

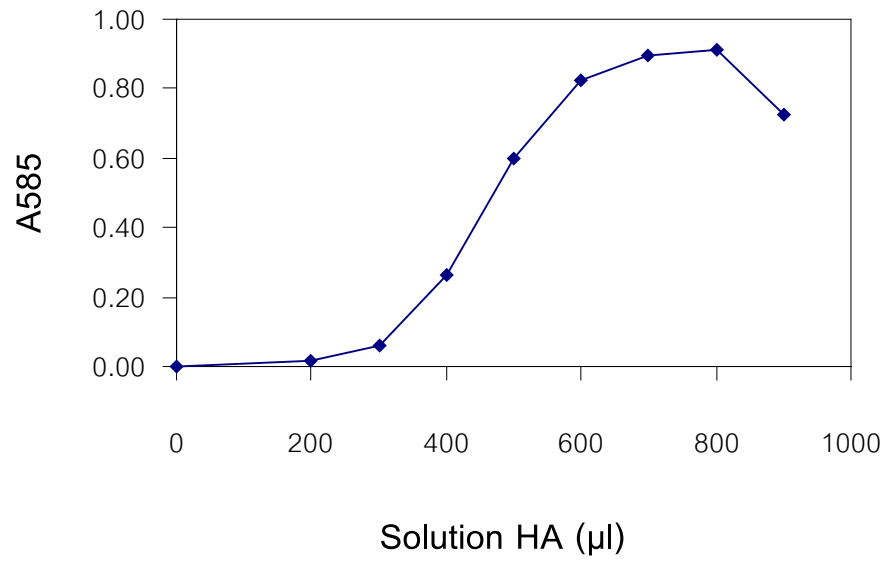
3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอกทีวิตีของเอนไซม์ไคตินเนส

3.1.1 ปริมาตรสารละลาย HA และน้ำกลั่นที่เหมาะสมต่อการเกิด

ปฏิกิริยาของ DMAB

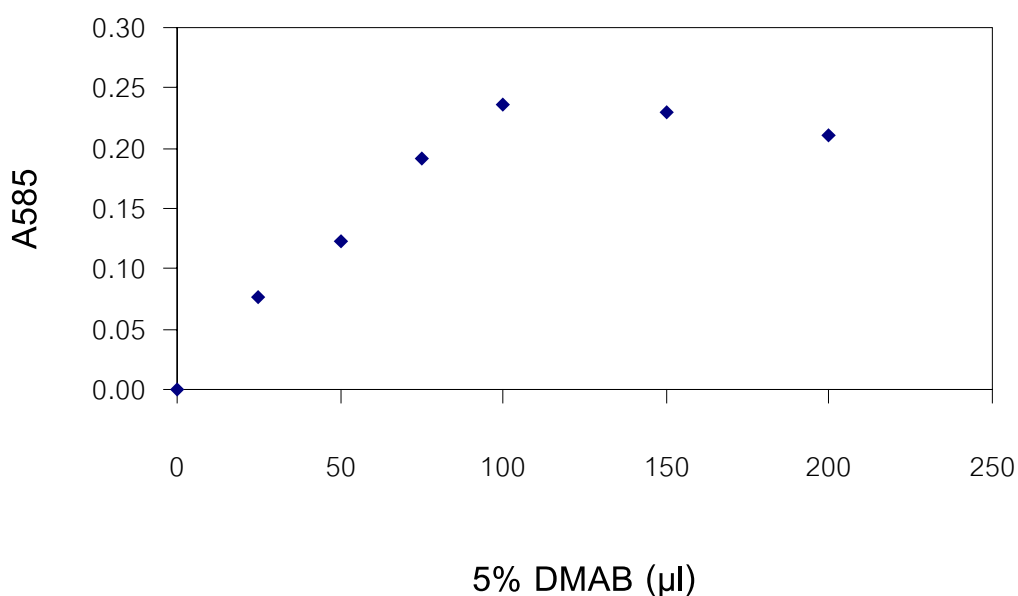
ในการหาแอกทีวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสตามวิธีของ Jeuniaux (1966) ต้องทำในภาวะที่มีความเป็นกรดมาก ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้ทดลองและบุคคลรอบข้าง ในงานวิทยานิพนธ์นี้ จึงทำการหาปริมาตรสารละลาย HA (10 N HCl 2.4 มิลลิลิตร ผสมกับ conc acetic acid 97.6 มิลลิลิตร, pH เป็น -2.53) และน้ำกลั่นที่เหมาะสมเพื่อลดความเป็นกรดลง โดยทำให้ปฏิกิริยาของ DMAB ยังคงเกิดได้ดี โดยใช้สารละลาย HA ปริมาตรต่าง ๆ ในช่วง 200-900 ไมโครลิตร และปรับด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 900 ไมโครลิตร แล้วทำการวัดปริมาณ NAG ต่อตามวิธีการข้อ 2.4.2.1 พบว่าค่า A585 จะเริ่มลดลงมากตามปริมาตรของสารละลาย HA ที่น้อยกว่า 600 ไมโครลิตร (สารผสมปฏิกิริยามีค่า pH สูงกว่า 0.85) ตามลำดับ และมีค่า A585 สูงค่อนข้างใกล้เคียงกันเมื่อใช้สารละลาย HA ในช่วง 600-900 ไมโครลิตร (รูปที่ 8) ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลาย HA ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ซึ่งก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ให้ค่า A585 สูงในเกณฑ์ที่เชื่อถือได้ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 300 ไมโครลิตร ในการทดลอง ต่อ ๆ ไป จากการวัดค่า pH ของสารผสมปฏิกิริยาเมื่อใช้สารละลาย HA ปริมาตร 600 ไมโครลิตร พบว่ามีค่า pH เป็น 0.62 ซึ่งมีความเป็นกรดน้อยกว่าวิธีของ Jeuniaux (1966) มาก ๆ



รูปที่ 8 ผลของการใช้สารละลาย HA ปริมาตรต่างๆ ต่อปฏิกิริยาของ DMAB

3.1.2 ความเข้มข้นของ DMAB ที่เหมาะสม

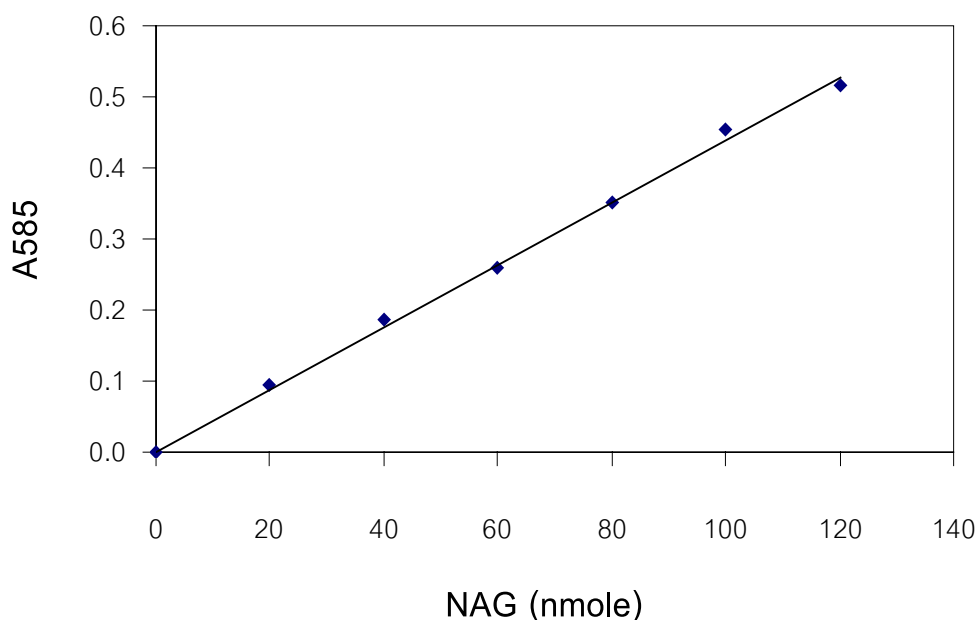
ในการหาปริมาณของผลผลิต NAG ที่เกิดขึ้นได้ จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง NAG กับ DMAB เพื่อให้เกิดเป็นสารประกอบที่มีสี จากการใช้ 5% DMAB ปริมาตรต่าง ๆ พบว่าในช่วงแรกค่า A 585 จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณของ DMAB ที่ใช้ และค่า A585 เพิ่มมากที่สุด และเริ่มคงที่เมื่อใช้ 5% DMAB ปริมาตรตั้งแต่ 100 ไมโครลิตร เป็นต้นไป (รูปที่ 9) ดังนั้นจึงเลือกใช้ 5% DMAB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หรือคิดเป็นความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.71% DMAB ในสารละลาย HA ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์โคติเนสต่อ ๆ ไป



รูปที่ 9 ความเข้มข้นของ DMAB ที่เหมาะสมต่อการหาปริมาณ NAG

3.1.3 การเตรียมกราฟมาตรฐาน NAG

ในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์จะต้องเตรียมกราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ NAG ที่เกิดขึ้นเทียบกับค่า A 585 โดยที่ปริมาณ NAG จะต้องแปรผันโดยตรงกับค่า A585 ซึ่งในการใช้ NAG ปริมาณต่าง ๆ เพื่อเตรียมกราฟ มาตรฐานในสารผสมปฏิกิริยาแล้ววัดค่า A585 พบว่าค่า A585 แปรผันเป็นเส้นตรงกับ NAG ในช่วง 0-120 nmole และมีค่าคงที่จากการทดลอง 5 ครั้ง จึงใช้กราฟมาตรฐานนี้ในการวัดค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์โคติเนสตลอดการทดลอง ซึ่งมีความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐานคือ ค่า A585 1 หน่วย มีค่าเท่ากับปริมาณ NAG 225 nmole (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของ N-Acetyl glucosamine

3.1.4 ชนิดของสับสเตรทไคตินที่เหมาะสมของเอนไซม์ไคตินเอส

จากการใช้ไคตินผง (powder chitin) ทั้ง 3 ชนิด อย่างละ 5 มิลลิกรัม เป็นสับสเตรท เพื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ไคตินเอสจากสารสกัดระดับปริมาณเท่ากัน พบว่าไคตินผงที่เตรียมจากแกนปลาหมึกให้ค่า A585 สูงกว่าไคตินผงจากเปลือกกุ้ง และกระดองปู ตามลำดับ หรือกล่าวได้ว่าเอนไซม์ไคตินเอสสามารถย่อยสลายไคตินผงจากแกนปลาหมึก เปลือกกุ้ง และกระดองปู ได้ผลผลิตเป็น NAG ด้วยอัตรา 95.94, 42.63, และ 38.56 nmole/h/mg protein ตามลำดับ ดังนั้น เอนไซม์ไคตินเอสจากสารสกัดของกุ้งแช่แข็งสามารถใช้ไคตินผงที่เตรียมจากแกนปลาหมึกเป็นสับสเตรทได้ดีกว่า ไคตินผงอีก 2 ชนิด เนื่องจากไคตินที่ได้จากแกนปลาหมึกมีการเรียงตัวของสายโพลีเมอร์แบบเบตา ในลักษณะทิศทางเดียวกันจึงจับกันได้ไม่แข็งแรง ทำให้เอนไซม์ไคตินเอสสามารถย่อยไคตินจากแกนปลาหมึกได้ง่ายกว่าเปลือกกุ้งและกระดองปูที่มีการเรียงตัวในสายโพลีเมอร์แบบอัลฟา ซึ่งมีลักษณะสวนทางกันทำให้สายโพลีเมอร์มีความแข็งแรงยากต่อการย่อยสลาย

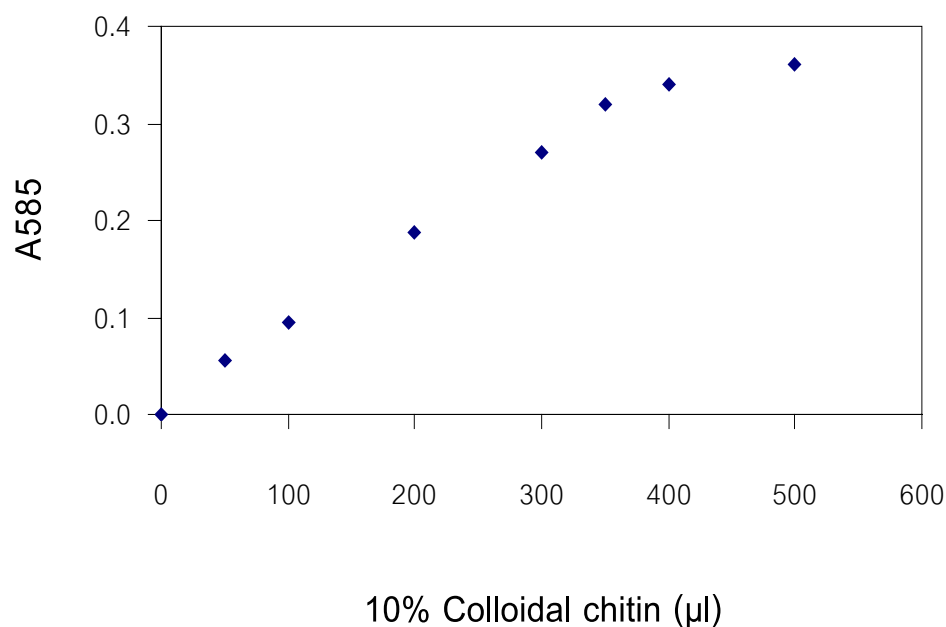
3.1.5 เปรียบเทียบไคตินผงกับ Colloidal chitin ต่อการเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมของเอนไซม์ไคตินเอส

เมื่อทดสอบการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคตินเอสจากสารสกัดระดับกับไคตินที่เตรียมจากแกนปลาหมึกในรูปผงและรูป colloidal อย่างละ 5 มิลลิกรัม พบว่า colloidal chitin ให้ค่า A585 สูงกว่าไคตินผง หรือกล่าวได้ว่าเอนไซม์ไคตินเอสสามารถย่อยสลายไคตินจากแกนปลาหมึกในรูป colloidal และในรูปผง ได้ผลผลิตเป็น NAG ด้วยอัตรา 139.60 และ 95.94 nmole/h/mg protein ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสายไคตินที่อยู่ในรูป colloidal มีการคลายตัวหลังผ่านการทำปฏิกิริยาคัด้วยกรด ทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสมากขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์ไคตินเอสจับกับสายไคตินได้ดีกว่าไคตินที่อยู่ในรูปผงที่มีการขดตัวของสายโพลีเมอร์แน่น จนไม่สามารถละลายน้ำได้ ทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสน้อย จึงยากต่อการย่อยสลายหรือเกิดได้ช้ากว่า (Malano *et al.*, 1979) ดังนั้น colloidal chitin จากแกนปลาหมึกจึงเหมาะต่อการเป็นสับสเตรทที่ใช้วัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ไคตินเอส

จากสารสกัดของกุ้งแช่บ๊วยมากกว่าการใช้ไคตินผง ในงานวิทยานิพนธ์นี้ จึงเลือกใช้ colloidal chitin ที่เตรียมจากแกนปลาหมึกในการทดลองที่เหลือทั้งหมด

3.1.6 ปริมาตรของสับสเตรท Colloidal chitin ที่เหมาะสม

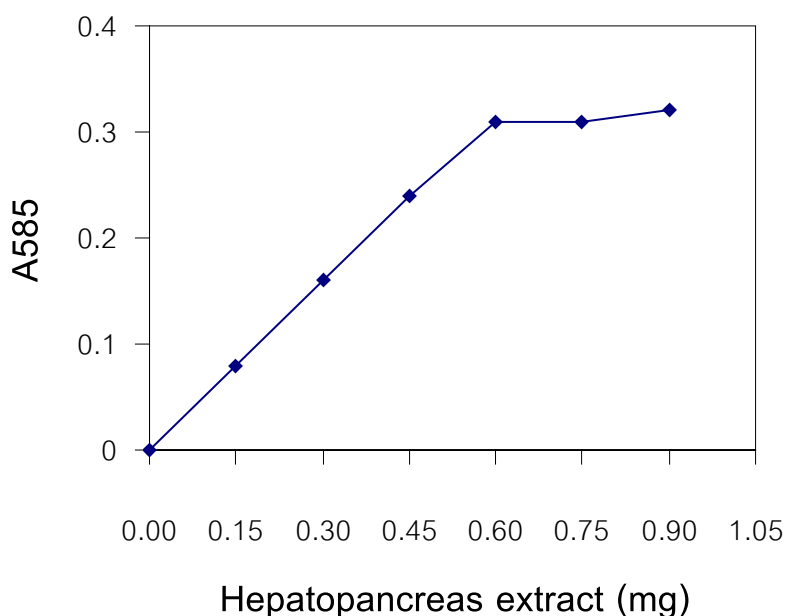
ในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสโดยกำหนดให้ปริมาณสารสกัดที่ใช้เท่ากันทั้งหมด พบว่าในช่วงแรกค่า A585 แปรผันเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงสัมพันธ์กับปริมาณ 10% colloidal chitin ที่ใช้ในช่วง 50-300 ไมโครลิตร และค่า A585 เริ่มคงที่เมื่อใช้ 10% colloidal chitin ปริมาตร 400-500 ไมโครลิตร (รูปที่ 11) ในงานนี้จึงเลือกใช้ 10% colloidal chitin ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ซึ่งให้ค่า A585 อยู่ในช่วงที่เป็นเส้นตรงเพื่อใช้วัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ไคตินเนส



รูปที่ 11 ปริมาณสับสเตรท Colloidal chitin ที่เหมาะสม
ต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคตินเนส

3.1.7 ปริมาณโปรตีนของสารสกัดตับที่เหมาะสม

ในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์โคติเนสโดยใช้ปริมาณของสับสเตรททงที่ต้องใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อปริมาณสับสเตรทที่ใช้ เมื่อนำสารสกัดตับที่เจือจางด้วยอัตรา 1:5 โดยบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะ ปริมาตรตั้งแต่ 0-120 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีน 0-0.9 มิลลิกรัม) ไปหาแอกทิวิตีของเอนไซม์โคติเนส พบว่าค่า A585 แปรผันเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงสัมพันธ์กับปริมาณสารสกัดตับในช่วง 0-90 ไมโครลิตร และเพิ่มสูงสุดและเริ่มคงที่ที่ปริมาณมากกว่า 90 ไมโครลิตร ดังแสดงผลในรูปที่ 12 ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดตับ (1:5) ปริมาตรที่เหมาะสมคือ 50 ไมโครลิตร หรือมีปริมาณ โปรตีน 0.4 มิลลิกรัม ในการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์โคติเนสต่อ ๆ ไป

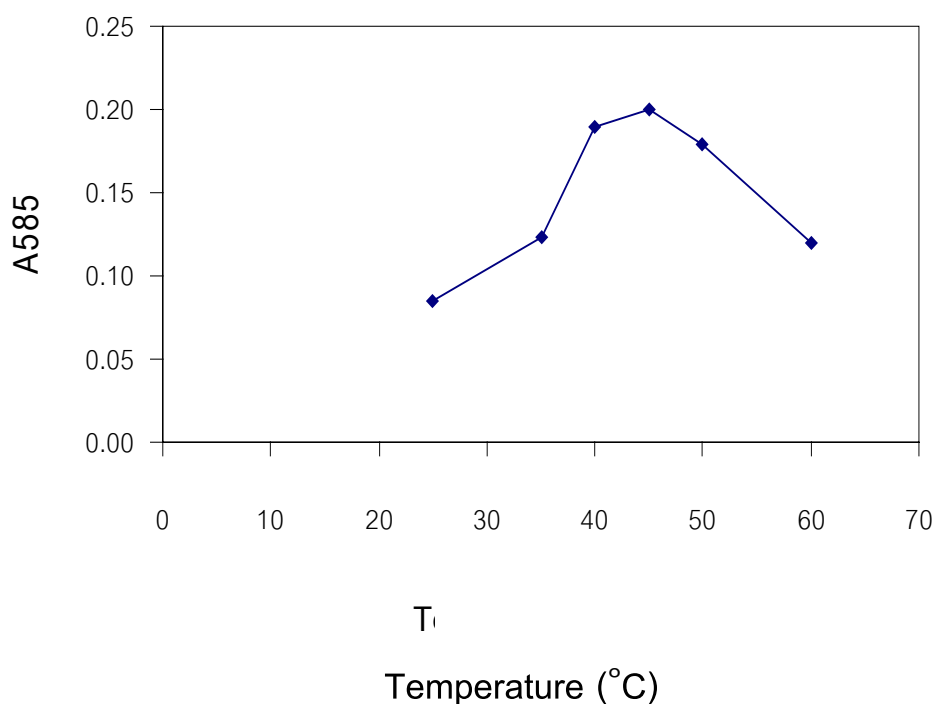


รูปที่ 12 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการวัด แอกทิวิตีของเอนไซม์โคติ

เนส

3.1.8 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

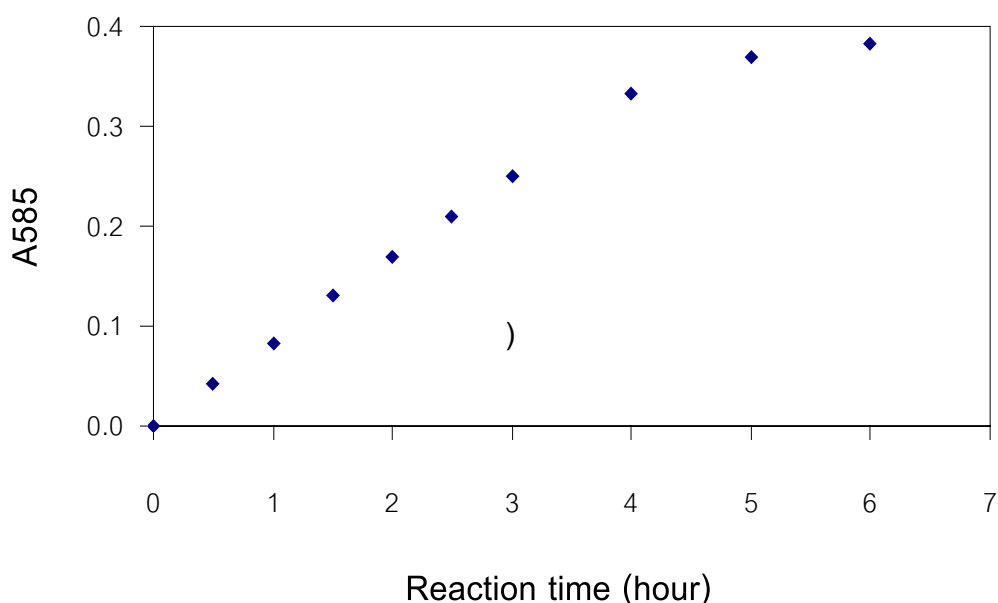
อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ช่วยให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ โดยเพิ่มพลังงานจลน์ช่วยให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้เร็วขึ้น แต่ที่อุณหภูมิที่สูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์แปลงสภาพ (denature) ได้ และทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง ซึ่งจากการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์โคติเนสในสารสกัดับที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันในช่วง 25-60 °C (รูปที่ 13) พบว่าเอนไซม์โคติเนสมีแอกทิวิตี (A585) เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ จนมีแอกทิวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 °C จากนั้นแอกทิวิตีของเอนไซม์โคติเนสจะลดลงตามลำดับจนมีค่าน้อยที่สุดเมื่อทำปฏิกิริยาที่ 60 °C บ่งชี้ให้เห็นว่าการทำปฏิกิริยาที่ 45 °C เอนไซม์โคติเนสจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด ซึ่งเหมือนกับเอนไซม์ โคติเนสที่พบใน *Aeromonas hydrophila* sub sp. และ *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 45 °C (Yabuki *et al.*, 1986) และมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ โคติเนสของกุ้งกุลาดำที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 °C (นิทรา มาศวิวัฒน์, 2543) ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงทำการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์โคติเนสที่ 45 °C



รูปที่ 13 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคตินเนส

3.1.9 เวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

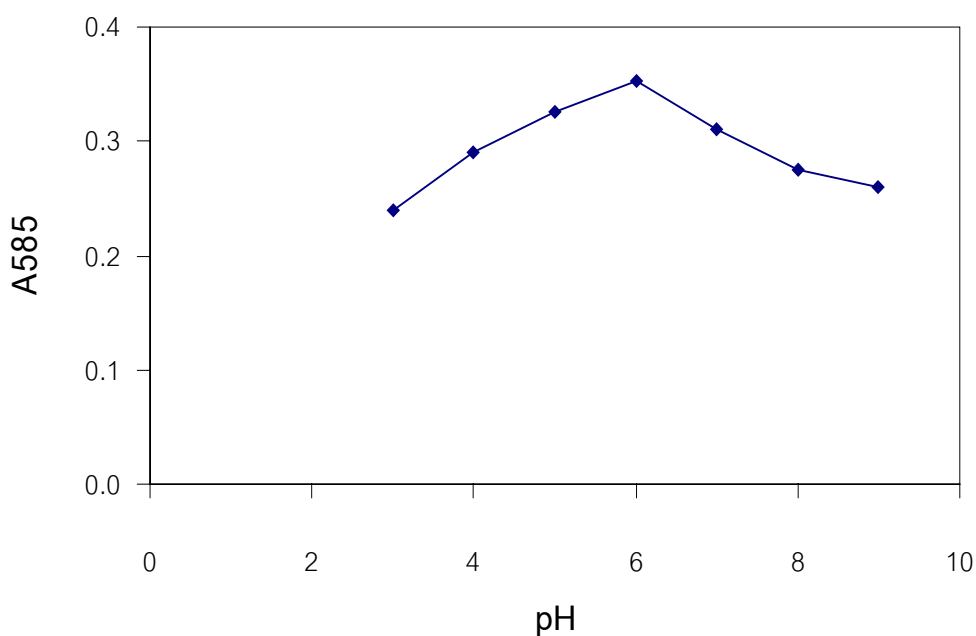
ในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ไคตินเนส ปริมาณผลผลิต NAG ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของไคตินจะแปรผันโดยตรงกับเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสในสารสกัดที่ pH 6 ณ อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-6 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจาก 0-3 ชั่วโมง ค่า A585 เพิ่มขึ้นด้วย แต่ค่า A585 จะเริ่มคงที่ที่เวลาตั้งแต่ 4 ชั่วโมงขึ้นไป (รูปที่ 14) ซึ่งสอดคล้องกับเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคตินเนสในกึ่งกลางค่า ซึ่งเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 1-4 ชั่วโมง (นิทรา มาศวิวัฒน์, 2543) ดังนั้นในการทดลองข้อต่อ ๆ ไปจึงเลือกใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ยังเป็นเส้นตรงคือที่ 2.5 ชั่วโมง



รูปที่ 14 เวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคตินเนส

3.1.10 pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ความเป็นกรด-เบสเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ ที่มีผลต่อโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ซึ่งมีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ จากการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสในสารสกัดตับ ทำในสารผสมปฏิกิริยา ในช่วง pH 3-9 พบว่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ไคตินเนส (A585) มีค่าต่ำที่สุดที่ pH 3 และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH ในช่วง 4-5 โดยมีแอกทิวิตีที่สูงสุดที่ pH 6 จากนั้นเอนไซม์ไคตินเนสทำงานลดลงตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้นจนมีแอกทิวิตีที่น้อยที่สุดที่ pH 9 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไคตินเนสในตับกึ่งแซบวัยจะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6 (รูปที่ 15) ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ไคตินเนสจากตับของกิ้งก่าลายเสือที่ทำงานได้ดีที่ pH 6.85 (Kono *et al.*, 1990) และใกล้เคียงกับของเอนไซม์ไคตินเนสจากจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำงานได้ดีในช่วง pH ก่อนไปทางกรด เช่น *Streptomyces erythracus* ที่ pH 5.0 (Hara *et al.*, 1989) และ *Metarhizium anisopliae* ที่ pH 5.3 (St. Leger *et al.*, 1991)



รูปที่ 15 pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคตินเนส

3.1.11 แอคติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสในสารสกัดตับ

จากผลการทดลองทั้งหมดนี้พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสคือใช้สารสกัดตับที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 0.4 มิลลิกรัม ทำการวัดแอคติวิตีใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 โดยใช้ 10% colloidal chitin ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เตรียมจากแกนปลาหมึกเป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ นาน 2.5 ชั่วโมง วัดปริมาณผลผลิต NAG ที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับ 0.71% DMAB โดยใช้ NAG ที่ความเข้มข้น 0-120 nmole เป็นสารมาตรฐาน จากการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไคตินเนส โดยกำหนดให้แอคติวิตีของเอนไซม์ 1 หน่วย เท่ากับปริมาตร NAG ที่เกิดขึ้น 1 nmole ที่อุณหภูมิ 45 °ซ ในเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ไคตินเนสในสารสกัดตับมีแอคติวิตีจำเพาะ (specific activity) อยู่ในช่วง 170-200 nmol/h/mg protein และเอนไซม์นี้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการใช้ *p*NP-NAG (สับสเตรทของ NAGase) เป็นสับสเตรท บ่งชี้ว่าเอนไซม์ไคตินเนสในตับของกุ้งแช่บ๊วยเป็น endochitinase เช่นเดียวกับเอนไซม์ไคติ

เนสในตับของกุ้งลายเสือ (Kono *et al.*, 1990)

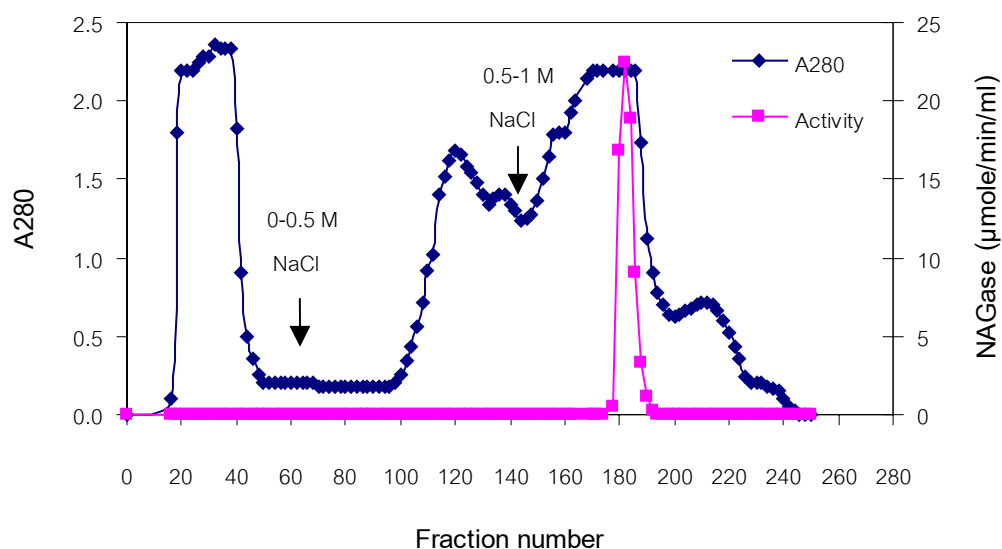
3.2 การทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากสารสกัดตับ

3.2.1 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เมื่อนำสารสกัดตับปริมาตร 10.5 มิลลิลิตร (โปรตีน 404.67 มิลลิกรัม) มีแอกทิวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ NAGase เท่ากับ $0.66 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein ไปทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย TB-PMSF จนค่า A280 เข้าใกล้ 0 พบว่ามีโปรตีนหลุดออกจากคอลัมน์ในช่วงหลอดที่ 16-50 หลังจากนั้นเมื่อชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 0-0.5 M พบว่าเริ่มมีโปรตีนแต่ไม่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ในช่วงหลอดที่ 100-140 เมื่อชะคอลัมน์ต่อด้วย 0.5-1.0 M NaCl ที่เตรียมในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค (peak) โดยเอนไซม์ NAGase ถูกชะออกมาในบัฟเฟอร์ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.69 M (รูปที่ 16) เมื่อรวมหลอดที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นและไดเอไลซ์ พบว่าสารละลายเอนไซม์เข้มข้นมีปริมาณโปรตีน 4.97 มิลลิกรัม คิดเป็น 1.23% ของสารสกัดตับเริ่มต้น และมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase เป็น 45.24 เท่าของสารสกัดตับเริ่มต้น (ตารางที่ 1) แต่เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ nondenaturing PAGE ปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ แสดงว่ายังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ ดังแสดงผลในรูปที่ 17 แถวที่ 3

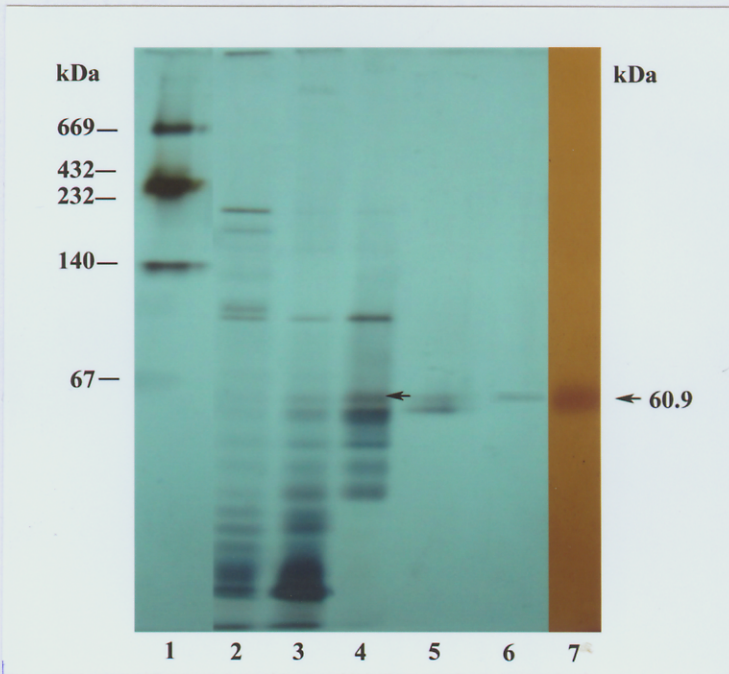
จากผลการทดลองนี้ บ่งชี้ว่าเอนไซม์ NAGase จากสารสกัดตับของกิ้งชกสามารถจับกับ DEAE-Sephacel ที่มีประจุบวกได้ดีที่ pH 7.5 เพราะไม่สามารถชะออกได้ด้วย TB-PMSF ที่มี 0-0.5 M NaCl เอนไซม์นี้ถูกชะออกจากคอลัมน์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ถึง 0.69 M (รูปที่ 16) ที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะมีความแรงของประจุมากพอที่จะไปแข่งจับกับประจุของ DEAE-Sephacel แทนที่แล้วทำให้เอนไซม์ NAGase ถูกชะออกมา เช่นเดียวกับเอนไซม์ NAGase จากซีรัมของกิ้งชกที่ถูกชะจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ที่ความเข้มข้นของ NaCl เป็น 0.73 M (สุวรรณ ภาณี, 2547) นอกจากนี้ยังคล้ายกับเอนไซม์ NAGase ของกิ้งมังกที่ถูกระบายออกจากคอลัมน์

DEAE-Sepharose ด้วย NaCl ที่ความเข้มข้น 0.52-0.64 M (Lynn, 1990) จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าเอนไซม์ NAGase มีสมบัติเป็น acidic protein ซึ่งมีประจุ



รูปที่ 16 การแยกเอนไซม์ NAGase จากสารสกัดด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

นำสารสกัดปริมาตร 10.5 มิลลิลิตร (โปรตีน 404.67 มิลลิกรัม) ไปแยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2.6x 9 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร จนค่า A280 เป็นศูนย์ แล้วชะด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 0-0.5 M ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นชะต่อด้วย 0.5-1.0 M NaCl ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร



รูปที่ 17 แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลายเอนไซม์ NAGase ที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ ที่ย้อมแบบซิลเวอร์

- แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน
- แถวที่ 2 สารสกัดตับ
- แถวที่ 3 สารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel
- แถวที่ 4 สารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์ Sephadex G-200
- แถวที่ 5 สารละลายเอนไซม์จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 1
- แถวที่ 6 สารละลายเอนไซม์จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2
- แถวที่ 7 สารละลายเอนไซม์จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 ที่ย้อมแอดทิวที

ที่ย้อมแอกทิวิตี

เป็นลบในภาวะที่มี pH เป็น 7.5 เพราะจับกับ DEAE-Sephacel ที่เป็นประจุบวกได้ และแสดงให้เห็นว่า pH 7.5 มีค่าสูงกว่า pI (isoelectric pH) ของเอนไซม์ NAGase ดังนั้น pI ของเอนไซม์ NAGase ควรมีค่าต่ำกว่า 7.5

ถึงแม้การแยกเอนไซม์ NAGase จากสารสกัดของกุ้งแชบ๊วยด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel จะยังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ (รูปที่ 17 แถวที่ 3) แต่สามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกไปได้ถึง 98.77% มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 45.20 เท่าของสารสกัดเริ่มต้น (ตารางที่ 1) ดังนั้นคอลัมน์ DEAE-Sephacel จึงเหมาะสำหรับใช้แยกเอนไซม์ NAGase จากสารสกัดของกุ้งแชบ๊วยในขั้นตอนแรก

ตารางที่ 1 การทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากสารสกัด

| Purification step | Protein | | Activity | | | Purification fold |
|------------------------|---------|-------|----------|-------|---------|-------------------|
| | mg | % | unit | % | unit/mg | |
| Hepatopancreas extract | 404.67 | 100 | 269.32 | 100 | 0.66 | 1 |
| DEAE-Sephacel eluate | 4.97 | 1.23 | 148.5 | 55.14 | 29.86 | 45.20 |
| Sephadex G-200 eluate | 0.64 | 0.16 | 105.25 | 39.08 | 164.45 | 249.17 |
| Preparative PAGE I | 0.04 | 0.01 | 12.09 | 4.49 | 282.61 | 428.20 |
| Preparative PAGE II | 0.0035 | 0.001 | 1.025 | 0.38 | 292.86 | 443.72 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง

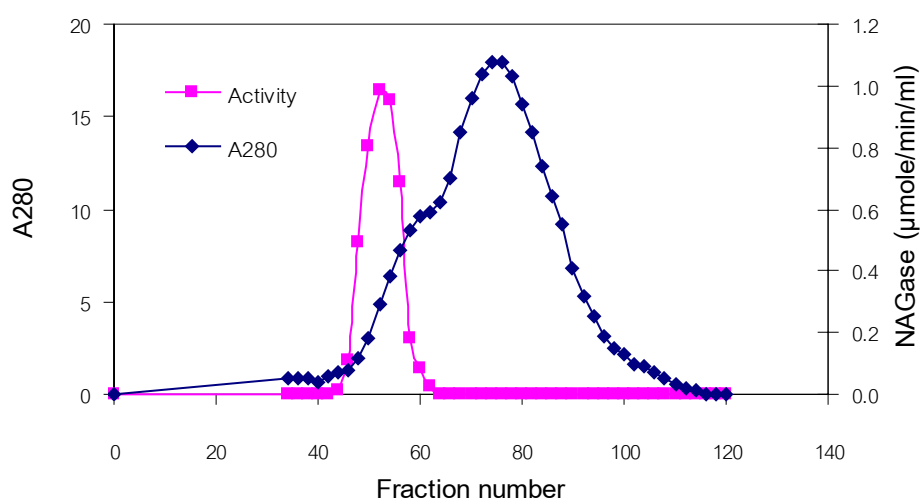
unit = $\mu\text{mol}/\text{min}$

3.2.2 โดยคอลัมน์ Sephadex G-200

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ซึ่งมีโปรตีน 4.97 มิลลิกรัม ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาเป็นฟิคใหญ่และกว้าง แต่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase เพียงฟิคเดียวในช่วงหลอดที่ 45-62 โดยหลอดที่ 52 เป็นหลอดที่มีแอกทิวิตีสูงสุด ดังแสดงผลในรูปที่ 18 เมื่อทำการรวมสารละลายหลอดที่มีแอกทิวิตีสูงเข้าด้วยกัน พบว่าแอกทิวิตีจำเพาะมีค่าเป็น 164.45 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein และมีโปรตีน 0.64 มิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase คิดเป็น 249.17 เท่าของสารสกัดเริ่มต้น (ตารางที่ 1) แต่เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์โดย nondenaturing PAGE พบว่ายังมีแถบโปรตีนปรากฏ 6 แถบ แสดงว่ายังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ (รูปที่ 17 แถวที่ 4) เมื่อเทียบกับแบบแผนโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ก่อนแยกด้วยคอลัมน์นี้ พบว่าคอลัมน์ Sephadex G-200 สามารถกำจัดโปรตีนที่มีขนาดเล็กออกไปได้

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ไปหาแถบโปรตีนของเอนไซม์ NAGase ใน nondenaturing PAGE ตามวิธีการข้อ 2.7.6 พบว่าเฉพาะโปรตีนแถบที่มีลูกศรชี้ในรูปที่ 17 (แถวที่ 4) เท่านั้นที่มีแอกทิวิตีของเอนไซม์ บ่งชี้ว่าโปรตีนแถบนี้เป็นแถบของเอนไซม์ NAGase ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลใน nondenaturing PAGE ประมาณ 60,900 ดัลตัน และจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ยังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Lynn (1990) ที่พบว่าการใช้คอลัมน์ Sephadex G-50 ไม่สามารถแยกเอนไซม์ NAGase จากทางเดินอาหารของกุ้งมังกรออกจากโปรตีนอื่นได้หมด แต่ต่างจากสมองวัวที่สามารถแยกเอนไซม์ NAGase ด้วยคอลัมน์ sephadex G-25 (Overdijk *et al.*, 1981) เช่นเดียวกับเอนไซม์ NAGase ที่ทำให้บริสุทธิ์จาก้ามของหนูได้ด้วยคอลัมน์ Superose 12 (Dennis and Hart, 1994) ซึ่งต่างจากเอนไซม์ NAGase จากกุ้งแชบ๊วยที่แยกจากซีรัม (สุวรรณา ผลใหม่, 2547) พบว่าไม่สามารถ ทำให้เอนไซม์นี้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200 ได้ ดังนั้นการแยกเอนไซม์ NAGase ต่อด้วยวิธีนี้

ยังไม่ได้เอนไซม์ NAGase ที่บริสุทธิ์ แต่ก็ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 249.17 เท่าของสารสกัดตั้งเริ่มต้น (ตารางที่ 1)



รูปที่ 18 การแยกสารละลายเอนไซม์ NAGase ที่ได้จากคอลัมน์

DEAE-Sephacel ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-200

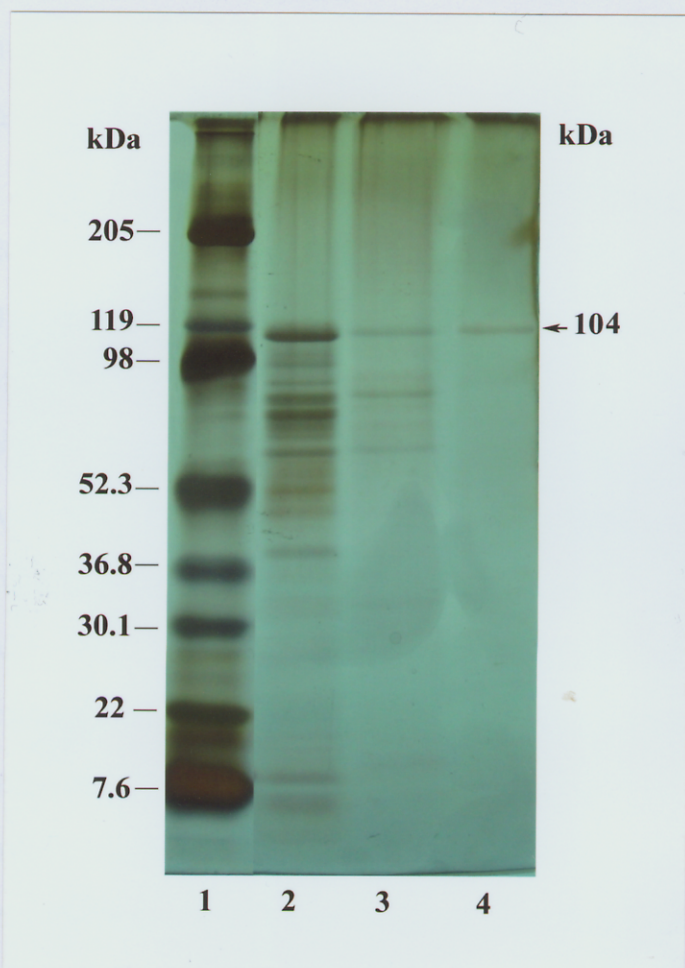
นำสารละลายเข้มข้นจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ปริมาณโปรตีน 4.98 มิลลิกรัม) ไปแยกต่อล้งคอลัมน์ Sephadex G-200 (1.6 x 84 เซนติเมตร) ล้งคอลัมน์ด้วย TB-PMSF ด้วยอัตราไหล 6 มิลลิลิตรต่อ ชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร จนค่า A280 เป็นศูนย์

3.2.3 โดย Preparative PAGE ครั้งที่ 1

จากการนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-200 ไปแยกต่อโดย preparative PAGE โดยตัดเฉพาะแถบโปรตีนของเอนไซม์ NAGase เพียงแถบเดียว (โปรตีนแถบที่ชี้ด้วยลูกศร ในรูปที่ 17 แถวที่ 4) แล้วชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลตามวิธีการข้อ 2.7.3 นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้น หาปริมาณโปรตีนและหาแอกทิวิตี พบว่าสารละลายที่เตรียมได้มีปริมาณโปรตีน 40 ไมโครกรัม และมีแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 282.61 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein คัดความบริสุทธิ์เป็น 428.20 เท่าของสารสกัดตัวเริ่มต้น (ตารางที่ 1) เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ไปทดสอบความบริสุทธิ์โดย nondenaturing PAGE พบโปรตีนแถบของเอนไซม์ NAGase และยังมีแถบโปรตีนอื่นอีก 1 แถบ และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์นี้ไปทำ SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนอยู่ 3 แถบ (รูปที่ 19 แถวที่ 3) บ่งชี้ว่าสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ยังไม่บริสุทธิ์

3.2.4 โดย Preparative PAGE ครั้งที่ 2

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่แยกได้จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 1 ไปแยกต่อโดย preparative PAGE ครั้งที่ 2 โดยตัดเฉพาะแถบโปรตีนในช่วงแถบของเอนไซม์ NAGase เพียงแถบเดียวอีกครั้ง แล้วชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลในทำนองเดียวกัน พบว่าสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้มีปริมาณโปรตีน 3.5 ไมโครกรัม มีแอกทิวิตีจำเพาะเป็น 292.85 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein คัดความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ NAGase เป็น 443.72 เท่าของสารสกัดตัวเริ่มต้น (ตารางที่ 1) และจากการทำ nondenaturing PAGE ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวทั้งจากการย้อมโปรตีนแบบ ซิลเวอร์ (รูปที่ 17 แถวที่ 6) และการย้อมแอกทิวิตี (รูปที่ 17 แถวที่ 7) แสดงว่าโปรตีนแถบนี้เป็นเอนไซม์ NAGase เมื่อนำไปวิเคราะห์โดยการทำ SDS-PAGE ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเช่นกัน (รูปที่ 19 แถวที่ 4) ดังนั้นการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 สามารถแยกเอนไซม์ได้บริสุทธิ์ เช่นเดียวกับการแยกเอนไซม์นี้จากซีรัมของกิ้งแชบ๊วยที่ต้องอาศัยการทำ preparative PAGE 2 ครั้ง จึงจะได้เอนไซม์ NAGase ที่บริสุทธิ์ (สุวรรณผลใหม่, 2547)



รูปที่ 19 แบบแผนโปรตีนใน SDS-PAGE ของสารละลายเอนไซม์ NAGase ที่ทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ ที่ย้อมแบบซิลเวอร์

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 สารละลายเอนไซม์จากคอลัมน์ Sephadex G-200

แถวที่ 3 สารละลายเอนไซม์จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 1

แถวที่ 4 สารละลายเอนไซม์จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2

3.3 การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์

3.3.1 แบบแผนโปรตีนใน PAGE

จากการทำ nondenaturing PAGE ของเอนไซม์ NAGase ที่แยกได้จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 1 ปรากฏโปรตีน 2 แถบ (รูปที่ 17 แถวที่ 5) เมื่อนำไปทำ SDS-PAGE จะปรากฏโปรตีน 3 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 104,000, 79,000 และ 60,000 คัลตัน (รูปที่ 19 แถวที่ 3) และเมื่อตัดแถบโปรตีนแต่ละแถบลำนี้ ไปชะโปรตีนออก แล้วนำไปวัดแอกทิวิตี พบแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase เฉพาะในโปรตีนแถบบนสุด (104,000 คัลตัน) ส่วนอีก 2 แถบพบว่าไม่มีแอกทิวิตี บ่งชี้ว่าโปรตีนแถบ 104,000 คัลตัน ใน SDS-PAGE เป็นแถบของเอนไซม์ NAGase และการแยกโดย preparative PAGE ครั้งที่ 1 ยังไม่ได้เอนไซม์ NAGase ที่บริสุทธิ์

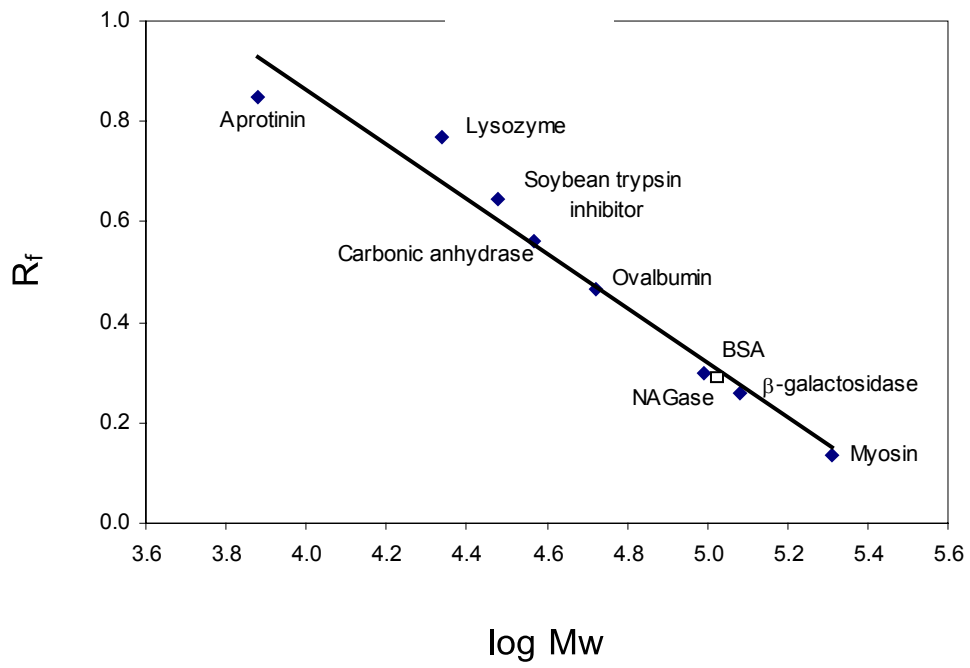
ในทำนองเดียวกันเมื่อนำเอนไซม์ NAGase ที่แยกได้จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 ไปทำ nondenaturing PAGE ปรากฏโปรตีนเพียง 1 แถบ จากการย้อมโปรตีนแบบซิลเวอร์ (รูปที่ 17 แถวที่ 6) เมื่อนำไปย้อมแอกทิวิตีตามวิธีการข้อ 2.7.5 พบแถบแอกทิวิตีของเอนไซม์เพียงแถบเดียวเช่นกัน (รูปที่ 17 แถวที่ 7) จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าเอนไซม์ NAGase ที่แยกได้จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 เป็นไปเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ เมื่อนำเอนไซม์บริสุทธิ์ไปทำ SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวเช่นกัน ตรงตำแหน่งแถบ 104,000 คัลตัน (รูปที่ 19 แถวที่ 4) จากผลการทดลองกล่าวได้ว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ไม่มีหน่วยย่อย ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ NAGase จากกุ้งมังกร อิพิเดอร์มิสของปูฟิเดเลเตอร์และจากอินทิงูเมนต์ของแมลงหวี่ ที่ไม่มีหน่วยย่อยและมีน้ำหนักโมเลกุล 116,000, 89,000 และ 100,000 คัลตัน ตามลำดับ (Lynn, 1990; Zou and Fingerma, 1999; Spindler, 1976) หรือเอนไซม์ของเชื้อรา *P. blakeslecanus* (Cohon, 1986) และจากเซลล์ไข่ของหนู ไชนิสแฮมสเตอร์ (Zhao and Neufeld, 2000) ที่ไม่มีหน่วยย่อยและมีน้ำหนักโมเลกุล 72,000 และ 83,000 คัลตัน ตามลำดับ

จากคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ ใน SDS-PAGE ซึ่งได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานรูปที่ 20 มีค่าเป็น 104,000 คัลตัน ในขณะที่

เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์เคลื่อนที่ไปไกลกว่าแถบของ BSA ที่มีขนาด 67,000 คัลตัน เล็กน้อย ใน nondenaturing PAGE (รูปที่ 17 แถวที่ 6) เมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับของโปรตีนมาตรฐานอื่น ๆ พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ใน nondenaturing PAGE ประมาณ 60,900 คัลตัน แต่เนื่องจากการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ใน nondenaturing PAGE ไม่ได้ขึ้นกับขนาดโมเลกุลอย่างเดียวเหมือนใน SDS-PAGE โดยยังขึ้นกับประจุสุทธิของโปรตีนด้วย ดังนั้น การที่เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์เคลื่อนที่ไป ใน nondenaturing PAGE ไปยังขั้วบวกได้ไกลเทียบเท่ากับโปรตีนขนาด 60,900 คัลตัน แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ NAGase มีประจุสุทธิเป็นลบมากหรือแสดงสมบัติเป็น acidic protein ซึ่งสอดคล้องกับการที่เอนไซม์นี้สามารถจับกับคอลัมน์ DEAE-Sephacel ที่มีประจุบวกในขั้นตอนการแยกตามผลการทดลองข้อ 3.2.1 ได้

3.3.2 น้ำหนักโมเลกุล

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ที่แยกได้จากการทำ preparative PAGE ครั้งที่ 2 ด้วยการทำ SDS-PAGE แล้วคำนวณจากกราฟมาตรฐาน ในรูปที่ 20 พบว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 104,000 คัลตัน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับของเอนไซม์ NAGase ซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากซีรัมของกิ้งแชบ๊วย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 107,000 คัลตัน และหาโดยวิธีเจลฟิลเทรชัน (สุวรรณา ผลใหม่, 2547) และใกล้เคียงกับของเอนไซม์จากกิ้งมังกกรและจากพิษของงูอัฟริกันพัพพ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 116,000 คัลตัน และ 102,000 คัลตัน ตามลำดับ (Lynn, 1990; Nok *et al.*, 2001) เช่นเดียวกับการทดลองของ Dennis และ Hart (1994) ที่พบเอนไซม์จากม้ามของคนมีน้ำหนักโมเลกุล 106,000 คัลตัน

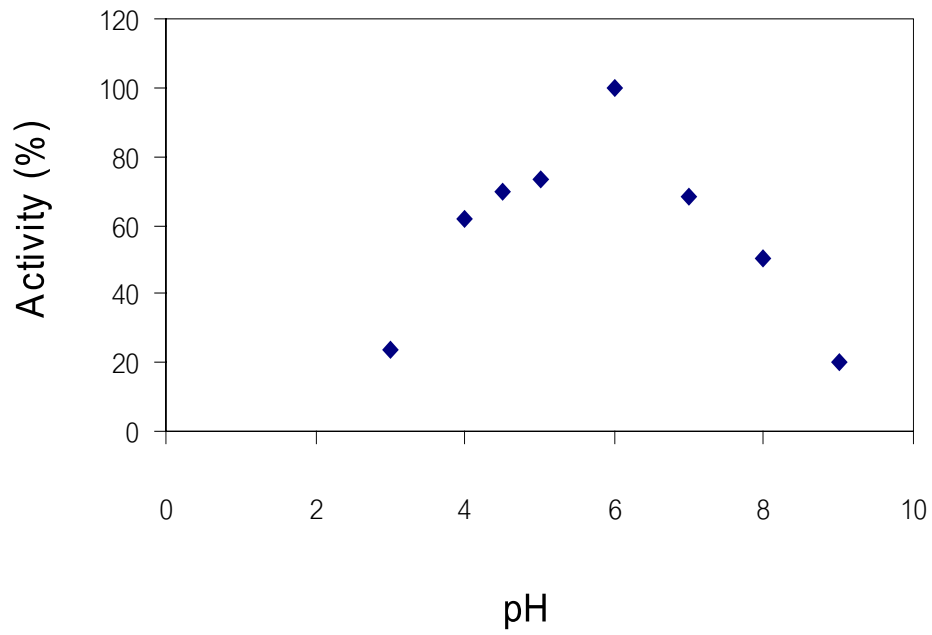


รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลใน SDS-PAGE

3.3.3 ผลของ pH

เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์เร่งปฏิกิริยาได้แตกต่างกันในสารผสมปฏิกิริยาที่มี pH แตกต่างกันตั้งแต่ pH 3-9 พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์มีแอกทิวิตีต่ำสุดที่ pH 3 (24%) มีค่าแอกทิวิตีเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH ในช่วง 4-5 และสูงที่สุดที่ pH 6 (100%) จากนั้นแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ลดลงเมื่อ pH มีค่าเพิ่มขึ้นจนมีแอกทิวิตีน้อยสุดที่ pH 9 (20%) ดังแสดงผลในรูปที่ 21

เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6 ซึ่งไม่แตกต่างจากเอนไซม์นี้ในสารสกัดที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 6 เช่นกัน และใกล้เคียงกับเอนไซม์ NAGase ที่ทำให้บริสุทธิ์จากซีรัมของกิ้งก่าที่มีแอกทิวิตีสูงสุดที่ pH 5 (สุวรรณ ภาณุ, 2547) และของเอนไซม์ NAGase จากอินทิมูเมนต์ของตั๊กแตน *L. migratoria* และแมลงหวี่ *D. hydei* ที่มีแอกทิวิตีสูงสุดที่ pH 4-5 และ pH 5.5-6.2 ตามลำดับ (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976) เอนไซม์จากฮีโมลิมพ์ของ *Biomphalaria glabrata* มีแอกทิวิตีสูงที่ pH 5.5-6.5 (Zelck et al., 1996) จากตับและอวัยวะของปูฟัดเดลออร์ พบเอนไซม์มีแอกทิวิตีสูงที่ pH 5-6 (Zou and Fingerma, 1999) จากการทดลองของ Esaiassen และคณะ (1992) และการทดลองของ Overdijk และคณะ (1981) พบเอนไซม์ NAGase จากตับของกิ้งก่าเทอร์นมีแอกทิวิตีสูงที่ pH 4-6 จึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ NAGase สามารถทำงานได้ดีที่ pH ค่อนข้างเป็นกรด

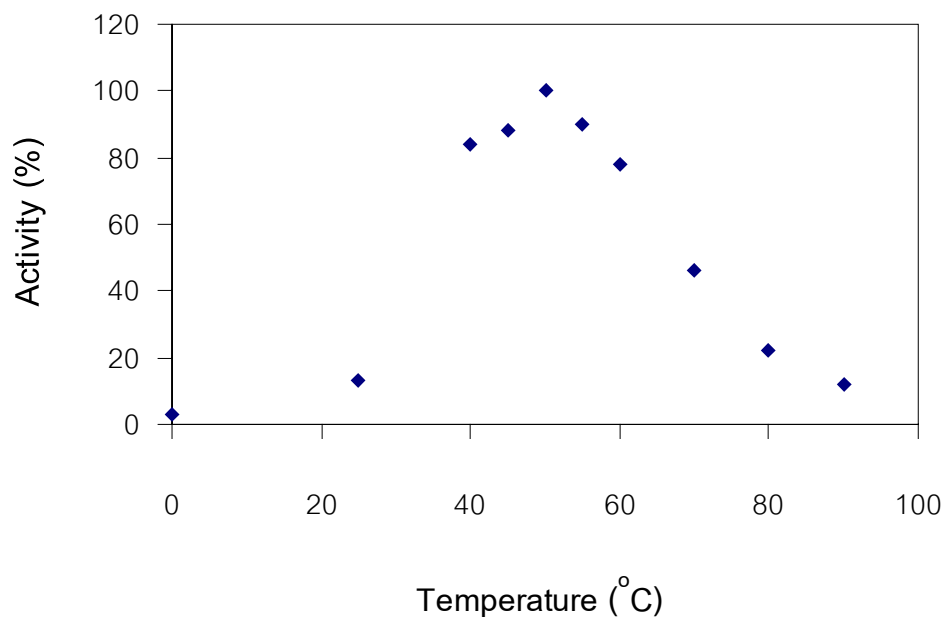


รูปที่ 21 ผลของ pH ต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์

3.3.4 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ โดยการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน นาน 15 นาที หลังจากหยุดปฏิกิริยา และวัดค่า A420 พบว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์มีแอกทิวิตีต่ำสุดที่อุณหภูมิ 25 °ซ (13%) มีค่าเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในช่วง 40-45 °ซ และสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 °ซ (100%) จากนั้นแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ลดลงตามลำดับเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 °ซ จนมีค่าน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 90 °ซ (รูปที่ 22)

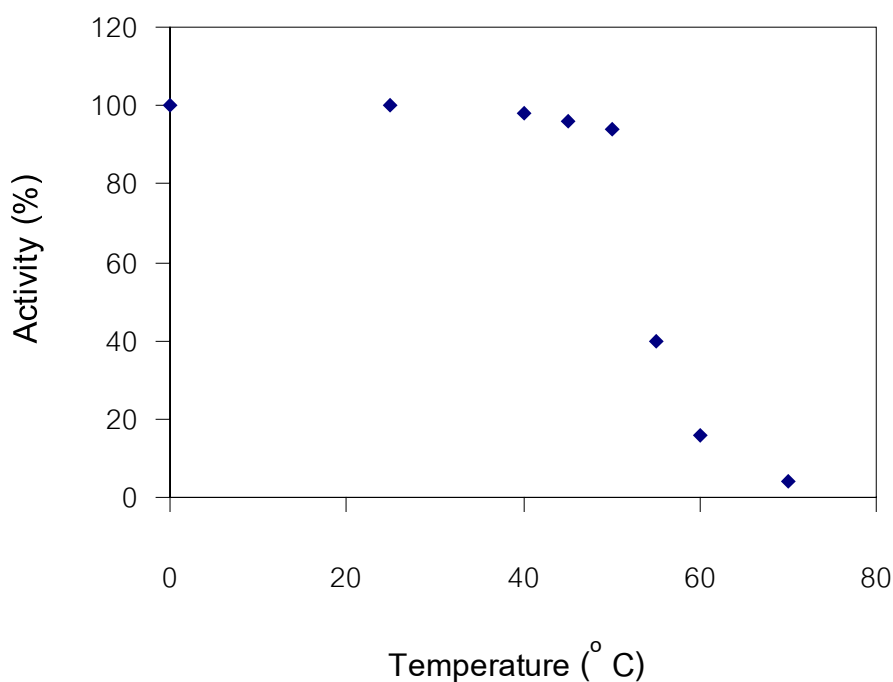
จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์และเอนไซม์นี้ในสารสกัดของกุ้งแช่บ๊วย (รูปที่ 22 และ 13) เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 °ซ เท่ากับของเอนไซม์ NAGase ที่ทำให้บริสุทธิ์จากซีรัมของกุ้งแช่บ๊วย (สุวรรณา ผลใหม่, 2547) เช่นเดียวกับเอนไซม์ NAGase จากตับและอิพิเคอร์มิสของปูฟิเดเลเตอร์และจากตับของกุ้งนอร์ทเทิร์นที่มีแอกทิวิตีสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50-60 °ซ (Zou and Fingerman, 1999) และ 50-55 °ซ (Esaiassen *et al.*, 1992) ตามลำดับ เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเพิ่มพลังงานจลน์ช่วยให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้เร็วขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้แอกทิวิตีของเอนไซม์ลดลง เพราะอุณหภูมิที่สูงเกินไปมีผลทำให้โครงรูปของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดลงจนไม่สามารถย่อยสับสเตรทได้เมื่อเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ



รูปที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์

3.3.5 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

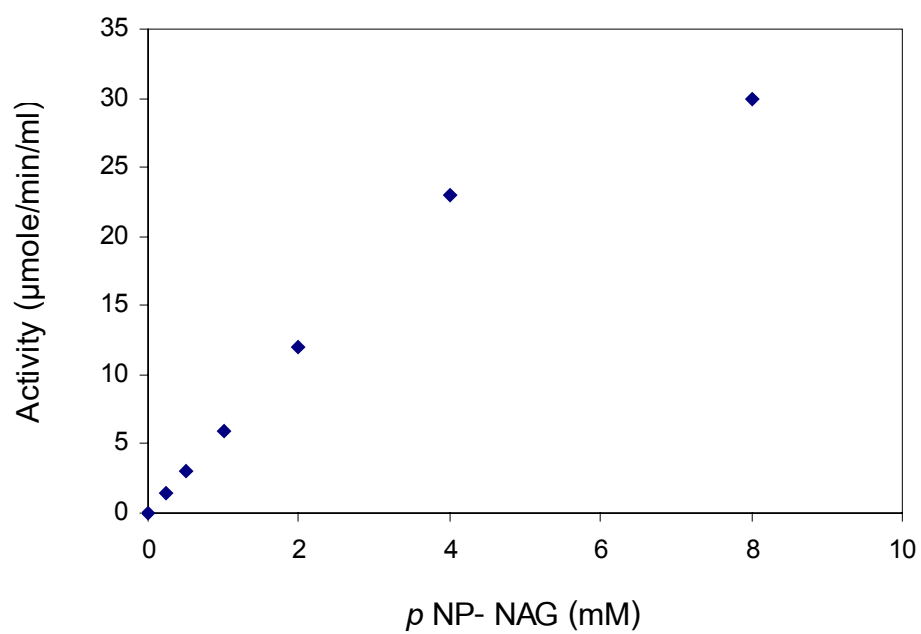
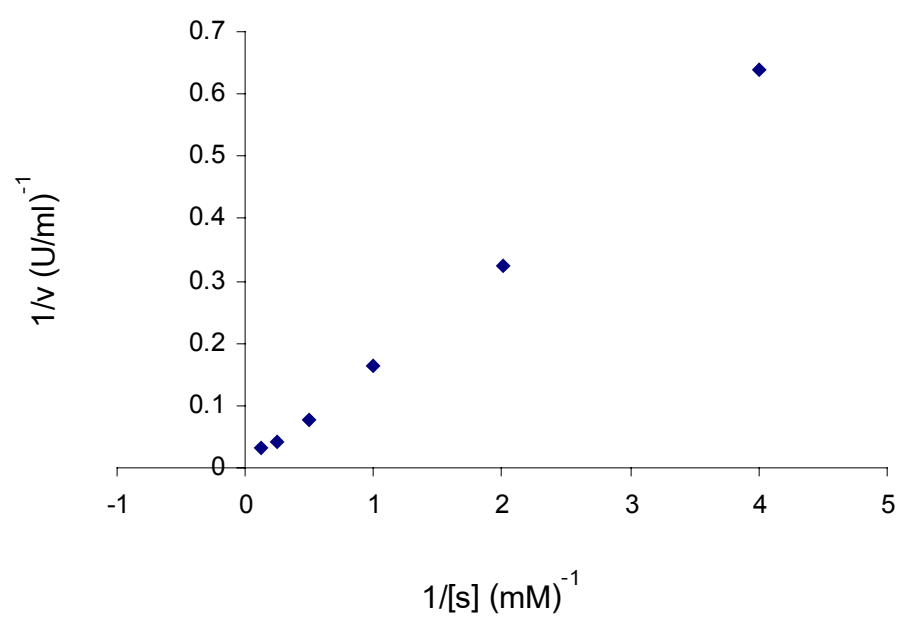
จากการทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25-70 °C นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นโดยแช่บนน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปหาแอกทิวิตีที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับเอนไซม์ซึ่งเก็บไว้ที่ 0 °C นาน 15 นาที เช่นกัน พบว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 0-50 °C และเริ่มมีแอกทิวิตีลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 55-65 °C จนเสียแอกทิวิตีเกือบสมบูรณ์ที่ 70 °C (รูปที่ 23) ในทำนองเดียวกันเอนไซม์ NAGase ที่ทำให้บริสุทธิ์จากซีรัมของกิ้งเขบ้วยก็มีสมบัติเหมือนกัน (สุวรรณา ผลใหม่, 2547) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ NAGase มีโครงสร้างเป็นโปรตีนซึ่งถูกทำให้แปลงสภาพได้ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงทำให้สูญเสียแอกทิวิตี ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์ NAGase จากอินทิงูเมนต์ของแมลงหวี *D. hydei* จากตับของกิ้งนอร์ทเทิร์นและอพิเคอร์มิสของปูฟิดเคลออร์ ที่พบว่าเอนไซม์ NAGase มีแอกทิวิตีลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50-60 °C (Spindler, 1976; Esaiassen *et al.*, 1992; Zou and Fingerma, 1999)



รูปที่ 23 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์

3.3.6 จลนศาสตร์

จากการศึกษาผลของสับสเตรท *p*NP-NAG ต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์โดยการทำให้ปฏิกิริยากับ *p*NP-NAG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 และ 8.0 mM พบว่าเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์มีจลนศาสตร์แบบ hyperbola (รูปที่ 24A) เช่นเดียวกับเอนไซม์ NAGase ที่ทำให้บริสุทธิ์จากซีรัมของกิ้งแกบว้ย (สุวรรณา ผลใหม่, 2547) และจากการหาค่า K_m และ V_{max} โดยการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ระหว่างค่า $1/V$ และ $1/[S]$ (รูปที่ 24B) พบว่าเอนไซม์ NAGase มีค่า K_m สำหรับ *p*NP-NAG เท่ากับ 10 mM และ ค่า V_{max} เท่ากับ 110.86 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein ซึ่งมีค่าสูงกว่าของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ที่แยกจากซีรัมของกิ้งแกบว้ย (K_m 3.48 mM, V_{max} 5.58 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein) (สุวรรณา ผลใหม่, 2547) แต่ใกล้เคียงกับของเอนไซม์ NAGase จากซีรัมกิ้งกุลาดำที่มีค่า K_m ต่อ *p*NP-NAG เท่ากับ 11 mM (นิทรามาศิริวัฒน์, 2543) แต่มีค่าที่ต่างจากเอนไซม์ NAGase ของเชื้อรา *P. blakeslecanus* และจากตับคนที่มีค่า K_m ต่อ *p*NP-NAG เท่ากับ 0.3 mM และ 0.13-0.2 mM ตามลำดับ (Cohon, 1986; Sasaki *et al.*, 1991)

A**B**

รูปที่ 24 จลนศาสตร์ของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์แบบ Hyperbola (A)

และแบบ Lineweaver-Burk (B)

จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ที่แยกจากสารสกัดตับในงานวิทยานิพนธ์นี้ พบว่ามีสมบัติที่คล้ายกับของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ที่แยกจากซีรัมของกิ้งก่าเขียว (สุวรรณา ผลใหม่, 2547) มาก ซึ่งได้สรุปรวมไว้ในตารางที่ 2 แต่ไม่สามารถบ่งบอกได้ว่าเอนไซม์ NAGase ที่พบในตับและในฮีโมลิมพ์ (ซีรัม) เป็นเอนไซม์เดียวกันหรือไม่ ดังนั้น เอนไซม์นี้ที่พบในฮีโมลิมพ์อาจจะสร้างมาจากตับหรือจากส่วนอื่นของกิ้งก่าเขียวก็เป็นได้

ตารางที่ 2 สมบัติของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ที่แยกมาจากตับและจากซีรัม

| Properties | NAGase purified from | |
|-----------------------|--|---|
| | Hepatopancreas | Hemolymph* |
| Molecular weight | 104,000 Dalton | 107,000 Dalton |
| Number of subunit | 1 | 1 |
| Optimal pH | 6.0 | 5.0 |
| Optimal temperature | 50 °C | 55 °C |
| Temperature stability | 0-50 °C | 0-50 °C |
| Kinetic | Hyperbola | Hyperbola |
| K_m | 10 mM | 3.48 mM |
| V_{max} | 110.86 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein | 5.58 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein |

3.4 การศึกษาบทบาทเบื้องต้นทางชีวภาพของเอนไซม์ NAGase และโคติเนส

3.4.1 บทบาทของเอนไซม์ NAGase และเอนไซม์โคติเนสในกิ้งแมง

จากการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์และในสารสกัดจากตับ กระจกและกล้ามเนื้อของกิ้งแมง ดังแสดงผลในตารางที่ 3 พบแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ NAGase ในตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด โดยพบในกระจกสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ตับ ฮีโมลิมฟ์และกล้ามเนื้อ ตามลำดับ การที่พบแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ในกระจกสูงที่สุด รองลงมาคือตับ แสดงถึงบทบาทของเอนไซม์นี้ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของกิ้งแมงเช่นเดียวกับของสัตว์ทะเลอื่น ๆ อาทิเช่น เอนไซม์ NAGase ที่พบในตับของกิ้งขาและกิ้งลายเสือ (Le Chevalier and Van Wormhoudt, 1998; Koga *et al.*, 1996) หรือในทางเดินอาหารของกิ้งนอร์ทเทิร์น (Esaiassen *et al.*, 1992) กิ้ง *Penaeus indicus* (Omondi and Stark, 1995) หรือของแมงกะพรุน (Nagai *et al.*, 1997)

การพบแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ในกล้ามเนื้อยังไม่สามารถคาดเดาบทบาทของเอนไซม์ได้แน่ชัด อาจเป็นระดับแอกทิวิตีพื้นฐานของเอนไซม์ที่มีทั่วไปเพื่อเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์ ในทำนองเดียวกับการพบเอนไซม์นี้ในซีรัมหรือในฮีโมลิมฟ์ของกิ้งซึ่งไม่ได้อยู่ในระยะการลอกคราบ (ระยะคราบแข็ง) จึงไม่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ แต่ยังไม่สามารถบอกบทบาทของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกิ้งในภาวะปกติทั้งที่ไม่มีการลอกคราบและไม่ได้ติดเชื้อมีโรคได้

ในการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์โคติเนสในตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด (ตารางที่ 3) พบแอกทิวิตีของเอนไซม์โคติเนสมากในตับและในกระจก พบเล็กน้อยในฮีโมลิมฟ์ โดยไม่พบแอกทิวิตีในกล้ามเนื้อ ดังนั้นเอนไซม์โคติเนสที่พบในตับและกระจกน่าจะ

บทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยอาหาร ไคตินเช่นเดียวกับเอนไซม์ไคตินเนสที่พบในตับและ mid gut ของกิ้ง *Palaemon serratus* (Spindler-Barth *et al.*, 1990)

ตารางที่ 3 แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์ NAGase ในกิ้งแซบวัย

| Sample | Chitinase (nmol/h/mg protein) | NAGase (nmol/min/mg protein) |
|----------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Hepatopancreas | 194.5 ± 6.1 | 835.5 ± 5.0 |
| Gut | 202.7 ± 9.7 | 952.0 ± 8.0 |
| Muscle | 0 | 12.1 ± 0.4 |
| Hemolymph | 1.4 ± 0.1 | 24.9 ± 0.1 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐาน ที่ได้จากกิ้งตัวอย่าง การทดลองละ 3-5 ตัว

3.4.2 บทบาทของเอนไซม์ NAGase และเอนไซม์ไคตินเนสที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อก่อโรครกิ้ง

จากการกระตุ้นกิ้งแซบวัยให้ติดเชื้อ โดยการฉีดเชื้อ *V. harveyi* ตัวละ 2.5×10^7 เซลล์ ซึ่งเป็นปริมาณที่สุวรรณา ผลใหม่ (2547) พบว่าเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ทำให้กิ้งติดเชื้อได้ดีแต่ไม่ตายภายใน 18 ชั่วโมง เมื่อวัดระดับเอนไซม์ NAGase ในซีรัมและตับของกิ้งแซบวัยที่ฉีดเชื้อเทียบกับกิ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือและไม่มีอาการติดเชื้อ ทำที่เวลา 0, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง หลังการฉีด พบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกิ้งชุดควบคุมมีระดับไม่แตกต่างกัน ณ เวลาต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 ใน

ขณะที่ แอคทีวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกุ้งที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อ *V. harveyi* เพิ่มขึ้นจากระดับก่อนฉีด (0 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p= 0.01$) เป็น 1.92, 2.00 และ 2.13 เท่า ที่เวลา 6, 12 และ 18 ชั่วโมง หลังการฉีด ตามลำดับ ผลการทดลองนี้แสดงถึงบทบาทของเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแชบ๊วย ซึ่งสอดคล้องกับการกระตุ้นให้ทากน้ำจืด (freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*) ติดเชื้อ schistosome parasite ที่พบว่ามีแอคทีวิตีของเอนไซม์ NAGase และเอนไซม์ N-acetyl- β -D-galactosaminidase (ซึ่งย่อยสลายได้ N-acetyl galactosamine, NAcGal) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในพลาสมา (plasma) หลังการติดเชื้อ 2 วัน บ่งชี้ว่าน้ำตาล NAG และ NAcGal เกี่ยวข้องกับกลไกการจดจำและป้องกันตนเอง และยังพบว่าหลังการติดเชื้อ 4 วัน แอคทีวิตีของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ลดลงเท่ากับระดับภาวะก่อนติดเชื้อ ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่ schistosome parasite ถูกทำลายโดยฮีโมไซท์ (hemocyte) ของทากน้ำจืด (Zelck , 1999) ในทำนองเดียวกัน แอคทีวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ NAGase ในตับของกุ้งที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* มีระดับสูงกว่าของกุ้งชุดควบคุม วัดที่เวลา 18 ชั่วโมง หลังการฉีด คิดเป็น 1.50 เท่า (อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%, $p= 0.01$) (ตารางที่ 4) ดังนั้น เอนไซม์ NAGase ที่เพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์จากผลของการติดเชื้อส่วนหนึ่งอาจมาจากตับของกุ้งแชบ๊วย เพราะจากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ในผลการทดลองข้อ 3.3 พบว่าเอนไซม์ NAGase ในตับและในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยมีสมบัติต่าง ๆ คล้ายกันมาก แต่กลไกของเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์ในการป้องกันตนเองของกุ้งแชบ๊วยต่อเชื้อก่อโรคเป็นเช่นไร ยังไม่สามารถสรุปได้ ณ ที่นี้

เนื่องจากเอนไซม์โคติเนสและเอนไซม์ NAGase ทำงานร่วมกันอยู่ในระบบโคติโนไลติกของกุ้ง และจากการพบว่าระดับของเอนไซม์ NAGase เพิ่มขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ดังนั้น ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงได้ทำการศึกษาเอนไซม์โคติเนสว่าจะเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของกุ้งด้วยหรือไม่ จึงได้วัดระดับแอคทีวิตีของเอนไซม์โคติเนสในซีรัมและตับของกุ้งแชบ๊วยที่ถูกกระตุ้นให้มีการติดเชื้อ *V. harveyi* เทียบกับกุ้งชุดควบคุม พบว่า แอคทีวิตีของเอนไซม์โคติเนสทั้งในซีรัมและในตับของกุ้งทั้ง 2 ชุด มีระดับต่ำมากเมื่อเทียบกับของเอนไซม์ NAGase โดยพบแอคทีวิตี

ของเอนไซม์ไคตินเนสทั้งในซีรัมและในตับของกุ้งที่ฉีดเชื้อและของกุ้งชุดควบคุม มีค่าไม่แตกต่างกันหลังการฉีด 18 ชั่วโมง (ตารางที่ 4) และเนื่องจากกุ้งที่ใช้ตลอดช่วงของการทดลองไม่ได้อยู่ในระยะลอกคราบ ดังนั้น จากผลการทดลองนี้เป็นไปได้ที่เอนไซม์ไคตินเนสไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องหรือตอบสนองต่อการติดเชื้อ ดังเช่นเอนไซม์ NAGase แต่การมีแอกทิวิตีของเอนไซม์เป็นระดับพื้นฐานปกติทั่วไป เป็นเพราะเอนไซม์ไคตินเนสที่พบในฮีโมลิมฟ์อาจทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบ และที่พบในตับเกี่ยวกับการย่อยอาหารที่เป็นไคติน

ตารางที่ 4 แอกทิวิตีของเอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์ NAGase ของกุ้งที่ฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi*

| Enzymes | Time after injection (hour) | Control (0.9% NaCl) | | <i>Vibrio harveyi</i> (2.5×10^7) | |
|---|-----------------------------|---------------------|------|---|-------|
| | | Activity | Fold | Activity | Fold |
| NAGase in hemolymph (nmol/min/ mg protein) | 0 | 24.79 ± 1.10 | 1 | 25.71 ± 0.48 | 1 |
| | 6 | 25.24 ± 0.88 | 1.01 | *49.25 ± 1.86 | *1.92 |
| | 12 | 24.35 ± 1.07 | 0.98 | *51.41 ± 1.60 | *2.00 |
| | 18 | 24.49 ± 1.01 | 0.99 | *54.80 ± 1.50 | *2.13 |
| NAGase in hepatopancreas (nmol/min/mg protein) | 18 | 791.46±28.12 | 1 | *1183.81 ± 95.71 | *1.50 |
| Chitinase in hemolymph (nmol/h/ mg protein) | 18 | 1.44 ± 0.12 | 1 | 1.50 ± 0.07 | 1.04 |
| Chitinase in hepatopancreas (nmol/h/mg protein) | 18 | 193.15 ± 8.77 | 1 | 206.75 ± 13.04 | 1.07 |

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐานที่ได้จากกุ้งตัวอย่าง การทดลองละ 4-8 ตัว

* เป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% (p=0.01)

กุ้งที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* (ตัวละ 2.5×10^7) แสดงผลการติดเชื้อในตับ

กุ้งที่ฉีดด้วยน้ำเกลือไม่แสดงผลการติดเชื้อในตับ