรรมการผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง  
วารสาร จุดสาคกรรรมการเกษตร 3-7
- พงษ์จันทร์ จันทยศ. 2534 . ชีวิตหลังความตายของสัตว์มีเปลือก รั้วรอบตัว สารคดี  
วิทยาศาสตร์ . 59-64
- วรรณนา หงษา, 2538 การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์ไคโตไมเอสจาก  
*Aeromonas* sp. CS - 34 . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัย  
สงขลานครินทร์
- Abdel-Naby, M.A., El-Shayeb, N.M.A. and Sherief, A.A. 1992. Purification and some properties of chitinase from *Aspergillus carneus*. App. Biochem. Biotechnol. 37 : 141-154
- Anderson, C.G., Depable, N. and Romo, D.R. 1978. Antarctic krill (*Eupha superba*) As a source of chitin and chitosan. In Proceedings of the International Conference on Chitin/Chitosan. (Muzzarelli, R.A.A. and Pariser, E.R., eds) 2 MIT-Sea Grant Program : Cambridge, MA ; p 213
- Antoniello, S., Auletta, M., Vatiro, V., Nigro, C. and Cacciato, L. 1989.  $\beta$  - hexosaminidase activity in alcoholic fatty liver and in Ccl sub (4) induce fibrosis of the rat. Enzyme. 42 : 68-72



- Austin, P.R., Brin, C.J., Castle, J.E. and Zikakis, J.P. 1981. Chitin : New facets of research. *Science*. 212 : 749 - 753
- Bassler, B.L., Yu, C., Lee, Y. C. and Roseman, S. 1991a. Chitin utilization by marine bacteria : degradation and catabolism of chitin oligosaccharides by *Vibrio furnissii*. *J. Biol. Chem.* 266 : 24276-24286
- Bassler, B.L., Gibbons, P., Yu, Y. C. and Roseman, S. 1991b. Chitin Utilization by Marine Bacteria : Chemotaxis to chitin oligosaccharide by *Vibrio furnissii* *J. Biol. Chem.* 266 : 24276-24275
- Beerhues, L. and Kombrink, E. 1994. Primary Structure and Expression of mRNAs Encoding Basic Chitinase and 1,3- $\beta$ -Glucanase in Potato. *Plant Mol. Biol.* 24 : 353-367
- Benhamou, N. and Ouellette, G.B. 1986. Ultrastructural localization of glycoconjugates in the fungus *Ascocalyx ablatina* the sclerotodermis cancer agent of conifers, by means of lectin- gold complexes *J. Histochem. Cytochem.* 34 : 855 - 867
- Bemasconi, P., Locher, R., Pillet, P.E. Jolles, J. and Jolles, P. (Eds). 1986. Purification of large amounts of lysozyme with chitinase activity from *Rubus hispidus* culture in vitro. In *Chitin in Nature and Technology*. pp. 234-236. Plenum press, New York.
- Boller, P., Gehri, A., Mauch, F. and Vogeli, U. 1938. Chitinase in bean leaves : Induce by ethylene. purification, properties, and possible function. *Planta*. 157 : 22-31
- Brine, C.J. 1984. Chitin : Accomplishment and perspectives in chitin, chitosan and related enzymes ( Zikakis J. P. , eds) pp. xxi-xxiii. Academic Press, New York
- Cabib, E. 1987. The Synthesis and Degradation of Chitin. *Adv. Enzymol.* 59-101

- Calvo, P., Reglero A. and Cabizas J.A. 1978. Purification and properties of  $\beta$ -N-Acetyl hexosaminidase from the Mollusc *Helicella ericetorum* Muller. *Biochem J.* 175 : 743 -750
- Campbell, L. and Williams, B. 1951. A study of chitin-decomposing microorganisms of marine origin. *J. Gen. Microbiol.* 5 : 894-905
- Carroad, P.A. and Tom, R.A. 1978. Bioconversion of shellfish chitin waste : process conception and selection of microorganisms. *J. Food Sci.* 43 : 1158
- Chen H.C., Hsu, M.F. and Jiang S.T. 1997. Purification and characterization of an exo-N, N diacetylchitobiohydrolase - like enzyme from *cellulomonas flagena* NT0U 1 *Enzyme and Microbial Technology* 20 : 191-197
- Cody, R.M. 1989. Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. *Curr. Microbiol.* 19 : 201-205
- Correa, J. U., Elango, N., Polacheck, I. and Cabib, E. 1982. Endochitinase, A Mannan Associated Enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 257 : 1392-1397
- Cosio, I.G., Fisher, R. A. and Carroad, P. A. 1982. Bioconversion of Shellfish Chitin Waste : Waste Pretreatment, Enzyme Production, Process Design, and Economic Analysis. *J. Food Sci.* 47 : 901-905
- De-La-Cruz, J., Hidalgo-Gallego, A., Lora, J.M., Benitez, T., Pintor-Toro, J.A. and Liobell, A. 1992. Isolation and characterization of three chitinase from *Trichoderma hazianum*. *Eur. J. Biochem.* 206 : 859-867
- Deshpande, M.V. 1986. Enzymatic degradation of chitinase and its biological application. *J. Sci. Ind Res.* 45 : 273-281
- Deshpande, M.V. and Shaikh, S.A. 1993. Chitinolytic Enzyme : their contribution to basic and applied research. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 9 : 468-475

- Dickinson, K., Keer, V., Hitchcock, C.A. and Adams, D.J. 1991 Microsomal chitinase Activity from *Canida albicans*. Biochem Biophys. Acta. 1073 : 177-182
- Drouillard, S., Armand, S., Davies, G. J., Vorgias, C.E. and Henrissat, B. 1997 *Serratia Marcescens* chitobiase is a retaining glycosidase Utilizing substrate Acetamido group participation. Biochem. J. 1997
- El-Assar, S.A. Ghanem, K.M. Sabry, S.A. and Ghanem, N.B. 1992 Purification and characterization of chitinase product by *Bacillus amyloliquefaciens*. Bioseparation. 3 : 37-46
- Escott d., and Adams, D.J. 1995. Chitinase Activity in Human serum and Leucocytes. Infection and Immunity 63 : 4770-4773
- Espie P.J. and Roff J.C. 1995. A biochemical index of duration of molt cycle for planktonic Crustacea base on chitin-degrading enzyme, chitobiase. Limnol. Oceanogr. : 40(6) 1028-1034
- Findlay, J. and Levvy, G. A. 1960. Purification of  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase from The Pig Epididymis. Biochem. J. 77 : 170-175
- Flach, J., Pilet, P.- E. and Jolles, P. 1992. What's New in Chitinase Research ? : Review Experientia 48 : 701-716
- Funke, B., Criel, G, and Spindler, K. D (Esd). 1989. Chitin degradation enzymes : characteristic and function during *Artemia* development. In Cellular and Molecular Biology of *Artemia* development. pp.191-200. Press, New York
- Giordani, R., Benyahia, S., Teissere, M. and Noat, G. 1992. Purification and properties of N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase from *Hevea brasiliensis* latex. Plant Sci. 84 : 25-34
- Godknecht, A. and Honegger, T. G. 1991. Isolation characterization and localization of sperm-bound N-acetylglucosaminidase that is indispensable for fertilization in the ascidian *Phallusia mammillate*. Dev. Biol. 143 : 389-407

- Grenier, J., Benhamou, N and Asselin, A. 1991. Colloidal gold - complex chitinase : a new probe for ultrastructural localization of chitosan in fungi. *J. Gen Microbiol* 137 : 2007 - 2015
- Grusset, J., Meyer, Y., Chatirer, Y., Kauffmann, S., Leyran, M. and Fritig, B. 1990. Tobacco mesophyll protoplasts synthesize 1,3- $\beta$ -glucanase, chitinase and "osmotin" during *in vitro* culture. *Plant. Physiology*. 92 : 520-527
- Hadspeth, R.L., Hobbs, S.L., Anderson, D.M., and Gual, J.W., 1996  
Characterization and Expression of Chitinases and 1,3- $\beta$ -Glucanase gene in cotton. *Plant Mol. Biol.* 31 : 911-916
- Hamlyn, P.E., Bradshaw, R.E., Mellon, F.M., Santiago, C.M., Wilson, J.M. and Peberd, J.F. 1981. Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes. *Enz. Microbiol. Technol.* 3 : 321-325
- Hara, S., Yamumara, Y., Fujii, Y. and Ikenka, T. 1989. Purification and characterization of chitinase produced by *Streptomyces erythraeus*. *J. Biochem.* 105 : 484-489
- Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., Di-Pietro, A., Peterbauer, C. and Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Tricoderma hazianam* : Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*. 83:313-318
- Hickman, S., Kornfeld, R., Osterland, C. K. and Kornfeld, S. 1972. The structure of glycopeptidase of a Human  $\gamma$  Man-1monoglofin. *J. Biol. Chem.* 247 : 2156-2163
- Hodge, A., Gooday, G. W. and Alexander, I. J. 1996. Inhibition of Chitinolytic Activity from tree species and associated Fungi. *Phytochemistry*. 41 : 77-84
- Hood, M.A. and Meyers, S.P. 1977. Microbiological and Chitinoclastic Activities Associated with *Penaeus setiferus*. *Jour of the Oceanographical*

Society of Japan. 33 : 235-241

Hoppe, H., G. 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water ; measuments by means of methyluumbelliferyl-substrates. MAR.Ecol. (PROGR.SER.) 11 : 299-308

Hsing-chen, C., Mei-Ying, H., Moody, M. and Shann-lzong, J. 1991. Distribution and hydrolysis enzyme activities of aerobic, heterotrophic bacteria isolated from grass prawn, *Penaeus monodon*. J. Fish. Soc. Taiwan. 18 : 301-310

Humphreys, A.M. and Gooday, G.W. 1984. Phospholipid requirement of Mucrosomal chitinase *Mucor mucedo*. Curr Microbiol. 11 : 187 -190

Huynh, Q.K. Hironaka, C.M., Levine, E.B., Smith, C.E., Borgmeyer, J.R. and Shah, D.M. 1992. Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, an antifungal properties of chitinase from maize seed. J. Biol. Chem. 267 : 6635-6640

Izume, M. and ohtakara, A. 1987. Preparation of D-glucosamineoligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. Agric. Biol. Chem. 51:1189-1191

Jantira Punya, Dhirayos Witisuwannakul and Rapepan Witisuwannakul. 1994  
Hevea chitinase and  $\beta$ -(1,3) – glucanase enzyme in rubber latex  
Biopolymer and Bioproducts : November : 292

Jeuniaux, C. 1986. Chitinase. Methods in Enzymology. 8 : 644-650

Jolles, P. 1984. What's new in lysozyme research? Molec.Cell. Biochem. 63 :165-189

Kahn, S.R. Shevock, P. N. and Hackett, R. L. 1989 Urinary enzyme and calcium oxalate urolithaisis. J. Urol. 142 : 846 - 849

Kawasumi, T., Kluchi, N., Futatsugi, Y., Ohba, K. and Yanagi, S.O. 1987. High

Yield preparation of *Lentinus edodes* ("Shiitake") protoplast with regeneration capacity and mating type stability. *Agric. Biol. Chem.* 51 : 1649-1656

Kelkar, H.S., Shakar, V. and Deshpande, M.V. 1990. Rapid isolation and regeneration of *Sclerotium rolfsii* protoplasts and their potential application for starch hydrolysis. *Enz. Microbiol. Tech.* 12 : 510-514

Kellmann, J.W., Kleinow, T., Engelhard, K., Philipp, C., Wegener, D., Schell, J. and Schreier, P.H., 1996. Characterization of two class II chitinase gene from peanuts and expression in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 30 : 351-358

Kitamido kado, M., Yuan, C. S. and Ueno, R. 1990. An enzyme method designed to differentiate between fresh and frozen-thawed fish. *J. Food Sci.* 55:7476

Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.* 38 : 85-97

Koga, D., Jilka, J. and Kramer, K.J. 1983. Insect endochitinase : glycoprotein from moulting fluid, integument and pupal hemolymph. *Insect Biochem.* 13 : 295-305

Koga, D., Hoshika, H., Matsushita, M., Tanaka, A., Ide, A. and Kono, M. 1996. Purification and Characterization of  $\beta$ -N-Acetyl hexosaminidase from the of a prawn, *Penaeus japonicus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60:194-199

Koga, D., Mai, M.S., Turner, C.D. and Kramer, K.J. 1981. Kinetics and Mechanism of exochitinase and  $\beta$ -N-acetylhexosaminidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 12 : 493-499

Koga, D., Jujimoto, H., Funakoshi, T., Utsumi, T and Ide, A. 1989. Appearance of chitinolytic enzyme in integument of *Bombyx mori* during larval-pupal transformation. Evidence for enzymogenic form. *Insect*

Biochem. 19 : 123-128

Kondo, M., Itami, T. and Takahashi, Y. 1992. The phenoloxidase activity in prawn Hemocytes. *J. Gyogyo Ken* 27 (4) : 185-189

Kono, M., Matsui, T. and Shimizu, C. 1987. Purification and some properties of chitinase from the stomach of red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Sui San Gakka.* 53 : 131-136

Kono, M., Matsui, T., Shimizu, C. and Koga, D. 1990. Purifications and Some Properties of Chitinase from The Liver of a Prawn, *Penaeus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.* 54 : 2145-2147

Kragh, K.M., Hendriks, T., Jong, A.J., Schiavo, F.L., Bucherna, N., Hojrup, P., Mikklisen, T., and Vries, S.C., 1996. Characterization of chitinase able to rescue somatic embryos of temperature - sensitive carrot variety *ts11*. *Plant Mol. Biol.* 31 : 631-645

Kuranda, M. J. and Aronson, Jr. N. N. 1986. A Di-N-acetylchitinase activity is involved in the lysosomal catabolism of asparagine-linked glycoproteins in rat liver. *J. Biol. Chem.* 261 : 5803-5809

Kurita, K., Tomita, K., Toda, T., Ishii, S., Nishimura, S. and Shimoda, K. 1993. Squid Chitin as Potential Alternative Chitin Source Deacetylation Behavior and Characteristic Properties. *J. Polym. Sci.* 31:485-191

Latzko, F. and Humpel, W., 1995. Enzymation by yeast cell wall lytic *Athobacter* sp. chitinolytic activity. *Appl Microbiol Biotech* ? 44 : 185-189

Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. and Fritig, B. 1987. Biological function of pathogenesis-related proteins : Four tobacco Pathogenesis-related proteins are chitinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 6750-6754

Lindsay, G. J. H. 1986. The Significance of Chitinolytic Enzymes and Lysozyme in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Defence. *Aquaculture* 51 : 169-173

- Lindsay, G. J. H. 1987. Seasonal activities of chitinase and chitobiase in digestive tract and serum of cod *Gadus morhua* (L.) J.Fish. Biol. 30 : 495 – 500
- Lindsay, G.S.H. and Gooday, G.W. 1985. Action of chitinase in spines of the diatom *Thalassiosira fluviatilis*. Carbo. Poly. 5 : 131-140
- Linker, A. Meyer, K. and Weissmann B. 1955. Enzymatic formation of monosaccharides from hyaluronata. Biochem. J. 58 : 237-248
- Lynn, K.R. 1990. Chitinase and Chitobiase From American lobster (*Homarus americanus*) . Comp. Biochem. Biophysiol. Pt. 96 : 761-766
- Malano, J., Duran, A. and Cabib, E. 1979. A Rapid and Sensitive Assay for Chitinase Using Tritiated Chitin. Analytical Biochemistry 83 : 648-656
- Manson, F. D. C., Fletcher, T. C. and Gooday, G. W. 1992. Localization of Chitinolytic Enzymes in Blood of Turbot, *Scophthalmus maximus*, and Their Possible Roles in Defence. Journal of Fish Biology 40 : 919-927
- Mauch, F. Hadwiger, L.A. and Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue : I Purification and characterization of two chitinase and two  $\beta$ -1-3 glucanase differentially regulated during development and in response to fungal infection Plant Physiol 87 : 325-333
- Mauch, F., Mauch Mani, B. and Boller, T. 1988. "Antifungal hydrolase in pea tissue : II Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1-3-glucanase" Plant Physiol. 88 : 936-942
- Mazzarelli, R.A.A. 1977. Pergamon Press Ltd. New York. 309 pp.
- Melchers, L. S., Sela-Buurlage, M. B., Vloemans, S. A., Woloshuk, C. P., Van Roekel, J. S. C., Pen, J., van den Elzen, P. J. M. and Cornelissen, B. J. C. 1993. Extracellular Targeting of The Vacuolar Tobacco Protein D. AP24, Chitinase and  $\beta$ -1,3-Glucanase in Transgenic Plants. Plant Mol. Biol. 21 : 583-593
- Mendonça E.S., Vartak P.H., Rano, J.U and Dashpande M.V. 1996. An enzyme



from *Mycothacium vercularia* that degrades insect cuticles for biological control of *Aedes aegypti* mosquito. *Biofechnology Letters* 18 No 4 : 373-376

Mescher, M.F. and Strominger, J.L. 1976. Purification and characterization of Prokaryotic glycoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarium*. *J. Biol. Chem.* 251 : 2005-2014

Murao, S., Kawada, T., Itoh, H., Oyama, H. 1992. Purification and characterization of a novel type of chitinase from *Vibrio alginolyticus* TK-22. *Biosci. Biotech.* 56 : 368-369.

Nanjo, F., Katsumi, R. and Sakai, K. 1990. Purification and characterization of Exo- $\beta$ -D-glucosaminidase a novel type of enzyme from *Nocardia orientalis* *J. Biol. Chem.* 265 No. 17 : 10088 - 10094

Nanjo, F., Sakai, Ishikawa, M., Isobe, K. and Usui, T. 1989. Properties and transglycosylation reaction of chitinase from *Nocardia orientalis*. *Agric. Biol. Chem.* 53 : 2189-2195

Nasser, W., Tapia, M. and Burkard, G. 1990. Maize pathogenesis - related protein : Characterization and cellular distribution of 1,3 -  $\beta$  glucanase and chitinase induced by bromo mosaic virus infection or mercuric chloride treatment. *Physiol. Molec.* 36 : 1 - 14

Nehra, K. S., Chugh, L.K., Dhillon, S. and Singh, R. 1994. Introduction, Purification and Characterization of Chitinases from Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Leaves and Pods Infected with *Ascochyta rabiei*

Ohno T, Armand S., Hata, T., Nikaidon N., Henrissat B., Mitsutomi M., and Watanabe T. 1996. A Modular Family 19 Chitinase Found in the prokaryotic Organism *Streptomyces griseus* HUT6037. *Journal of Bacteriology.* 178 : 5065-5070

Ohtakara, A., Mitsutomi, M. and Uchida, Y. 1979. Purification and some properties

- of chitinase from *Vibrio* sp. J. Ferment. Technol. 57 : 169-177
- O'Brien, M. and Colwell, R.R. 1987. A Rapid Test for Chitinase Activity That Use 4-Methylumbelliferyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminide. Appl Environ. Microbiol. 53 : 1718-1720
- Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Serratia mercenscens* in biocontrol of *Soleytilum rolfsii*. Phytopathol. 78 : 84-88
- Osawa, R. and Koga, T. 1995. An investigation of aquatic bacteria capable of utilizing chitin as sole of nutrition. LETT. APPL. MICROBIOL. 27 No 5 : 288-291
- Overdijk, B. and Vansteijn, J. 1995. Discrimination Between Chitinase and chitobiase Activities in *Candida albicans*. J. Gen. Appl. Microbio 141 : 281-295
- Panja, Z.K. and Raharjo, S. H. T. 1996. Response of Tragic Plants Epressing Different Chitinase Enzyme to Inoculate with Fungal Pathogens. Plant. Dis. 80 : 999-1005
- Pugh, D and Walker, P. G. 1961. The localization of N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase in tissue . J. Histochem. Cytochem. 9 : 242 - 250.
- Rasmussen, U., Bojsen, K. and Collinge, D.B. 1992. Cloning and Characterization of a pathogen-induced chitinase in *Brassica napus*. Plant . Mol. Biol. 20 : 277-287.
- Regalado A.P. and Ricard Candido P.P., 1996. Study of the Intercellular Fluid of Health *Lupinus albus* L. Ovars. Plant physiology. 110 : 227-232
- Revah-Moiseev, S. 1981. Conversion of The Enzymatic Hydrolysate of Shellfish Waste Chitin to Single-Cell protien. Biotechnology Bioengineering. 23 : 1067-1078
- Reynolds, D.M. 1954. Extracellular chitinase from a *Streptomyces* sp. J. Gen. Microbiol. 11 : 150-159
- Ridoult, C.J., Coley-Smith, J.R., and Lynn, J.M. 1988 Fractionation of Extracellular

- enzyme from a mycoparasitic strain of *Tricoderma hazianum*. *Enz. Microbiol. Tech.* 10 : 180-187
- Roberts, W.K. and SelitreniKoff, C.P. 1988 Plant and bacteria chitinase differ in antifungal activity. *J. Gen. Microbiol.* 134 : 169-176
- Robinson, D. and Stirling, J. L. 1968. N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidases in Human Spleen. *Biochem. J.* 107 : 321-327
- Romaguera, A Menge, U., Breves, R. and Dickman, H. 1992. Chitinase of *Streptomyces olivaceoviridis* and significance of crossing for multiplicity. *J. Bacteriol.* 174 : 3450- 3454
- Rozeboom, H.J., Budiani, A., Beintema, J.J. and Dijkstra, B.W. 1990. Crystallization of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. *J. Mol. Biol.* 212 : 441-443
- Tokura, S., Nishi, N., Tsuisumi, A. and Somorin, O. 1983. Studies on Chitin VIII. Some Properties of Water Soluble Chitin Derivatives. *Polymer Journal.* 15 : 485-489
- Sakai, K., Narihara, M., Kasama, Y., Wakayama, M. and Moriguchi, M. 1994. Purification and characterization of thermostable beta-acetylhexosaminidase of *Bacillus stearothermophilus* CH-4 isolation from chitin-containing compost. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 2911-2915
- Shacklady, C. A. 1975 Value of SCP for animal. In *Single Cell-Protein II*, (Tenenbaum S. and Wang D., eds) p. 489. MIT press, Cambridge
- Shahabuddin M., Lemos J.A., Kaslow D.C. and Jacobs-Lorena. M. 1996. Antibody-Mediated Inhibition of *Aedes aegypti* Midgut Trypsins Block Sporogonic Development of *Plasmodium gallinaceum*. *Insect and Immunity.* 64 No 3 : 739-743
- Shaikh, S.A. and Deshpande, M.V. 1993. Chitinolytic enzymes : their contribution to basic and applied research. *World J. Microbiol. Biotech.* 9 : 468-475

- Shen, Q.P., Xiang, S.V. and Joseph, K. 1991. A technique for detection of chitinase, beta - 1,3-glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocusing. Isoelectrofocusing. *Phytopathol.* 81 : 970-974
- Shinshi, H., Neuhaus, J.M., Ryals, J. and Meins F.Jr. 1990. Structure of a tobacco endochitinase gene : evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequence encoding a cysteine-rich domain. *Plant. Mol. Biol.* 14 : 357-368
- Spindler K.D. 1976. Initial characterization of chitinase and chitinase from the integument of *Drosophila hydei*. *Insect Biochem* 6 : 663-667
- St. Leger, R.J. Cooper, R.M. and Chamley, A.K. 1991. Characterization of chitinase and chitinase produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 58 : 415-426
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M. and Chamley, A.K. 1986. Cuticle degradation enzyme of entomopathogenic fungi : cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *J. Invert. Pathol.* 47 : 167-177
- Stuart, L. S. 1936. A note on halophilic chitinovorous bacteria. *J. Amer. Leath. Chem. Assoc.* 31 : 119-120
- Sumae, D. and Shan, D. 1994 . Effect of chitinase RNA expression on disease susceptibility of Arabidopsis plants. *Plant. Mol. Biol.* 25 : 587-596
- Takegawa, K., Nakoshi, M., Yamamoto, K. and Tochicura, T. 1989 Induction and purification of endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from *Artrotobacter protophomiae* grown in ovalbumin. *Appl Environ. Microbiol.* 55 : 3107-3112
- Tanaka, H., Ogasawara, N., Nakajima, T. and Tamari, K. 1970. Cell wall of *Piricularia oryzae*. I Selective enzymolysis of *Piricularia oryzae* wall-lytic enzyme of *Bacillus circulans* WL 12. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 19 : 38-60
- Tarentino, A.L., Plummer, T.H. Jr. and Maley, F. 1972. A re-evaluation of

- oligosaccharide sequence associated with ovalbumin. *J. Biol. Chem.* 247 : 2629-2631
- Tews, Ivo., Vincentelli, R. and Vorgias C.E. 1996. N-Acetylglucosaminidase (chitinase) from *Serratia marcescens* : gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. *Gene*. 170: 63-67
- Thara, K. V. and Nganamanickam, S. S. 1994. Biological control of rice sheath blight in India Lack of correlation between chitinase product by bacterial antagonist and sheath blight suppression. *Plant and Soil*. 160 : 277-280
- Thomas, P. 1990. Concentration of proteins and removal of solutes. In *Methods in Enzymology*. (Murray P.D., eds). pp. 68-89. Academic press, New York
- Tokura, S., Nishi, N., Tsuisumi, A. and Somorin, O. 1983. Studies on Chitin VIII Some Properties of Water Soluble Chitin Derivatives. *Polymer Journal*. 15 : 485-489
- Trimble, R.B. and Tarentino, A.L. 1991. Identification of distinct endoglycosidase (endo) activities in *Flavobacterium meningosepticum* : endo F1, endo F2, endo F3. *J. Biol. Chem.* 266 : 1646-1651
- Tsujibo, H., Endo, H., Minoura, K., Miyamoto, K. and Inamori, Y. 1993. Cloning and sequence analysis of the gene encoding a thermostable chitinase from *Streptomyces thermovioleceus* OpC-520. *Gene*. 134 : 113-117
- Tsujibo, H., Yoshida, Y. and Miyamoto, K. 1992. Purification, properties, and partial amino acid sequence of chitinase from a marine *Alteromonas* sp. strain O-7. *Can. J. Microbiol.* 38 : 891-897
- Ueda, M., and Arai, M. 1992. Purification and properties of chitinase from *Aeromonas* sp. NO.10S-24. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 : 460-464
- Ueno, H., Miyashita, K., Sawada, Y. and Oba, Y. 1990. Purification and some properties of extracellular chitinase from *Streptomyces* sp. S-84. *J. Gen.*

- Microbiol. 36 : 377-392
- Ueno, R., Yuan, C. S. and Horiguchi, Y. 1987. Characterization of neutral  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase in carp blood. Nippon Suisan Gakkaishi Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 53 : 1017-1024
- Ulhoa, C. J. and Peberdy, J. F. 1992. Purification and Some Properties of The Extracellular Chitinase Produced by *Trichoderma harzianum*. Enzyme Microb. Technol. 14 : 236-240.
- Verbarg, J.G. and Huynh, Q.K. 1991. Purification and characterization of antifungal chitinase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 95 : 450-455
- Vrba, J. and Machacek J. 1994. Release of dissolved extracellular  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase during Crustacean moulting. Limnol. Oceanogr. 39 : 712-716
- Vyas, P.R. and Deshpande, M.V. 1991. Enzymatic hydrolysis of chitin by *Myrothecium verrucaria* chitinase complex and its utilization to produce SCP. J. Gen. Appl. Microbiol. 37 : 267-275
- Watanabe, T., Oyanagi, W., Suzuki, K. and Tanaka, H. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 on chitin degradation. J. Bacteriol. 172 : 4017-4022
- Wilke, C.R., Yang, R.D. and Stocker, U. 1976. Preliminary cost analyses for enzymatic hydrolysis of newsprint. Biotech. Bioen. 6 : 155
- Wright, D. A. and Smucker, R.A. 1986. Ionic requirement for chitinase /chitinase Activity in the Oyster, *Crassostrea virginica*. Biochem. Physiol. 84 : 495-497
- Xu, Y., Zhu, Q., Panbangred, W., Shirasu, K. and Lamb, C. 1996. Regulation, expression and function of a new basic chitinase gene in rice (*Oryza sativa* L.) Molecular Biology. 30 : 387-401
- Yabuki, M., Mizushima, K., Amatatsu, T., Ando, A., Fuji, T., Shimada, M. and

- Yamashita, M. 1986. Purification and Characterization of Chitinase and Chitobiase Produced by *Aeromonas Hydrophilla* SubSP. *Anaerogenes* A52. J. Gen. Appl. Microbiol. 32 : 25-38
- Yanagi, S.O. and Takebe, I. 1984. An efficient method for isolation of mycellal protoplasts from *Coprinus macrorhizus* and other basidiomycetes. Appl. Microbiol. Biotech. 19 : 58-60
- Zhu, B.C.R., Lo, Jing-Yi., Li, Yu-Ten., Li, Su-chen., Jaynas, J.M., Gildmeister, O.S., Laine, R.A. and Ou, Chin-Yin. 1992. Thermostable, salt tolerant, wide pH range novel chitibiase from *Vibrio parahemolyticus* : Isolation, Characterization, Molecular cloning and expression. J. Biochem. 112:163-167
- Zobell, C.E. and Rittenberg, S. C. 1934. The Occurrence and Characteristics of Chitinoclastic Bacteria in The Sea. Jour. Bact. 35 : 275-287
- \_\_\_\_\_. Technique in Protein and Enzyme Biochemistry. B104, 1-18 Elsavier/North Holl and Biomedical Press

## ภาคผนวก

### 1. การเตรียมโคตินผงจากกระดองปลาหมึก

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม (ตามวิธีการเตรียมของ Jeuniaux, 1986 )

1. NaOH 1.0 M
2. Methanol
3. Acetone

#### วิธีการเตรียม

นำกระดองปลาหมึกกล้วย (*Loligo formosana*) ตากแห้งที่บดละเอียด 150 กรัม ใส่ใน 1,900 มล. ของ 1.0 N NaOH ที่อุณหภูมิ 50 °ซ ทำการคนด้วย magnetic stirrer ด้วยแรงไม่มากนัก ประมาณ 5 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมากรองผ่านผ้าก๊อชซึ่งซ้อนกัน 4 ชั้น ในขั้นตอนนี้จะได้โคติน แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น พร้อมทั้งปรับ pH ให้เป็นกลาง (pH 7) นำเอาโคตินมาทำการล้างอีกครั้งหนึ่ง ด้วย methanol และตามด้วย acetone ก่อนนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลาประมาณ 15-24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคตินที่อบแห้งมาบดให้ละเอียดอีกครั้ง พร้อมทั้งกรองด้วยตะแกรงเพื่อคัดขนาดเอาส่วนที่มีขนาด 150  $\mu\text{m}$  ก็จะได้โคตินตามที่ต้องการ

### 2. วิธีการเตรียมสาร K- 199

#### วิธีการเตรียม

K - 199 100 ml (ดัดแปลงจาก Kondo *et al.*, 1992) ประกอบด้วย

|                                      |       |    |
|--------------------------------------|-------|----|
| M - 199                              | 50    | ml |
| hepes                                | 0.238 | g  |
| MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.33  | g  |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.3   | g  |
| NaCl                                 | 1.1   | g  |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.09  | g  |
| L - glutamine                        | 1.0   | ml |



เติมน้ำ deionized จนครบ 10 มล. ปรับ pH ให้ได้ 7.6 กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22  $\mu\text{m}$  เก็บไว้ในตู้เย็น ก่อนนำไปใช้จะต้องผสมกับ cysteine 3 % ปรับ pH เป็น 7.6 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เตรียมแล้วใช้ทันที)

### 3. วิธีการเตรียมสารละลายในการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โคติเนส

3.1 บัฟเฟอร์ 0.1 M Citric acid - 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 5.0

เตรียมสารละลาย A : ชั่ง  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  21.35 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มล. คนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล.

เตรียมสารละลาย B : โดยชั่ง Citric acid 12.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่นคนให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตร ให้ได้ 100 มล.

นำสารละลาย A ปริมาตร 50 มล. มาปรับปริมาตรด้วย สารละลาย B ให้ได้ pH 5.0

3.2 สารตั้งต้นโดยซึ่งโคตินที่เตรียมจากกระดองปลาหมึกขนาด 150 ไมครอน 0.05 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 10 มล. คนให้ทั่วถึงกันก่อนนำมาใช้

3.3 สารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 10% ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล.

3.4 สารละลายโปแตสเซียมเตตระโบเรต 0.8 M ( $\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7$  0.8 M) โดยชั่งสารโปแตสเซียมเตตระโบเรต 24.44 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มล.

3.5 เตรียมสารละลาย DMAB เตรียมสารละลาย A : ไฮโดรคลอริก ที่ความเข้มข้น 10 N (10 N HCl) โดยการดูดสารละลายไฮโดรคลอริก ที่เข้มข้น 207.1 มล. เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 42.9 มล. คนให้เข้ากัน เตรียมสารละลาย B : กรดอะซิติกเข้มข้น และเตรียมสารละลาย C : โดยนำสารละลาย A 2.4 มล. ผสมกับสารละลาย B 97.6 มล. และเติม DMAB 1 กรัม เตรียมแล้วใช้ทันที

#### 4. วิธีการเตรียมสารละลายในการหาค่าความว่องไวของเอนไซม์โคโตไบเอส

4.1 บัฟเฟอร์ 0.1 M Citric acid - 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 5.5 ซึ่งสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจำนวน 8.899 กรัม ละลายในน้ำ 0.9 ลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำไปปรับ pH เป็น 5.5 ด้วยกรดซิตริกเข้มข้น 1 โมลาร์ เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร จะได้บัฟเฟอร์ 0.1 M Citric acid - 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 5.5 เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

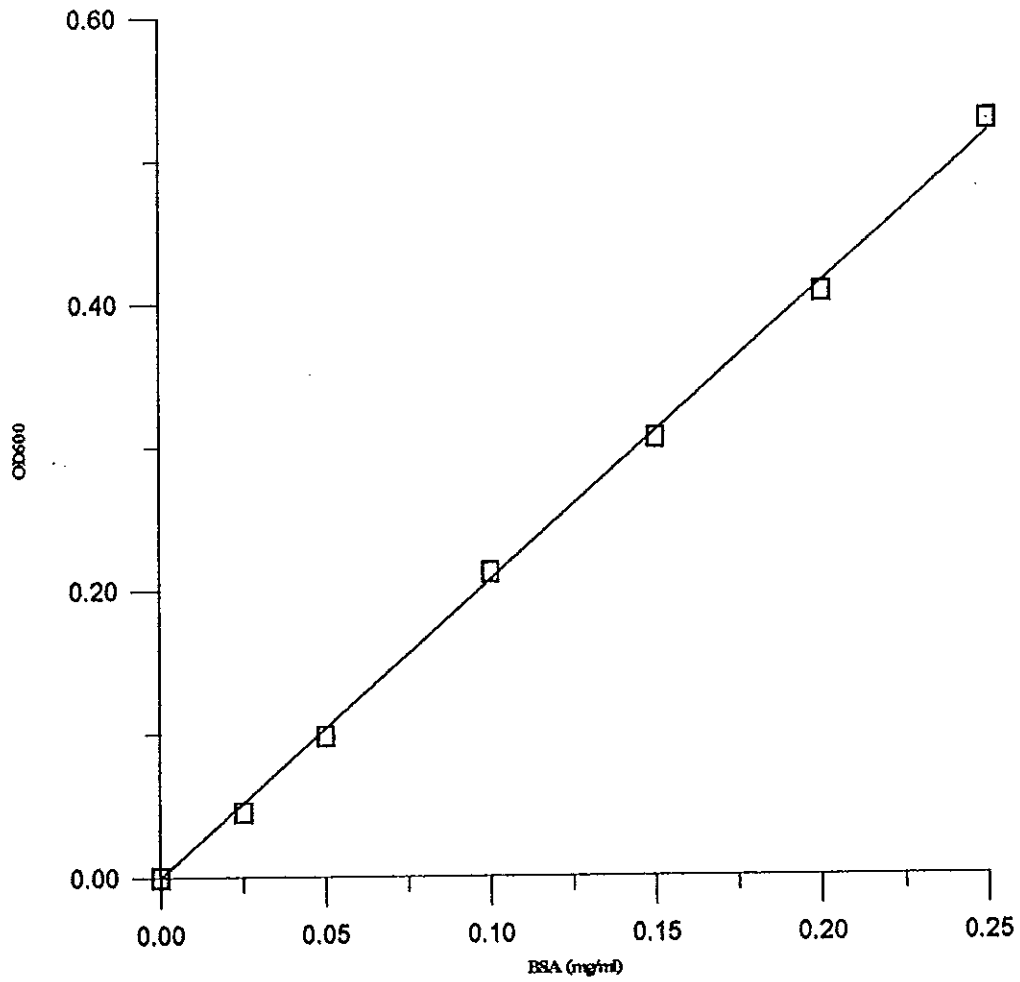
4.2 สารสับสเตรท ซึ่งสาร p - NAG มา 0.048 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์โซเดียมซิเตรทที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปรับปริมาตรให้ได้ 25 มล. จะได้สารละลาย p-nitrophenyl N-acetylglucosamininide 5 มิลลิโมลาร์

4.3 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตที่เข้มข้น 1 โมลาร์ ซึ่งสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 52.99 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มล. คนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

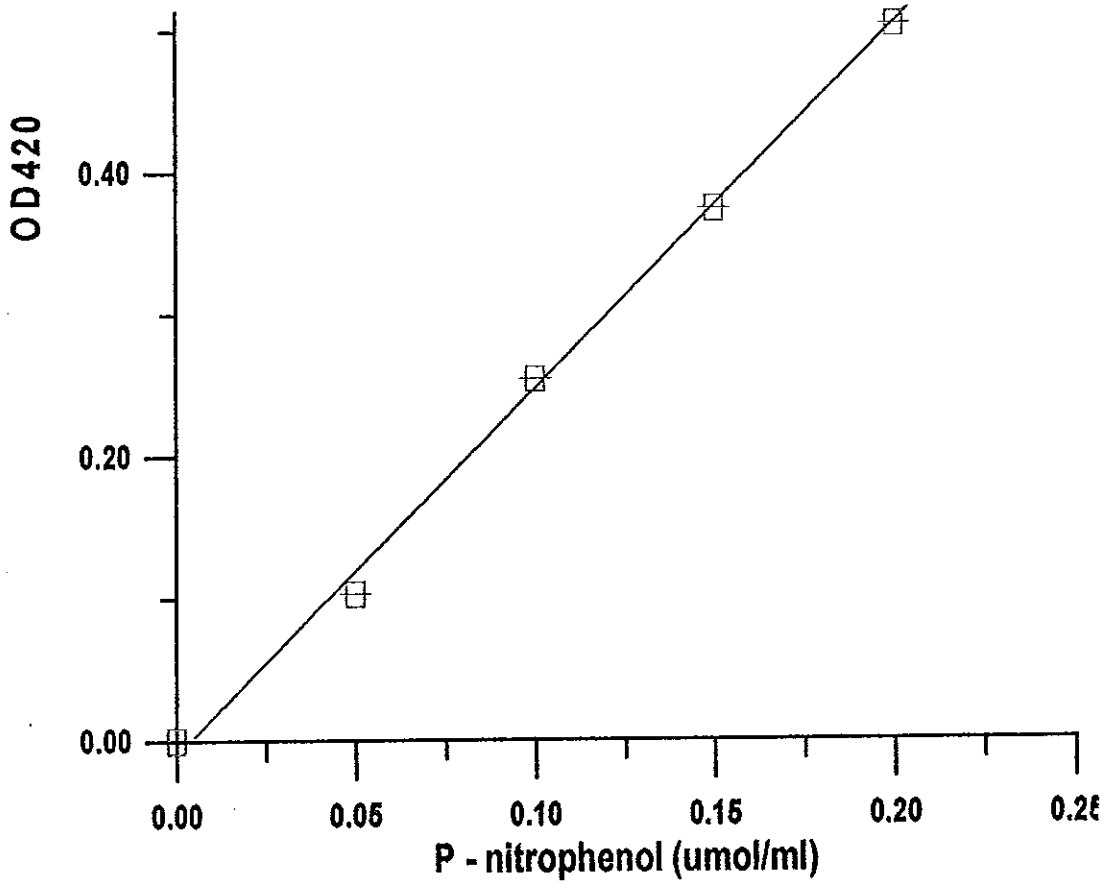
#### 5. วิธีการเตรียมสารเคมีในการประมาณโปรตีนตามวิธีการ ของ Lowry

5.1 สารอัลคาไลน์คอปเปอร์ ประกอบด้วย 2 % ของสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 100 มล. เติม 1 % ของสารละลายโซเดียมโปแตสเซียมทาร์ทเรตในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มล. และเติม 1% ของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล. คนให้เข้ากันเตรียมแล้วใช้ทันที

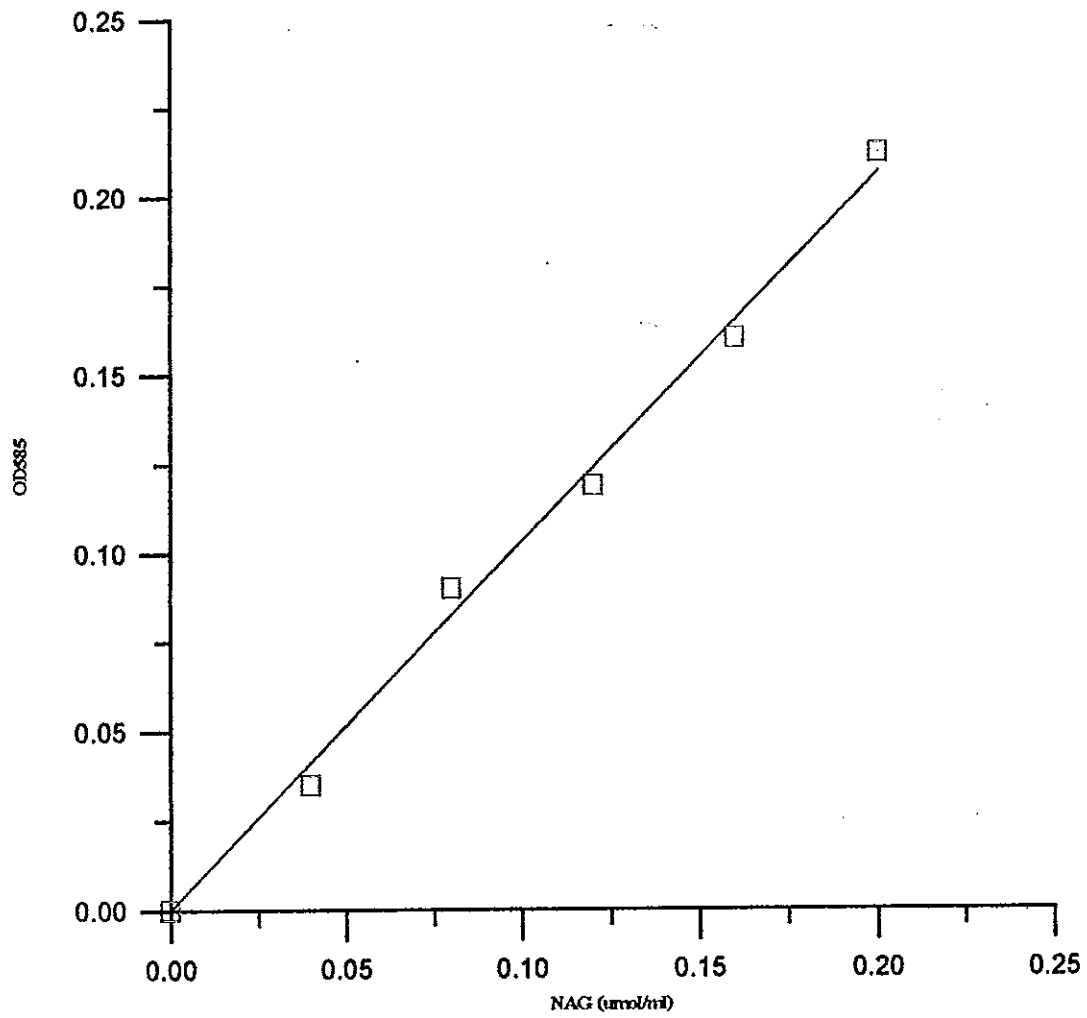
5.2 สารละลายฟอลินใช้สารละลายฟอลินที่เข้มข้น 2.0 โมลาร์ผสมกับน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 : 2 จะได้สารละลายฟอลินที่มีความเข้มข้น 1.0 โมลาร์



กราฟมาตรฐาน BSA (mg/ml)



กราฟมาตรฐาน P - nitrophenol ( $\mu\text{mol/ml}$ )



กราฟมาตรฐาน N-acetyl - $\beta$ - D-glucosamine ( $\mu\text{mol/ml}$ )

## ประวัติผู้เขียน

|                                   |                                     |                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---------------------|
| ชื่อ                              | นิทรา มาศวิวัฒน์                    |                     |
| วัน เดือน ปี เกิด                 | 2 กุมภาพันธ์ 2506                   |                     |
| วุฒิการศึกษา                      |                                     |                     |
| วุฒิ                              | ชื่อสถาบัน                          | ปีที่สำเร็จการศึกษา |
| ประกาศนียบัตรวิชาชีพ              | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์            | 2527                |
| รังสีเทคนิค                       | วิทยาเขตหาดใหญ่                     |                     |
| การศึกษาระดับบัณฑิต<br>(ชีววิทยา) | มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ<br>สงขลา | 2529                |

สถานที่ทำงานปัจจุบัน

โรงเรียนยานตาขาวรัฐชนูปถัมภ์ อำเภอยานตาขาว จังหวัดตรัง 92140