

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(13)
รายการภาพ	(14)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	4
1. กุ้งกุลาดำ	4
1.1 ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ	4
1.2 การแพร่กระจายของกุ้งกุลาดำ	6
1.3 แหล่งที่อยู่อาศัยของกุ้งกุลาดำ	6
1.4 อุตสาหกรรมการแปรรูปกุ้งกุลาดำ	7
2. ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากสัตว์น้ำ	8
2.1 เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzymes)	8
2.1.1 โปรติเอสชนิดซีรีน (Serine protease)	9
2.1.2 โปรติเอสชนิดซิสเทอีน (Cysteine / thiol protease)	11
2.1.3 โปรติเอสชนิดแอสปาทิก (Aspartyl / acidic protease)	12
2.1.4 โปรติเอสชนิดเมทัลโล (Metallo protease)	12
2.2 เอนไซม์ย่อยแป้ง (Amylolytic enzymes)	13
2.3 เอนไซม์ย่อยไขมัน (Lipolytic enzymes)	14
2.4 เอนไซม์ชนิดอื่นๆ	15

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.1 อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase)	15
2.4.2 แคทาเลส (Catalase)	17
2.4.3 เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase)	19
2.4.4 พอลิฟีนอลออกซิเดส (Polyphenol oxidase)	20
2.4.5 ไคตินเนส (Chitinase)	22
2.4.6 ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase)	23
3. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติและกิจกรรมของเอนไซม์จากสัตว์น้ำ	24
3.1 อุณหภูมิ (Temperature)	24
3.2 พีเอช (pH)	26
3.3 ความดัน(Pressure)	26
3.4 สับสเตรต (Substrate)	27
3.5 เกลือ (Salts)	27
3.6 อีออนของโลหะและสารจับโลหะ (Metal ions and chelating agent)	30
3.7 ตัวยับยั้ง (Inhibitors)	30
4. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลส	31
วัตถุประสงค์	36
2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	37
วัสดุ	37
อุปกรณ์	37
วิธีการศึกษา	38
1. การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ของตับอ่อนกึ่งกุลาดำทะเลและกึ่ง กุลาดำเลี้ยง	38
1.1 การสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนกึ่งกุลาดำ	38
1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์จากตับอ่อน กึ่งกุลาดำ	39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากตับอ่อนกึ่งกลาดำ	46
2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและ การทำไดอะไลซิส	46
2.2 การทำโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange chromatography)	47
2.3 การทำโครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิวเตรชัน (Gel filtration- chromatography)	48
2.4 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่แยกได้โดยวิธีโครมาโทกราฟี แบบเจลฟิวเตรชัน (Gel filtration chromatography)	48
2.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล ของเอนไซม์ที่เตรียมได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)	50
2.5.1 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)	50
2.5.2 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)	50
2.6 การหาแถบของกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากแผ่นเจลภายหลัง จากการแยกโปรตีนโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)	51
2.7 การหากิจกรรมของเอนไซม์ในแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีน โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)	51
3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์	53
3.1 พีเอชที่เหมาะสม	53
3.2 ความคงตัวต่อพีเอช	53
3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม	54
3.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ	54
3.5 ผลของอิออนของโลหะและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์	54
3.6 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์แคทาเลส	54

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3 ผลและวิจารณ์	56
1. การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ของตับอ่อนกึ่งกลาดำทะเล และกึ่งกลาดำเลี้ยง	56
1.1 การสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนกึ่งกลาดำ	56
1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์จากตับอ่อน กึ่งกลาดำ	57
2. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากตับอ่อนกึ่งกลาดำ	59
2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและการ ทำไดอะไลซิส	59
2.2 การทำโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนไอออน	62
2.3 การทำโครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิวเรชัน	65
2.4 การหาน้ำหนักโมเลกุลย่อยของเอนไซม์ที่แยกได้โดยวิธี- โครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิวเรชัน	65
2.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุล ของเอนไซม์ที่เตรียมได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส	69
2.5.1 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ	69
2.5.2 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ	69
2.6 การหาแถบของกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากแผ่นเจลภายหลัง- จากการแยกโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ	71
2.7 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในแผ่นเจลภายหลังการแยก- โปรตีนโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ	74
3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์	74
3.1 พีเอชที่เหมาะสม	74
3.2 ความคงตัวของพีเอช	76
3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม	78

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ	80
3.5 ผลของอิออนของโลหะและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์	82
3.6 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์แคทาเลส	82
4 สรุป	86
ข้อเสนอแนะ	88
เอกสารอ้างอิง	89
ภาคผนวก	103
ภาคผนวก ก วิธีการวิเคราะห์	103
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	113
ภาคผนวก ค การเตรียมคอลัมน์โครมาโทกราฟีและการตกตะกอนด้วย- เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	121
ผลงานทางวิชาการ	123
ประวัติผู้เขียน	124

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	คุณสมบัติและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิดต่างๆจากสัตว์น้ำบางชนิด	28
2	คุณสมบัติและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์แคทาเลสจากแหล่งต่างๆ	34
3	ชนิดและความเข้มข้นของสารละลายอิออนของโลหะและสารเคมีบางชนิดที่ใช้ทดสอบ	55
4	ปริมาณตับอ่อนจากกึ่งกุลาดำทะเลและกึ่งกุลาดำเลี้ยง	56
5	ปริมาณเอนไซม์สกัดและปริมาณโปรตีนจากตับอ่อนกึ่งกุลาดำทะเลและกึ่งกุลาดำเลี้ยง	57
6	กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆที่ได้จากเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนกึ่งกุลาดำทะเลและกึ่งกุลาดำเลี้ยง	60
7	ผลของช่วงเปอร์เซ็นต์ความอิมิตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรตีนของเอนไซม์แคทาเลสจากส่วนสกัดสารละลายจากตับอ่อนกึ่งกุลาดำเลี้ยง	61
8	ผลของการตกตะกอนโปรตีนที่ระดับความอิมิตัวร้อยละ 40 ของเอนไซม์แคทาเลสจากส่วนสกัดสารละลายจากตับอ่อนกึ่งกุลาดำเลี้ยง	62
9	สรุปผลขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลส	62
10	การเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลย่อยของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกึ่งกุลาดำเลี้ยงกับเอนไซม์แคทาเลสจากแหล่งอื่นๆ	68
11	ผลของอิออนและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกึ่งกุลาดำเลี้ยงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว	83
ตารางภาคผนวกที่		
ก1	องค์ประกอบของเจลในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)	111
ก2	องค์ประกอบของเจลในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)	112
ค1	ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต : เปอร์เซ็นต์ความอิมิตัว	122

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะทางกายภาพของกุ้ง	5
2 กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์กุ้งกุลาดำแช่แข็ง	7
3 แผนการทดลองในการหาแถบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์เพื่อสกัดเจล ภายหลังจากแยกโปรตีนด้วยวิธี Native-PAGE	52
4 แผนการทดลองในการหาแถบกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์เพื่อสกัดเจล ภายหลังจากแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	52
5 การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงโดยใช้คอลัมน์ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M	64
6 การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงโดยใช้คอลัมน์ โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเรชัน	66
7 กราฟมาตรฐานการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการ ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 โดยใช้คอลัมน์- Sephadex G-100	67
8 แบบแผนของโปรตีนในพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)	70
9 แบบแผนของโปรตีนในพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)	72
10 กราฟมาตรฐานการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้ บริสุทธิ์จากคอลัมน์ Sephadex G-100 โดยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)	73
11 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ	75
12 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ	77
13 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ	79
14 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ	81

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15	85
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/V_0$ และ $1/[S]$ ต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากตับอ่อนกึ่งกลาดำเลี้ยง	
ภาพภาคผนวกที่	
ก1	103
กราฟมาตรฐานไทโรซีนที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร	
ก2	105
กราฟมาตรฐานโปรตีนโบวินซีรัมอัลบูมินที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	
ก3	107
กราฟมาตรฐานน้ำตาล N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร	
ก4	108
กราฟมาตรฐานน้ำตาล N-acetyl-glucosamine (GlcNAc) ที่ความยาวคลื่น 584 นาโนเมตร	