บทที่ 4

สรุป

1. การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์จากตับอ่อนของกุ้งกุลาดำทั้งสองชนิด

ผลการสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิด จากเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วน พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสสูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในปริมาณสูงใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบสัดส่วนของปริมาตรระหว่างส่วนสกัดสารละลายกับส่วนสกัดอิมัลชั่น พบว่าส่วนสกัดสารละลายมีปริมาตรสูงกว่า อีกทั้งตัวอย่างตับอ่อนจากกุ้งกุลาดำทะเลมีไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นจึงได้เลือกเอนไซม์สกัดส่วนสกัดสารละลายของกุ้งกุลาดำเลี้ยงมาเตรียมเอนไซม์แคทาเลสบริสุทธิ์

2. การเตรียมเอนไซม์แคทาเลสบริสุทธิ์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ

เอนไซม์แคทาเลสจากส่วนสกัดสารละลายของกุ้งกุลาดำเลี้ยง สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40 ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ชนิด คือ DEAE-Toyopearl 650M และ Sephadex G-100 เอนไซม์แคทาเลสที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 22.22 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์สกัดเริ่มต้น

3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

3.1 เมื่อนำเอนไซม์แคทาเลสที่แยกได้มาทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE) พบแถบโปรตีน 1 แถบ และเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิวเตรชัน พบว่ามีขนาด 66.6 กิโลดาลตัน ในขณะที่เมื่อทำการตรวจสอบโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) จะพบแถบโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 32.7 และ 36.0 กิโลดาลตัน

3.2 การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วกับเอนไซม์แคทาเลสในส่วนสกัดสารละลายเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงและกุ้งกุลาดำทะเล พบว่า มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความคงตัวสูงที่พีเอช 6.0-8.0 ส่วนเอนไซม์

แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงและกุ้งกุลาดำทะเลในสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้นมีความคงตัวสูงที่พีเอช 7.0-8.0 และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที

3.3 กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะถูกยับยั้งตามลำดับความรุนแรงจากมากไปน้อย ได้แก่ sodium azide (NaN_3) sodium dodecyl sulfate และ ethylenediaminetetra acetic acid ตามลำดับ อิออนที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้ดี ได้แก่ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} ขณะที่ K^{+}, Na^{+} และสารประกอบอินทรีย์บางชนิดเช่น เอธานอล และเมทานอล มีผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เพียงเล็กน้อย

3.4 เอนไซม์แคทาเลสที่ได้มีค่า K_m และ V_{max} เมื่อใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสับสเตรต เท่ากับ $16.7x10^{-2}$ โมลาร์ และ $1.67x10^{3}$ ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ทำการศึกษาการนำเอนไซม์แคทาเลสจากเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลมาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะ เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติกับเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยง
2. ทำการศึกษาการทดสอบผลของตัวยับยั้งเอนไซม์แคทาเลสชนิดอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น diethyldithiocarbamate (Na-DEDTC), cyanide, hydroxylamine, 2- mercaptoethanol, sodium dithionite และ 3-amino-1,2,4- triazole
3. ควรทำการศึกษาปรับปรุงขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลสเพื่อให้ได้ผลผลิตและความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น