บทที่ 4

สรุป

1. **การสกัดเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสจากตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ**

ผลการสกัดเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงจากเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วน คือ ส่วนสารละลายและส่วนอิมัลชั่น พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในปริมาณใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของปริมาตรระหว่างส่วนสกัดสารละลายกับส่วนสกัดอิมัลชั่น พบว่าส่วนสกัดสารละลายมีปริมาตรสูงกว่า ดังนั้นจึงได้เลือกส่วนสกัดสารละลายของตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงมาเตรียมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสบริสุทธิ์

2. **การเตรียมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสบริสุทธิ์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ**

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสจากส่วนสกัดสารละลายของกุ้งกุลาดำเลี้ยง สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40-60 ผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ชนิด คือ DEAE-Toyopearl 650M และ Sephadex G-100 เอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 176.47 และ 139.12 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์สกัดเริ่มต้น ตามลำดับ

3. **การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์**

3.1 เมื่อนำเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสที่แยกได้มาทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE) พบแถบโปรตีน 1 แถบ และเมื่อนำเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสที่แยกได้มาทำการตรวจสอบโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) จะพบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบเช่นเดียวกัน ซึ่งเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสมีมวลโมเลกุลขนาด 31.62 และ 45.71 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

3.2 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 9 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความคงตัวสูงที่พีเอชและอุณหภูมิในช่วง 8.0-9.0 และ 37-40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที ส่วนเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4 และอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส มีความคงตัวสูงที่พีเอชและอุณหภูมิในช่วง 3.0-5.0 และ 37-40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.3 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ถูกยับยั้งกิจกรรมอย่างมากจาก sodium azide sodium dodecyl sulfate และ ethylenediaminetetra acetic acid ตามลำดับ ส่วน Cu^{2+} และ Hg^{2+} ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 23 และ 52 ในขณะที่การเติมอิออน K^{+}, Na^{+} และ Li^{+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ให้เพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, NH_4^{2+} เอธานอล และเมทานอล นั้นกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ให้เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าพวกโมโนวาเลนต์

กรณีของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส พบว่า sodium azide ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากที่สุด รองลงมาเป็น Hg^{2+}, sodium dodecyl sulfate และ ethylenediaminetetra acetic acid ตามลำดับ ในขณะที่เอธานอล และเมทานอล ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 23 การเติมอิออน K^{+}, Na^{+}, Li^{+}, Ca^{2+} และ Mg^{2+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ให้เพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาการนำเอนไซม์แคทาเลสจากเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลมาทำให้ บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะ เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติกับเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยง
2. ควรทำการศึกษาการทดสอบผลของตัวยับยั้งชนิดอื่นๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์เพิ่มเติม เช่น diethyldithiocarbamate (Na-DEDTC), cyanide, hydroxylamine, 2-mercaptoethanol, sodium dithionite และ 3-amino-1,2,4- triazole
3. ควรทำการศึกษาปรับปรุงขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ทั้งสองชนิดเพื่อให้ได้ผลผลิต และความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น