ชื่อวิทยานิพนธ์	คุณสมบัติของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ
ผู้เขียน	นางสาวรุจิยา สุทธิธรรม
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

ตับอ่อน (Hepatopancreas) เป็นอวัยวะภายในซึ่งอยู่บริเวณหัวของกุ้งจัดเป็นวัสดุเศษเหลือประเภทของแข็งที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตกุ้งแช่แข็ง กุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยงมีปริมาณตับอ่อนคิดเฉลี่ยต่อตัวกุ้งเท่ากับ 1.17 และ 1.02 ตามลำดับ เมื่อนำตับอ่อนกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิด มาสกัดด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และ Tween 80 ร้อยละ 0.2 โดยใช้อัตราส่วนของตับอ่อนของกุ้งกุลาดำต่อสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปปั่นผสมที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปสกัดต่อโดยการกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (12,735x*g*) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าได้เอนไซม์สกัดมา 2 ส่วนได้แก่ ส่วนสกัดสารละลาย (solution) และส่วนสกัดอิมัลชั่น(emulsion) เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ทั้ง 9 ชนิด (โปรติเอส แอลฟา-อะมัยเลส ไลเปส แคทาเลส เปอร์ออกซิเดส อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พอลิฟีนอล-ออกซิเดส ไคติเนส และไฮยาลูโรนิเดส) จากเอนไซม์สกัดดังกล่าว พบว่าเอนไซม์แคทาเลสมีกิจกรรมสูงสุดจากเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วนจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิด โดยส่วนสกัดสารละลายจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 4,904.71 และ 4,951.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 382.28 และ 384.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และส่วนสกัดอิมัลชั่นให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 6,292.43 และ 5,276.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 381.13 และ 392.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เอนไซม์ที่พบมีกิจกรรมรองลงมาคือ แอลฟา-อะมัยเลส (29.29 และ 28.47ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และ โปรติเอส (10.82 และ 20.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) สำหรับเอนไซม์ไลเปส เปอร์ออกซิเดส พอลิฟีนอลออกซิเดส

อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ไคติเนส และไฮยาลูโรนิเดสนั้นมีกิจกรรมเอนไซม์ปริมาณน้อยมาก แคทาเลสจากส่วนสกัดสารละลายของกุ้งกุลาดำเลี้ยงถูกคัดเลือกเพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ร้อยละ 40 ตามด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ชนิดคือ DEAE-Toyopearl 650M และ Sephadex G-100 พบว่าเอนไซม์แคทาเลสที่แยกได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 22.22 เท่าของเอนไซม์สกัดเริ่มต้น

เมื่อนำเอนไซม์แคทาเลสที่แยกได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE) พบแถบโปรตีน 1 แถบ และเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิวเตรชัน พบว่ามีขนาดเท่ากับ 66.6 กิโลดาลตัน แต่เมื่อตรวจสอบโดยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) พบแถบโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 32.7 และ 36.0 กิโลดาลตัน

การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วกับเอนไซม์แคทาเลสในสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง พบว่ามีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความคงตัวสูงที่พีเอช 6.0-8.0 ส่วนเอนไซม์แคทาเลสในสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยงมีความคงตัวสูงที่พีเอช 7.0-8.0 และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะถูกยับยั้งตามลำดับความรุนแรงจากมากไปน้อยคือ sodium azide (NaN_3), SDS (sodium dodecyl sulfate) และ EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid) ตามลำดับ อิออนที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ดีได้แก่ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} ขณะที่ K^{+}, Na^{+} และสารประกอบอินทรีย์บางชนิดเช่น เอธานอลและเมทานอล มีผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เพียงเล็กน้อย เอนไซม์แคทาเลสที่ได้มีค่า K_m และ V_{max} เมื่อใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสับสเตรต เท่ากับ $16.7x10^{-2}$ โมลาร์ และ $1.67x10^{3}$ ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

Thesis Title	Properties of catalase enzyme from hepatopancreas of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)
Author	Miss Rujiya Sutthitham
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2001

Abstract

Hepatopancreas, the part of shrimp head is solid waste from the frozen shrimp industries. The seawater and cultured black tiger shrimp had hepatopancreas 1.17 and 1.02 g/shrimp, respectively. The mixture of hepatopancreas to buffer (50mM Tris-HCl buffer, pH 7.0 containing 1M NaCl and 0.2% Tween 80) 1: 3 (w/v) was homogenate at 8,000 rpm, 4°C for 5 minutes and stirred at 4°C for 1 h. The extracted enzyme from hepatopancreas of both shrimps were separated into two phases: solution and emulsion by centrifugation at 10,000 rpm (12,735x*g*), 4°C for 30 minutes. The activities of nine enzymes (protease, α-amylase, lipase, catalase, peroxidase, alkaline phosphatase, polyphenol oxidase, chitinase and hyaluronidase) with different sources of hepatopancreas from seawater and cultured black tiger shrimps were compared. Catalase showed the highest activity in both phases from both sources. The activities of catalase in the solution of seawater and cultured black tiger shrimps were 4,904.71 and 4,951.31 units/ml and the specific activities were 382.28 and 384.49 units/mg protein, respectively. In the emulsion of seawater and cultured black tiger shrimp, the catalase activities were 6,292.43 and 5,276.51 units/ml whereas the specific activities were 381.13 and 392.60 units/mg protein, respectively. α-Amylase (29.29 and 28.47units/ml, respectively) and protease (10.82 and 20.01 units/ml, respectively) had moderate activity. While the other enzymes (lipase, peroxidase, polyphenol oxidase, alkaline phosphatase, chitinase and hyaluronidase) had very low

activities. The catalase from the solution was isolated from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp and was precipitated and purified by ammonium sulfate precipitation (40%), ion-exchange chromatography (DEAE-Toyopearl 650M) and gel filtration chromatography (Sephadex G-100), respectively. The purity of the purified catalase increased to 22.22 folds.

The purified catalase showed single band in polyacrylamide gel electrophoresis under nondenaturing conditions (Native-PAGE) correspond to the molecular weights of 66.6 kDa when determined by gel filtration (Sephadex G-100). However, determination by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) it showed two bands with the molecular weights of 32.7 and 36.0 kDa.

Properties of purified catalase and crude enzyme catalase from seawater and cultured black tiger shrimp revealed that they had maximal activity at pH 7.0 and optimum temperature was 40^{o}C. Purified catalase was stable in the pH range of 6.0-8.0. The crude enzyme catalases from both shrimp were stable in the pH range of 7.0-8.0. When incubated at 70^{o}C for 60 minutes, the enzyme activity was reduced by half. The purified catalase was strongly inhibited by sodium azide following by sodium dodecyl sulfate and ethylenediaminetetra acetic acid, respectively. The inhibition was stronger affected by Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} and Cu^{2+} compare to K^{+} and Na^{+} whereas ethanol and methanol showed slightly inhibition. Their K_m and V_{max} were $16.7x10^{-2}$ molar and $1.67x10^{3}$ μmoles/ml/min, respectively.