บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ

จากการสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำเลี้ยงมาคำนวณขนาดเฉลี่ยของตัวกุ้งต่อกิโลกรัม จำนวน 3 ซ้ำ พบว่ากุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ใช้ในการทดลองมีขนาดเฉลี่ย 55 ตัวต่อกิโลกรัม หลังจากนั้นนำส่วนของตับอ่อนของกุ้งมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาสัดส่วนของตับอ่อนของกุ้งกุลาดำต่อน้ำหนักตัวกุ้ง พบว่ากุ้งกุลาดำเลี้ยงมีสัดส่วนของตับอ่อนต่อตัวกุ้งเท่ากับ 0.94 กรัมต่อตัวกุ้ง (Table 3)

Table 3. The average weight of hepatopancreas from cultured black tiger shrimp

Parameter	Cultured black tiger shrimp
Size (number of shrimp/kg)	55±1.73
Hepatopancreas (g/kg)	50.87±1.62
Hepatopancreas (g/shrimp)	0.94
Hepatopancreas (%w/w)	0.51

Data : Means ± S.D. (n=3)

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ

เมื่อนำตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยง มาทำการสกัดเอนไซม์พบว่าได้เอนไซม์สกัด 2 ส่วน คือ ส่วนสกัดสารละลาย (solution) และส่วนสกัดอิมัลชั่น (emulsion) โดยส่วนสกัดละลายคิดเป็นร้อยละ 97.11 ของปริมาตรเอนไซม์สกัดทั้งหมด และส่วนสกัดอิมัลชั่นคิดเป็นร้อยละ 2.89 ของปริมาตรสารละลายทั้งหมด (Table 4)

เมื่อนำเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วนมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน พบว่าส่วนสกัดสารละลายมีปริมาณโปรตีนมีค่าเท่ากับ 10.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ปริมาณโปรตีนจากส่วนสกัดอิมัลชั่น มีค่าเท่ากับ 13.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 4)

Table 4. Solution and emulsion of enzyme from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp

Source of enzyme	Extracted volume (ml)	(%)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)
Solution	168	97.11	10.89	1,829.52
Emulsion	5.0	2.89	13.67	68.35

ผลการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วนจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ (Table 5) พบว่าเอนไซม์สกัดทั้งสองส่วนจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในส่วนสกัดสารละลายและส่วนสกัดอิมัลชั่นเท่ากับ 3.40×10^{-3} และ 1.61×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในส่วนสกัดสารละลายและส่วนสกัดอิมัลชั่นเท่ากับ 1.14×10^{-3} และ 1.21×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของปริมาตรของเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วน พบว่าส่วนสกัดอิมัลชั่นมีปริมาตรน้อยกว่ามากเปรียบเทียบกับส่วนสกัดสารละลาย ดังนั้นจึงเลือกส่วนสกัดสารละลายของกุ้งกุลาดำเลี้ยงมาทำบริสุทธิ์เอนไซม์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในขั้นตอนต่อไป

Table 5. Activity of enzymes from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp in solution and emulsion

Activity of Enzyme	Crude enzyme	
	Solution	Emulsion
Alkaline phosphatase		
(Unit/ml)	0.037	0.022
(Unit/mg protein)	3.40×10^{-3}	1.61×10^{-3}
Hyaluronidase		
(Unit/ml)	0.0124	0.0166
(Unit/mg protein)	1.14×10^{-3}	1.21×10^{-3}

Data : units/ml and units/mg protein, Mean $\pm$ S.D. (n=3)

3. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ

3.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำไดอะไลซิส

นำสารละลายเอนไซม์สกัดจากกุ้งกุลาดำเลี้ยงมาทำบริสุทธิ์เอนไซม์โดยเริ่มจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จากการทดลองโดยค่อยๆ เพิ่มปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความอิ่มตัวร้อยละ 20-80 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีมากที่สุดเมื่อตกตะกอนจนมีความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงร้อยละ 40-60 ดังนั้นจึงทำการนำสารละลายเอนไซม์สกัดใหม่มาทำการตกตะกอน โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 40-60 พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองชนิดจากกุ้งกุลาดำเลี้ยงเท่ากับ 3.88×10^{-3} และ 1.34×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (Table 6 and Table 7)

Table 6. Ammonium sulfate precipitation at various salt saturation for alkaline phosphatase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Total activity (Units)	Specific activity (units/mg protein)
Crude extract	85	10.89	0.037	3.145	3.4×10^{-3}
$(NH_4)_2SO_4$ precipitate					
20-40% sat.	9.0	15.81	0.042	0.378	3.64×10^{-3}
40-60% sat.	7.5	12.81	0.050	0.375	3.88×10^{-3}
60-80% sat.	7.0	9.96	0.019	0.133	1.86×10^{-3}

Table 7. Ammonium sulfate precipitation at various salt saturation for hyaluronidase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Total activity (Units)	Specific activity (units/mg protein)
Crude extract	50	10.89	0.0124	0.62	1.14×10^{-3}
$(NH_4)_2SO_4$ precipitate					
20-40% sat.	9.0	15.81	0.0160	0.144	1.01×10^{-3}
40-60% sat.	7.5	12.81	0.0172	0.129	1.34×10^{-3}
60-80% sat.	7.0	9.96	0.0070	0.049	7.1×10^{-4}

เมื่อตกตะกอนโปรตีนส่วนสกัดสารละลายจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว นำตะกอนที่ได้ละลายในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 จนตะกอนละลายหมดแล้วนำไปผ่านการกำจัดเกลือออกโดยวิธีการไดอะไลซิส เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสพบว่ามีค่าเท่ากับ 2.09×10^{-2} และ 7.95×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Table 7 and Table 8) ในขั้นตอนนี้พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นไม่มากนัก ซึ่งสังเกตจากค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นเพียงเล็กน้อยทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขั้นตอนการทำไดอะไลซิสอาจกำจัดเกลือออกไปไม่หมดทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ถูกรบกวนจากเกลือส่วนที่เหลืออยู่ทำให้ค่ากิจกรรมที่ได้สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อคิดเป็นผลผลิต (yield) พบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 27.57 และ 31.29 ตามลำดับ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 6.15 และ 6.97 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น (Table 8 and Table 9)

Table 8. Summary of alkaline phosphatase purification from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp

Purification steps	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units/ mg)	Yield (%)	Purity (fold)
Crude extract	139	10.89	1,513.71	5.143	3.40×10^{-3}	100	1
40-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$	37.0	12.81	473.97	1.850	3.90×10^{-3}	35.97	1.15
Dialysis	46.50	1.46	67.89	1.418	2.09×10^{-3}	27.57	6.15
DEAE-Toyopearl 650M	72.50	0.095	8.097	1.037	0.128	20.16	37.65
Sephadex G-100	19.25	0.025	0.48	0.2887	0.60	5.61	176.47

Table 9. Summary of hyaluronidase purification from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp

Purification steps	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units/ mg)	Yield (%)	Purity (fold)
Crude extract	139	10.89	1,513.71	1.723	$1.14x10^{-3}$	100	1
40-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$	37.0	12.81	473.97	0.636	$1.34x10^{-3}$	36.92	1.18
Dialysis	46.50	1.46	67.89	0.539	$7.95x10^{-3}$	31.29	6.97
DEAE-Toyopearl 650M	57.0	0.118	9.263	0.404	0.0436	23.42	38.25
Sephadex G-100	23.50	0.043	1.015	0.161	0.1586	9.34	139.12

3.2 การทำโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนอิออน

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซิสแล้ว ปริมาตร 46.50 มิลลิลิตร มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M ผลการทดลอง (Figure 3) พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาสี่พีคติดกันในช่วงแรกที่ทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ อยู่ในช่วงแฟรคชั่นที่ 8-34 เมื่อนำมาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส พบว่าไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ ไฮยาลูโรนิเดสของโปรตีนทั้งสี่พีค ในขณะที่พีคที่สองและพีคที่สามที่ติดกันพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปริมาณเล็กน้อย ต่อมาเมื่อทำการชะโปรตีนที่ไม่จับกับเรซินในคอลัมน์ออกหมดแล้วซึ่งสังเกตจากโปรตีนที่ 280 นาโนเมตรมีค่าเข้าใกล้ศูนย์หรือเท่ากับศูนย์แล้ว จึงเริ่มชะโปรตีนที่จับกับเรซินในคอลัมน์ด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-0.35 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ภายหลังการชะพบว่ามีโปรตีนออกมาหลายพีค โดยในพีคแรกที่ติดกันนั้น (แฟรคชั่นที่ 50-62) พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นช่วงกว้างและมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าในช่วงแรกที่ตรวจพบ ต่อมาเมื่อโปรตีนถูกชะออกมาในช่วงพีคที่สองถึงพีคที่สี่ซึ่งเป็นพีคที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรสูงกว่าพีคแรกนั้น พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (แฟรคชั่นที่ 81-99) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่ถูกชะออกมาก่อนในช่วงที่ทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ในช่วงแรกนั้นเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถจับกับเรซินชนิด DEAE-Toyopearl 650M ซึ่งเป็นเรซินชนิดประจุบวกที่พีเอช 7.0 ได้

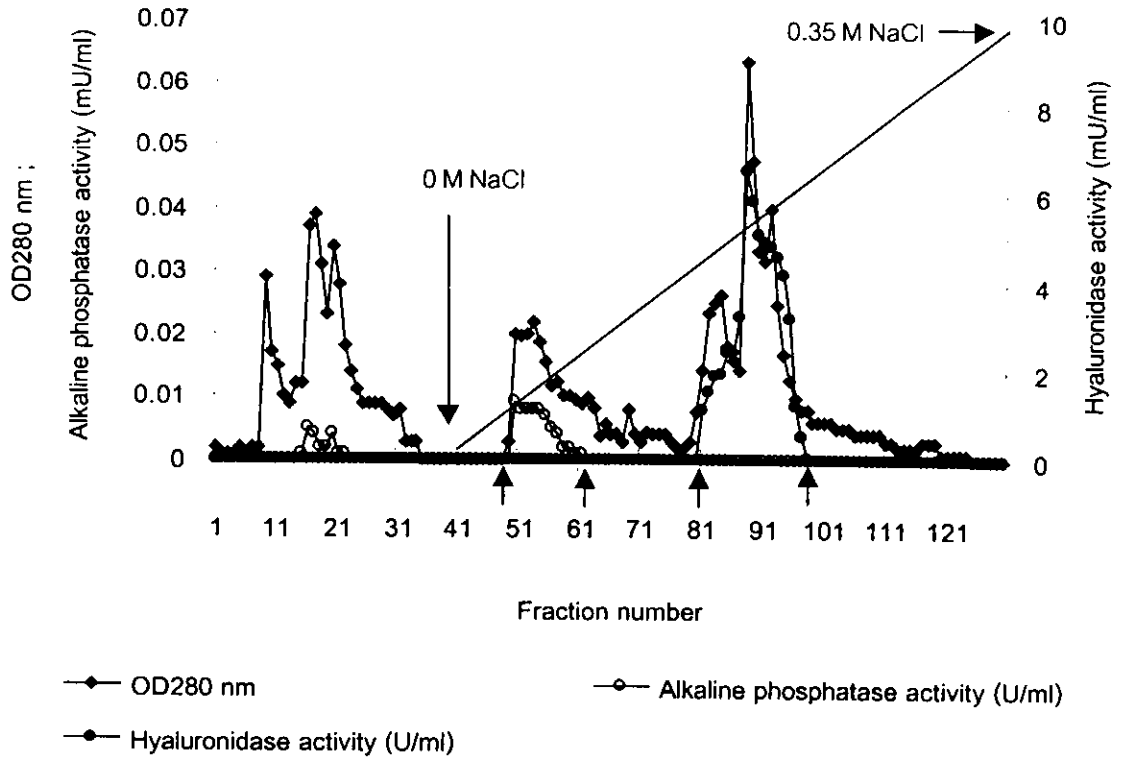


Figure 3. Anion exchange column chromatography on DEAE-Toyopearl 650M for alkaline phosphatase and hyaluronidase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

The sample applied on the column (1.4x20 cm) was washed with 50mM Tris-HCl, pH 7.0 and collected in 3.0 ml fractions at a flow rate of 3.0 ml/min. The bound protein was eluted with a linear gradient of 0 to 0.35 M NaCl in 50mM Tris-HCl, pH 7.0

ต่อมาเมื่อทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันแต่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ด้วย พบว่ามีโปรตีนซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ถูกชะออกมา ทั้งนี้เนื่องมาจากอิออนของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะในช่วงหลังนี้จะเข้าไปเกาะกับเรซินแทนที่เอนไซม์ที่เกาะอยู่กับเรซิน จึงทำให้เอนไซม์ถูกชะออกมา โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จะถูกชะออกมาในช่วงที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน (Deutscher, 1990)

เมื่อรวบรวมสารละลายเอนไซม์ที่ถูกชะออกมาในช่วงเวลาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เฉพาะหลอดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีอัลตราฟิวเตรชั่นผ่านเมมเบรน Vivacell 70 concentrator เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป โดยในแฟรคชั่นที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้สารละลายทั้งหมดปริมาตรเท่ากับ 72.50 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.0947 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.128 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนแฟรคชั่นที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสได้สารละลายมีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 57 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.118 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.0436 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ในสารละลายเอนไซม์สกัดเพื่อแสดงผลผลิตที่ได้ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ได้ พบว่าผลผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนอิออนมีค่าเท่ากับร้อยละ 20.16 และ 23.42 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 37.65 และ 38.25 เท่า ตามลำดับ (Table 8 and Table 9)

3.3 การทำโครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิวเตรชัน

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M ในแฟรคชั่นที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูง มารวมกัน แล้วนำสารละลายที่ได้ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยวิธีอัลตราฟิวเตรชั่นด้วย เมมเบรน Vivacell 70 concentrator เพื่อทำให้สารละลายที่ได้มีปริมาตรลดลงและมีปริมาณของโปรตีนเข้มข้นขึ้นเหมาะสมต่อการนำตัวอย่างไปผ่านคอลัมน์ชนิดเจลฟิวเตรชันต่อไป พบว่าปริมาตรของสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ได้หลังจากการผ่านอัลตราฟิวเตรชั่นด้วยเมมเบรน Vivacell 70 concentrator ลด

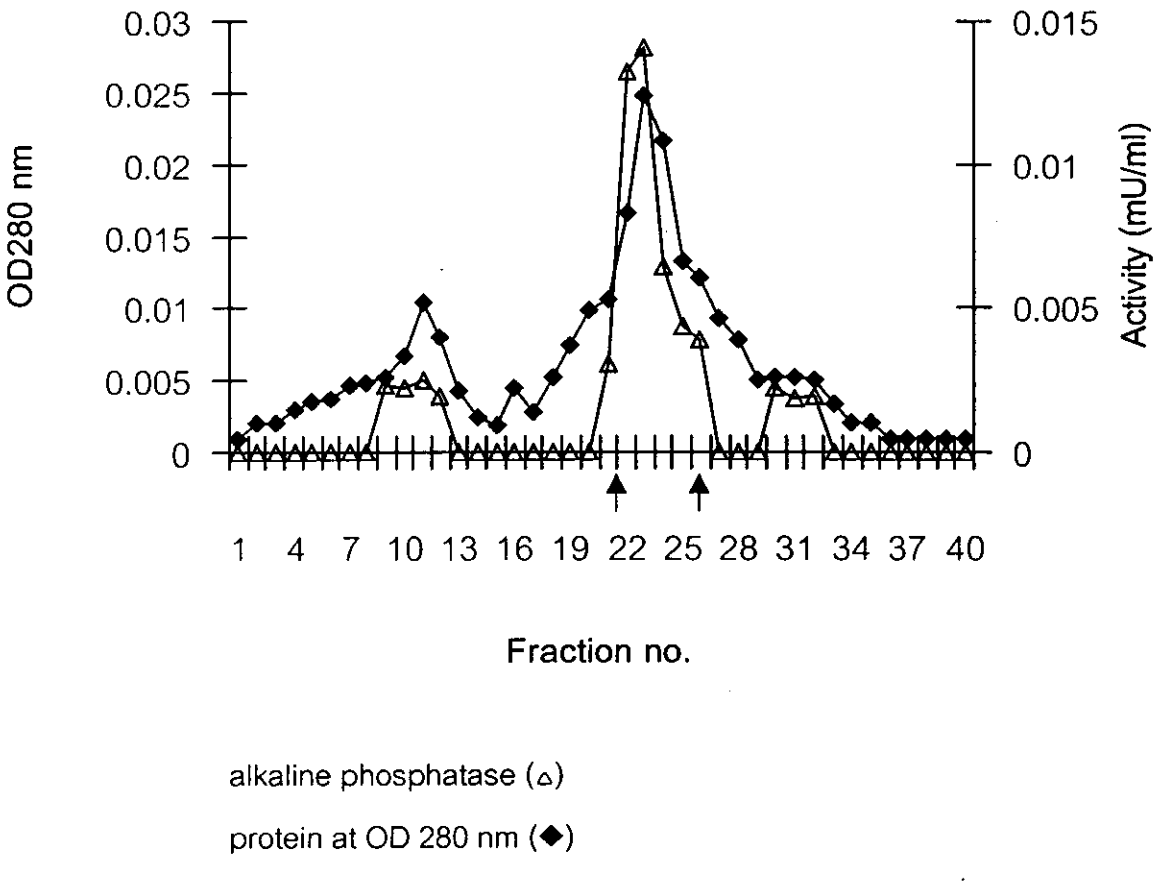


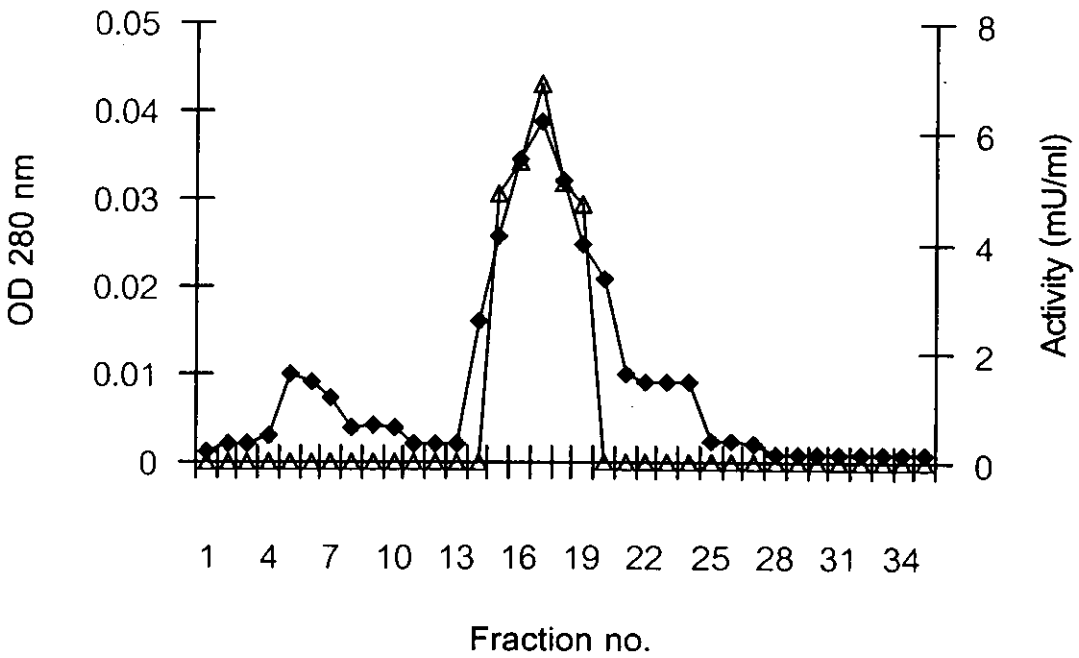
Figure 4. Gel filtration on Sephadex G-100 for alkaline phosphatase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). The sample applied on the column (1.4x25 cm) was eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 in 3.0 ml fractions at a flow rate of 0.3 ml/min.

ลงเหลือเพียง 19.25 มิลลิลิตร จาก 72.50 มิลลิลิตร และลดลงเหลือ 23.50 มิลลิลิตร จาก 57 มิลลิลิตร ตามลำดับ

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 (Figure 4) พบว่าโปรตีนที่แยกได้มีสามพีค โดยในทั้งสามพีคออกมาจากคอลัมน์ในช่วงแฟรคชั่นที่ 9-12, 21-26 และ 30-32 ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสทั้งสามพีคพบว่าในพีคที่สองมีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูงสุด ดังนั้นจึงนำเพียงพีคที่สองมาทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.015 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (yield) มีค่าเท่ากับ 5.61 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 176.47 เท่าเทียบกับสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น

ส่วนสารละลายเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเมื่อผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 (Figure 5) พบว่าโปรตีนที่แยกได้มีเพียงพีคเดียว โดยออกมาจากคอลัมน์ในช่วงแฟรคชั่นที่ 15-19 เมื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่ามีกิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเท่ากับ 6.87×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.159 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (yield) มีค่าเท่ากับ 9.34 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 136.12 เท่าเทียบกับสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น

จากการทดลองในครั้งนี้เพื่อแยกเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสให้บริสุทธิ์นั้นได้ใช้ขนิดของคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเตรชั่นและอัตราการไหลเหมือนกัน ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่แยกได้มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ต้องการแยก เนื่องจากพีคโปรตีนที่มี กิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ได้นี้ถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนพีคโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งสอดคล้องกับหลักการของโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตรชั่นที่แยกโปรตีนโดยอาศัยหลักการแยกตามขนาดของโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ก็ควรถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ก่อนโปรตีนที่มีขนาดของโมเลกุลเล็กกว่า (Deutscher, 1990)



hyaluronidase (△)

protein at OD 280 nm (◆)

Figure 5. Gel filtration on Sephadex G-100 for hyaluronidase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). The sample applied on the column (1.4x25 cm) was eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 in 3.0 ml fractions at a flow rate of 0.3 ml/min.

3.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของเอนไซม์ที่เตรียมได้โดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซีส

3.4.1 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์จากขั้นตอนต่างๆ มาศึกษาแบบแผนและความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยใช้อิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ Native-PAGE ผลการทดลองปรากฏแบบแผนของโปรตีนโดยเรียงลำดับจากซ้ายไปขวา (Figure 6) โดยในแถวที่ 1 แถบโปรตีนในเอนไซม์สกัดประกอบด้วยโปรตีนชนิดต่างๆ หลายชนิดซึ่งมีมวลโมเลกุลแตกต่างกัน แถบโปรตีนในแถวที่ 3 เป็นแถบโปรตีนที่ผ่านการไดอะไลซิสซึ่งแถบโปรตีนที่ได้จะมีลักษณะคล้ายกับแถวที่ 1 หลังจากนำเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ได้จากขั้นตอนไดอะไลซิสผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M และผ่านการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอุลตราฟิวเตรชั่นแล้ว พบว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏในแถวที่ 2 และ 4 (แถวที่ 2 เป็นสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และแถวที่ 4 เป็นสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส) มีเฉพาะแถบโปรตีนช่วงกลางๆ โดยแถบโปรตีนส่วนปลายด้านบนและส่วนปลายด้านล่างจะถูกกำจัดออกไป ต่อมาเมื่อนำสารละลายเอนไซม์ทั้งสองชนิดมาผ่านคอลัมน์เจลฟิวเตรชั่นชนิด Sephadex G-100 พบว่ามีเอนไซม์แต่ละชนิดมีแถบโปรตีนเหลืออยู่เพียงแถบเดียวดังแถวที่ 6 (เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส) และแถวที่ 7, 8 (เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส)

3.4.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซีสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากแต่ละขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์มาศึกษาแบบแผนของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าปรากฏแถบโปรตีนโดยเรียงลำดับจากซ้ายไปขวา (Figure 7) แถบโปรตีนแถวที่ 1 เป็นแถบโปรตีนของสารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด Low molecular weight แถวที่ 2 เป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์สกัดจะประกอบด้วยโปรตีนชนิดต่างๆ หลายชนิด ซึ่งมีมวลโมเลกุลแตกต่างกัน ส่วนแถบโปรตีนในแถวที่ 3 เป็นแถบโปรตีนที่ได้หลังจากการผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M ของแฟรคชั่นที่มีกิจกรรมของ

เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสและทำให้มีความเข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชั่น พบว่าแถบโปรตีนที่ชัดเจนมีจำนวน 3-4 แถบบริเวณช่วงกลางของแถวที่ 3 ส่วนแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่า 66.2 กิโลดาลตัน หรือต่ำกว่า 21.5 กิโลดาลตัน มองเห็นเป็นแถบจางไม่ชัดเจน สำหรับแถวที่ 4 เมื่อนำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์เจลฟิวเตรชันชนิด Sephadex G-100 พบว่ามีแถบโปรตีนช่วงค่อนไปด้านบนจำนวน 1 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของมวลโมเลกุลของโปรตีน (Log MW) กับระยะทางการเคลื่อนที่ (R_f) (Figure 8) พบว่าแถบโปรตีนแถบที่ได้มีมวลโมเลกุลประมาณ 45.71 กิโลดาลตัน ส่วนแถบโปรตีนในแถวที่ 5 เป็นแถบโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ได้หลังจากการผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M ของแฟรคชั่นที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและทำให้มีความเข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชั่น พบว่าพบแถบโปรตีนที่ชัดเจนมีจำนวน 3-4 แถบบริเวณช่วงกลางของแถวที่ 5 โดยแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่า 45 กิโลดาลตัน หรือต่ำกว่า 21.5 กิโลดาลตัน มองเห็นเป็นแถบจางไม่ชัดเจน สำหรับแถวที่ 6 เมื่อนำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์เจลฟิวเตรชันชนิด Sephadex G-100 พบว่ามีแถบโปรตีนช่วงกลางจำนวน 1 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของมวลโมเลกุลของโปรตีน (Log MW) กับระยะทางการเคลื่อนที่ (R_f) (Figure 8) พบว่าแถบโปรตีนแถบที่ได้มีมวลโมเลกุลประมาณ 31.62 กิโลดาลตัน อย่างไรก็ตามอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากตับอ่อนของกุ้ง northern shrimp (*Pandalus borealis*) มีมวลโมเลกุล 65 กิโลดาลตัน (Nielsen *et al.*, 2001) ในขณะที่ในตับอ่อนกุ้งกุลาดำก็มีการศึกษากัน พบว่า มีอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 3 ชนิด มีมวลโมเลกุล 31, 31 และ 43 กิโลดาลตัน (Olsen *et al.*, 1991) แต่การศึกษาจากตับอ่อนของกุ้ง *P. japonicus* พบว่ามีมวลโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน และเมื่อทำ deglycosilation แล้วพบว่ามีมวลโมเลกุล 33 กิโลดาลตัน (Chuang, 1990)

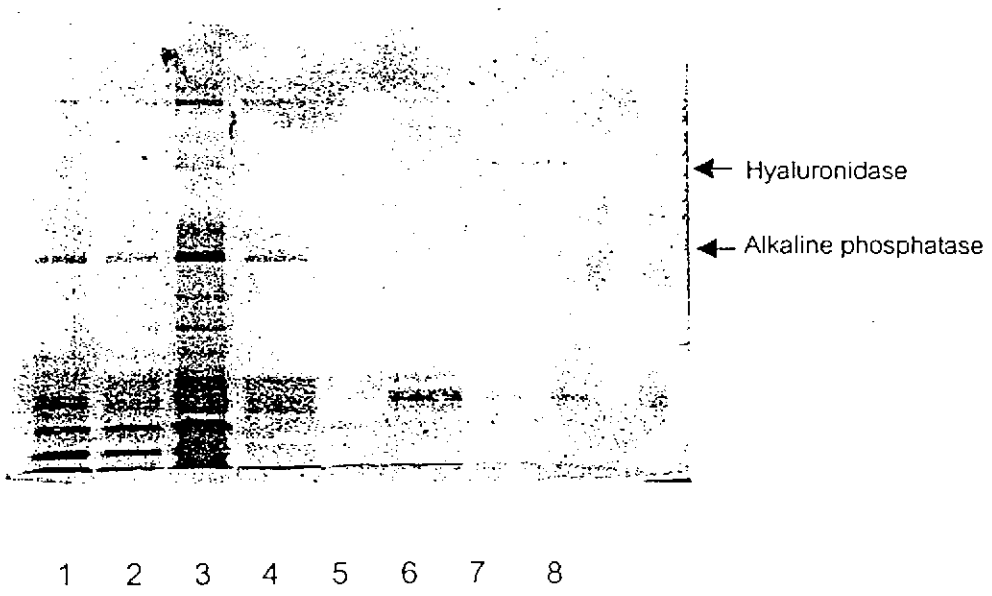


Figure 6. Native PAGE of protein fractions obtained during purification of alkaline phosphatase and hyaluronidase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp (*Peneaus monodon*).

[Lane 1, crude extract; Lane 2, DEAE-Toyopearl 650M (alkaline phosphatase); Lane 3, dialysis; Lane 4, DEAE-Toyopearl 650M (hyaluronidase); Lane 6, Sephadex G-100 (alkaline phosphatase); Lane 7, Sephadex G-100 (hyaluronidase); Lane 8, Sephadex G-100 (hyaluronidase)] Protein concentration 15-20 μg/ml.

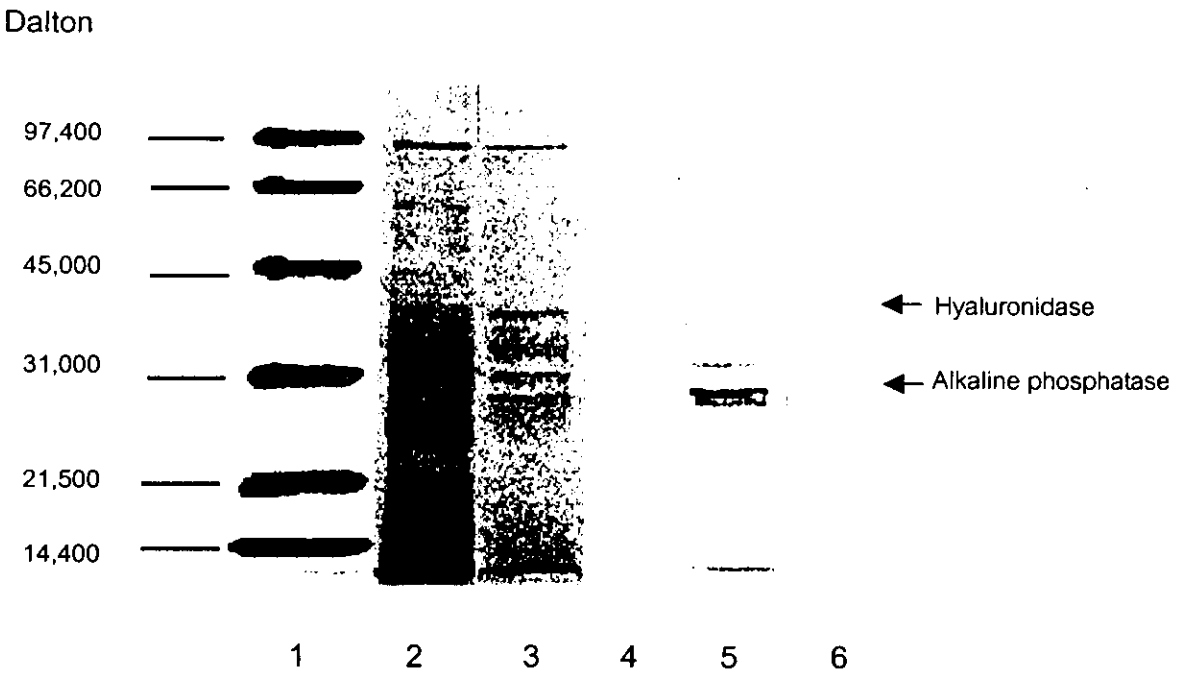


Figure 7. SDS-PAGE of protein fractions obtained during purification of alkaline phosphatase and hyaluronidase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

[Lane 1, protein standard; Lane 2, crude extract; Lane 3, DEAE-Toyopearl 650M (hyaluronidase); Lane 4, Sephadex G-100 (hyaluronidase); Lane 5, DEAE-Toyopearl 650M (alkaline phosphatase); Lane 6, Sephadex G-100 (alkaline phosphatase)]. Protein concentration 15-20 μg/ml.

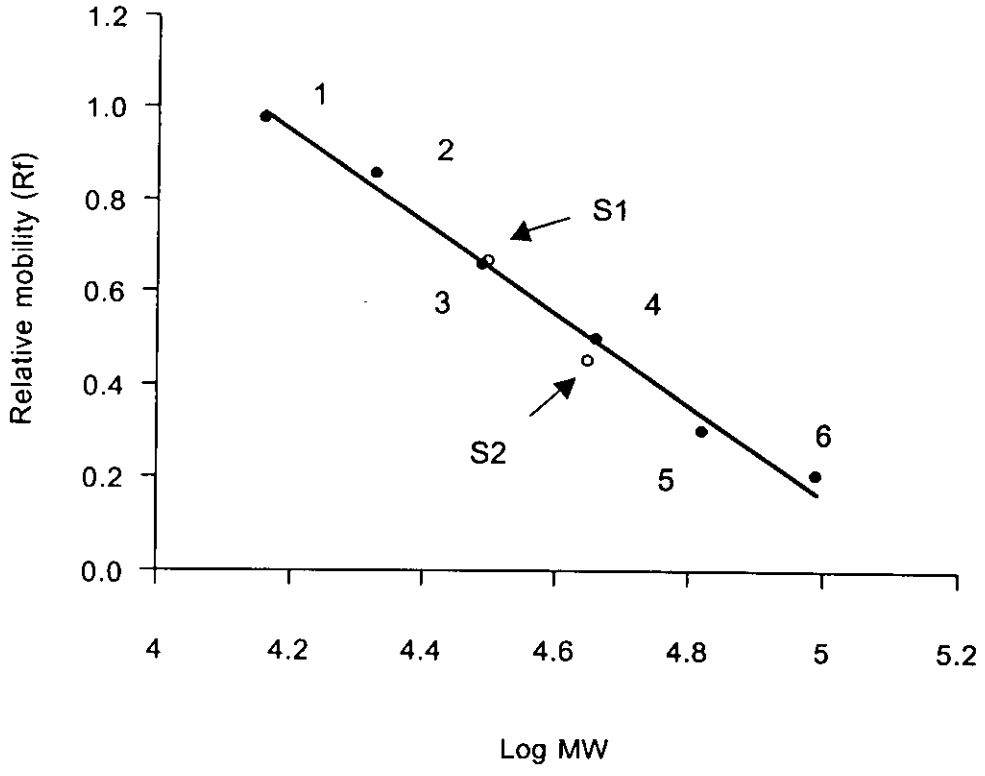


Figure 8. Calibration curve for the molecular weight determination of the purified enzymes on SDS-PAGE.

S1, alkaline phosphatase; S2, hyaluronidase; 1, lysozyme, MW 14,400 dalton; 2, soybean trypsin inhibitor, MW 21,500 dalton; 3, carbonic anhydrase, MW 31,000 dalton; 4, ovalbumin, MW 45,000 dalton; 5, bovine serum albumin ovalbumin, MW 66,200; 6, phosphorylase b, MW 97,400 dalton.

4. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

4.1 พีเอชที่เหมาะสม

นำสารละลายเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสในช่วงพีเอชตั้งแต่ 3.0-11.0 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส คือ พีเอช 9.0 (คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์) (Figure 9) ซึ่งอยู่ในช่วงพีเอชค่อนไปทางเป็นด่าง ส่วนที่พีเอชต่ำที่เป็นกรด (ช่วงพีเอช 3.0-6.0) หรือที่พีเอชสูงมากๆ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากในสารละลายที่มีความเป็นกรดหรือเป็นด่างมากจนเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ง่าย ค่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของกุ้งกุลาดำที่ได้คือพีเอช 9 เช่นเดียวกับผลการศึกษาโดย Chuang และ Yang (1990) และมีค่าใกล้เคียงกันกับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจาก cephalothorax ของกุ้ง bighead (*Solenocera melantho*) โดยมีพีเอชที่เหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์ APase-I และ Apase-II เท่ากับ พีเอช 10 และ 8 ตามลำดับ (Shaw and Chen, 1994)

ส่วนพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสคือพีเอช 4.0 (Figure 10) เมื่อค่าพีเอชสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ค่อยๆลดลงและกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีค่าเป็นศูนย์ที่พีเอชมากกว่า 9 จากผลการทดลองนี้พบว่าเป็นค่าพีเอชที่ใกล้เคียงกับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่สกัดได้จาก bull sperm ซึ่งมีค่าเท่ากับพีเอช 3.8 (Yang and Srivastava, 1975) และจากเนื้องอก (tumor) ซึ่งมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วงพีเอช 3.7-4.0 (Menzel and Farr, 1998) อย่างไรก็ตามพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่สกัดจากตับอ่อนกุ้ง Norway lobster(*Nephrops norvegicus*: scampi) ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วคือ พีเอช 5.4 (Krishnapillai *et al.*, 1999b)

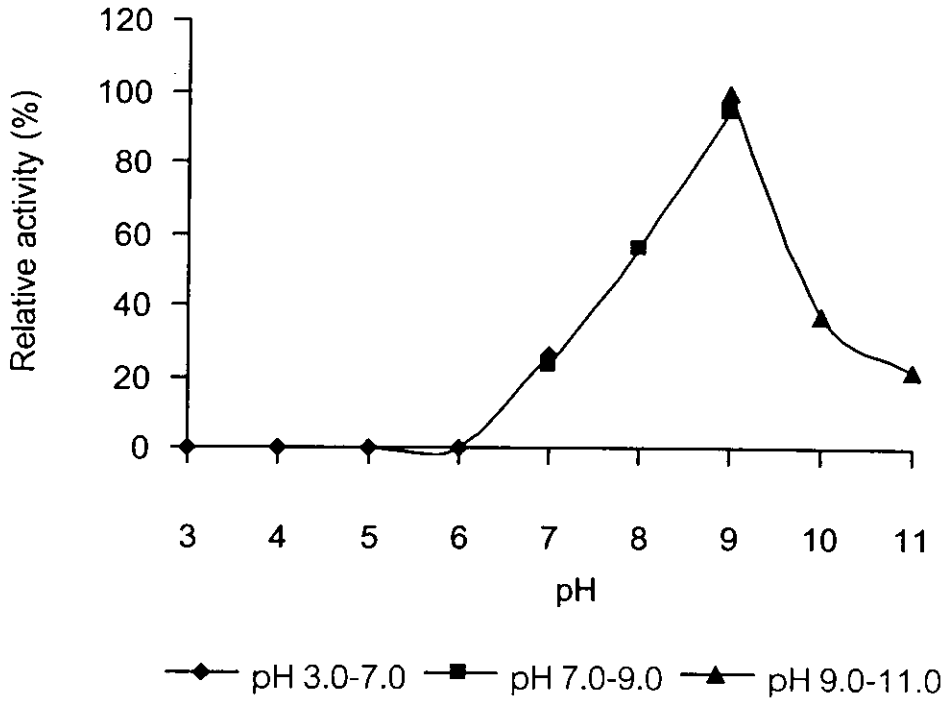


Figure 9. Effect of pH on the alkaline phosphatase activity from hepatopancreas of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

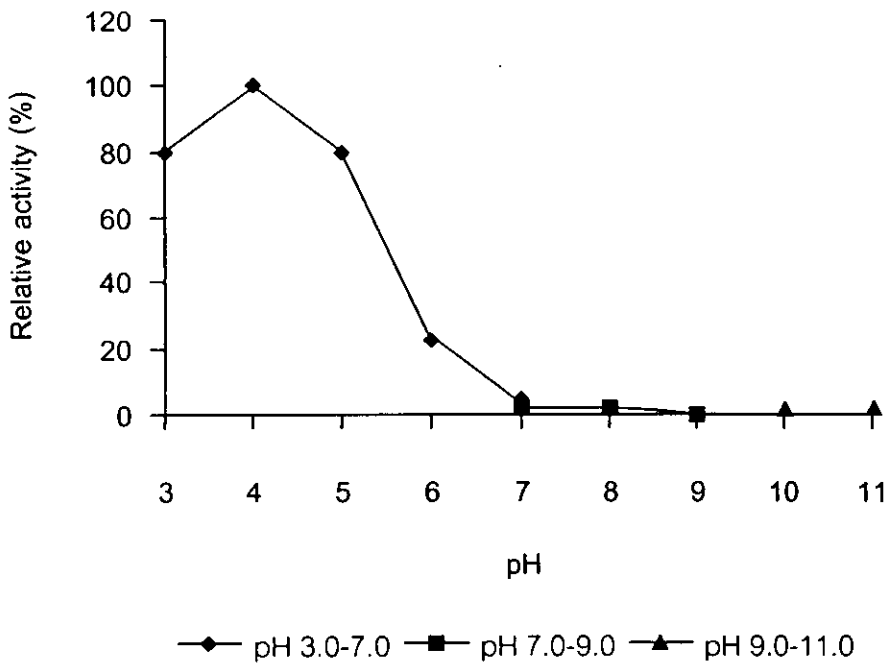


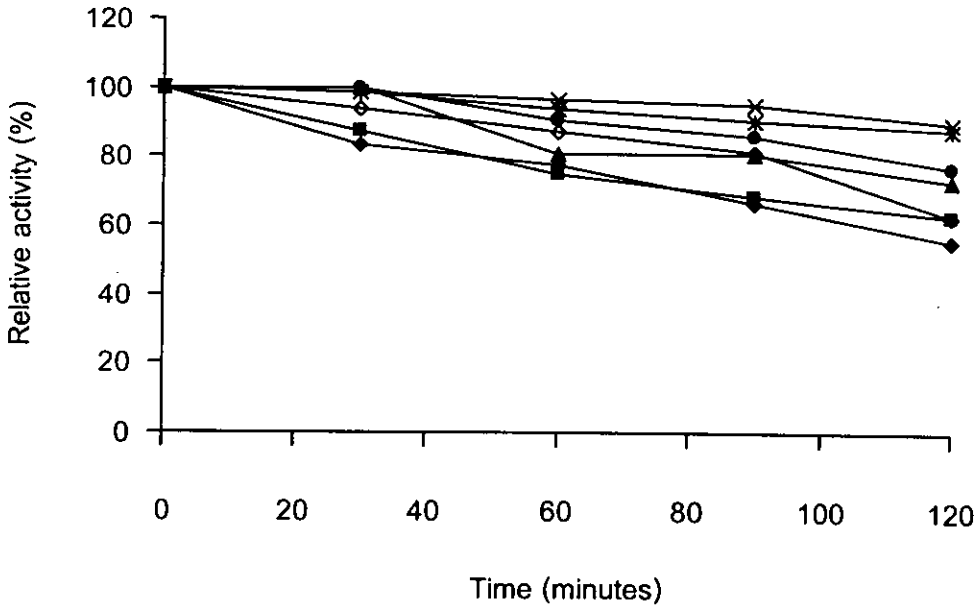
Figure 10. Effect of pH on the hyaluronidase activity from hepatopancreas of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ในสภาวะที่มีค่าพีเอชสูงหรือต่ำกว่าก็จะส่งผลกระทบต่อสภาวะหรือความคงตัวของเอนไซม์ชนิดนั้น เนื่องมาจากพีเอชของสารละลายจะมีผลต่ออิออนของกลุ่มพรอสเตติก (prosthetic groups) ของเอนไซม์ ส่งผลให้ความคงตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่ม active site การจับกันของเอนไซม์กับสับสเตรตและการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรตไปเป็นผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป (Laidler and Bunting, 1973 ; Garcia *et al.*, 2000)

4.2 ความคงตัวต่อพีเอช

การทดสอบความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงพีเอช 8-9 โดยเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่มากกว่า 70% หลังจากทำการบ่มเป็นเวลานาน 120 นาที (Figure 11) ผลการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสามารถทนต่อการสูญเสียสภาพได้ดีในสภาวะที่พีเอชเป็นกลางค่อนข้างเป็นด่าง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วจากส่วนของ cephalothorax จากกุ้ง bighead (*Solenocera melantho*) ซึ่งมีค่าความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์ APase-I ในช่วงพีเอช 8.0-12.5 (Shaw and Chen, 1994)

สำหรับเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วง พีเอช 3-5 (Figure 12) และมีความคงตัวลดลงเมื่อพีเอชมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อค่าพีเอชเพิ่มเท่ากับ 8 และทำการบ่มนาน 60 นาที พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างสมบูรณ์ แสดงว่าเอนไซม์ที่ได้ไม่มีความคงตัวในสภาวะที่พีเอชเป็นด่าง เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ทำบริสุทธิ์ได้จาก bull sperm พบว่าให้ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้คือ กิจกรรมของเอนไซม์จะเหลือน้อยกว่าร้อยละ 10 ของกิจกรรมเริ่มต้นเมื่อได้ทำการบ่มเอนไซม์ที่พีเอชสูงกว่า พีเอช 8 (Yang and Srivastava, 1975)

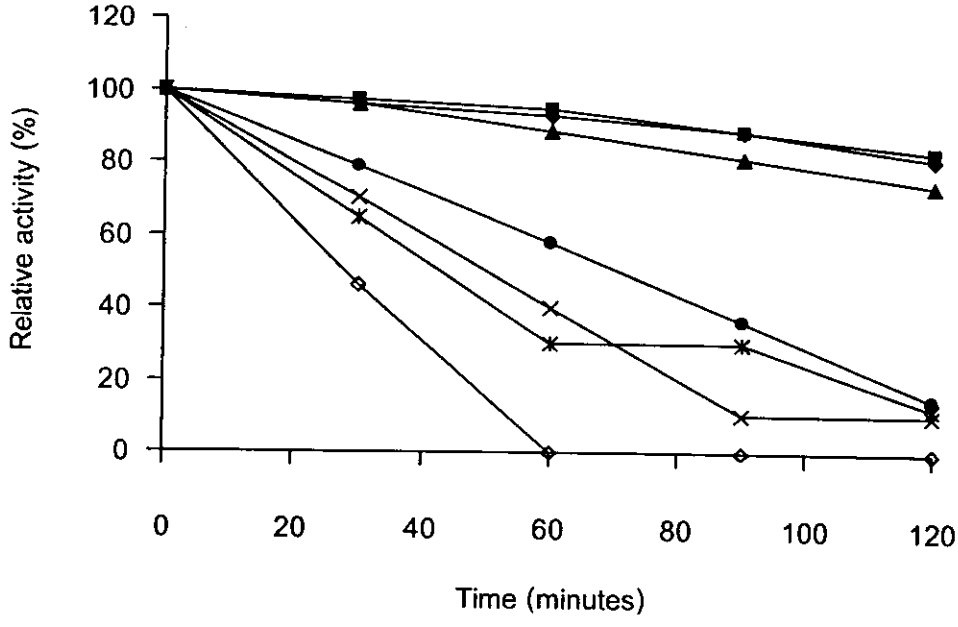


pH 7.0 (♦) in 0.05M citrate-phosphate buffer

pH 7.0 (■), 8.0 (▲) and 9.0 (X) in 0.05 M Tris-HCl buffer

pH 9.0 (∗), 10.0 (●) and 11.0 (◊) in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer

Figure 11. pH stability of alkaline phosphatase from hepatopancreas of black tiger shrimp(*Penaeus monodon*).



pH (3.0 (♦), 4.0 (■), 5.0 (▲), 6.0 (x) and 7.0 (✳) in 0.05M citrate-phosphate buffer; pH 7.0 (●), 8.0 (◊) in 0.05 M Tris-HCl buffer.

Figure 12. pH stability of hyaluronidase from hepatopancreas of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

4.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มาทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการทดสอบในช่วงอุณหภูมิ 30-90 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส คืออุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 9.0 โดยพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นทำให้ความเร็วช่วงแรก (initial velocity) หรือกิจกรรมการย่อยสลาย (catalytic activity) ของเอนไซม์สูงขึ้นด้วย (Figure 13) และมีค่าสูงสุดเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว สาเหตุที่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงก็เนื่องมาจากโครงสร้างของเอนไซม์ในส่วนของหมู่พรอสเตติก (prosthetic groups) ถูกทำลายและเสียสภาพการทำงานไป (Garcia *et al.*, 2000) จากผลการทดลองนี้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส APase-I และ Apase-II จากกุ้ง bighead (*Solenocera melantho*) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส (Shaw and Chen, 1994)

ส่วนเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส พบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส (Figure 14) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจนถึง 70 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะถูกยับยั้งการทำงานอย่างสมบูรณ์ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่สกัดจากตับอ่อนกุ้ง Norway lobster (*Nephrops norvegicus*: scampi) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในช่วง 37-40 องศาเซลเซียส (Krishnapillai *et al.*, 1999b)

จากผลการทดลองแสดงให้ทราบว่าเอนไซม์ชนิดเดียวกันจากแหล่งต่างกันอาจจะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลความแตกต่างกันของชนิดของเอนไซม์เองและปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เช่น แหล่งของวัตถุดิบที่นำมาสกัดเอนไซม์ ชนิดของสับสเตรต ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม และพีเอช เป็นต้น

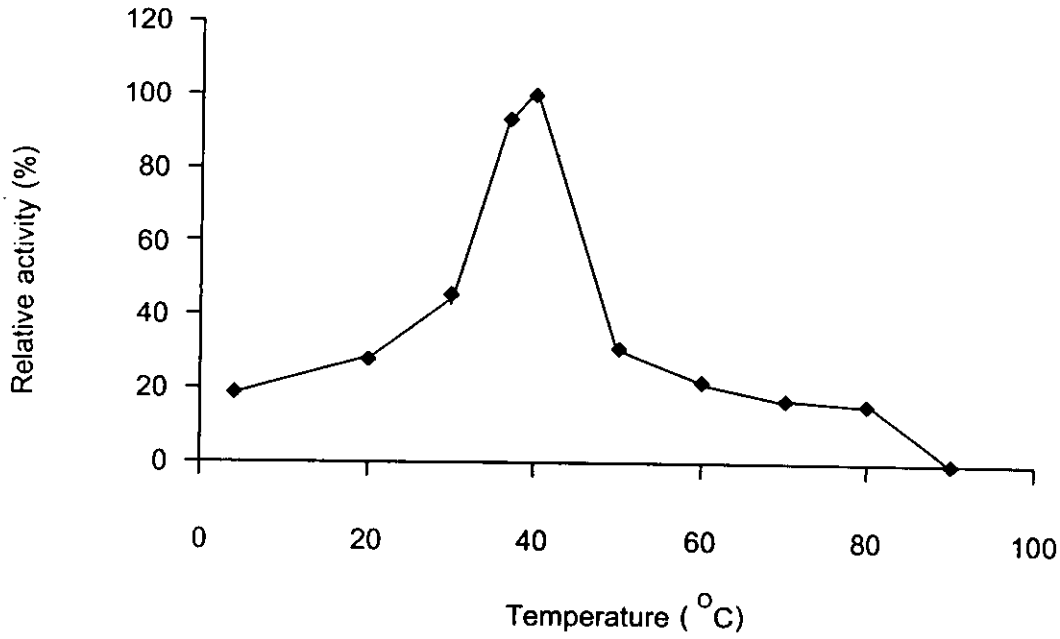


Figure 13. Effect of temperature on alkaline phosphatase activity from hepatopancreas of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) at pH 9.0.

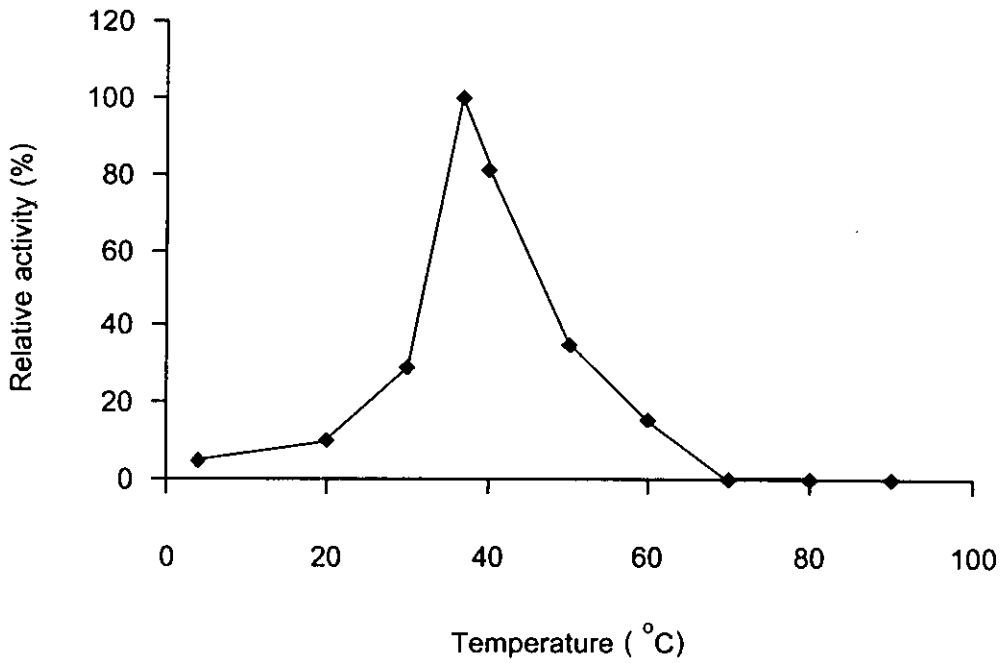
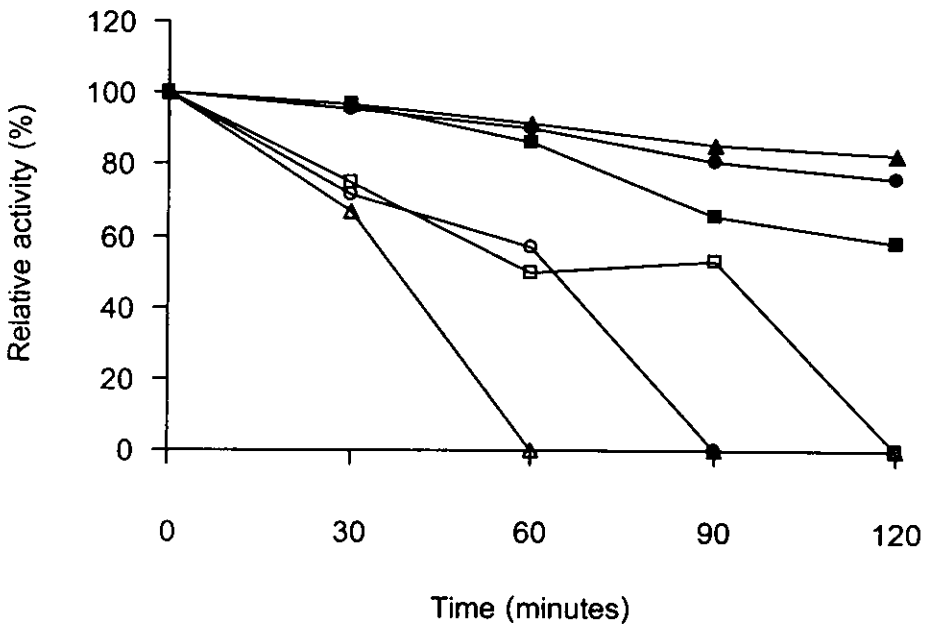


Figure 14. Effect of temperature on hyaluronidase activity from hepatopancreas of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) at pH 4.0.

4.4 **ความคงตัวต่ออุณหภูมิ**

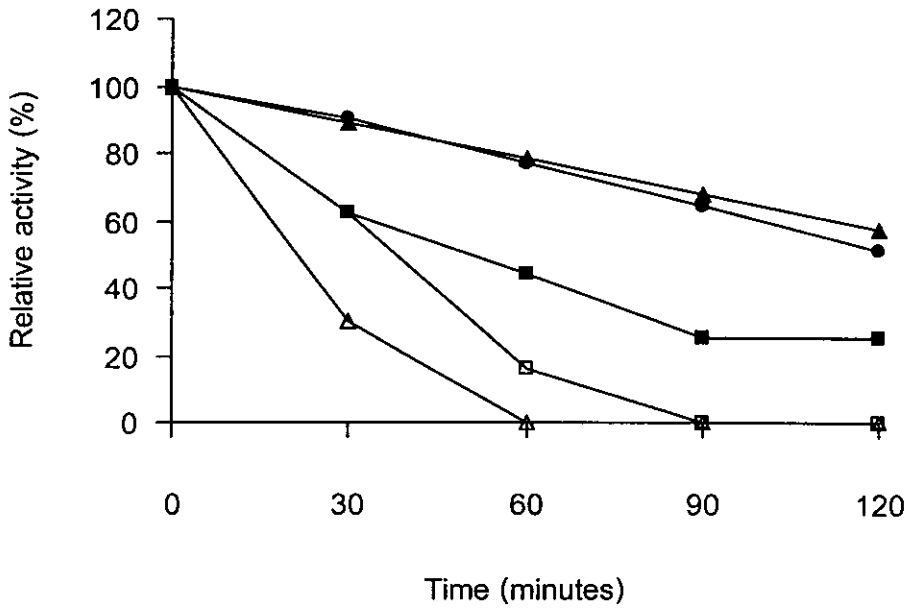
ทำการบ่มสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิต่างๆ แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (Figure 15) พบว่า เมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อย แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิที่บ่มเป็น 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่งของกิจกรรมเริ่มต้น เมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วและไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เลยเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ผลการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีความคงตัวดีที่ช่วงอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส Chuang และ Yang (1990) ก็พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที ก็ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ ในขณะที่เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากตับอ่อนของกุ้ง *Peneaus japonicus* สามารถทนความร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสได้ 5 นาที (Chuang and Shih, 1990)

สำหรับเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีความคงตัวของเอนไซม์อยู่ในช่วงอุณหภูมิเดียวกันกับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส คือ 37-40 องศาเซลเซียส (Figure 16) โดยเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อย ต่อมาเมื่อทำการบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลืออยู่เพียงร้อยละ 30 และตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อเพิ่มเวลาการบ่มสารละลายเอนไซม์ให้มากขึ้นถึง 90 และ 120 นาที



30°C (■), 37°C (▲), 40°C (●), 50°C (□), 60°C (△) and 70 (o)

Figure 15. Thermal stability of alkaline phosphatase from hepatopancreas of blacktiger shrimp *(Penaeus monodon)*.



30°C (■), 37°C (▲), 40°C (●), 50°C (□) and 60°C(△)

Figure 16. Thermal stability of hyaluronidase from hepatopancreas of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

4.5 ผลของอิออนโลหะและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ผลการทดสอบอิออนของโลหะและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (Table 10) พบว่า sodium azide (NaN_3) สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากที่สุด รองลงมาเป็น sodium dodecyl sulfate และ ethylenediaminetetra acetic acid ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากสารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารรีดิวซ์ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สารชีวภาพอื่นๆได้อย่างรุนแรง ดังนั้นเมื่อทำการเติมลงไปก็จะส่งผลต่อองค์ประกอบในโครงสร้างของเอนไซม์หรือสารชีวภาพทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เพียงเล็กน้อย ส่วน Cu^{2+} และ Hg^{2+} เป็นพวกอิออนของสารประกอบพวกโลหะซึ่งส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 23 และ 52 การเติมอิออน K^+, Na^+ และ Li^+ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ในขณะที่ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, NH_4^{2+} และสารประกอบอินทรีย์บางชนิดเช่น เอธานอล และเมทานอล นั้นกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ให้เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าพวกโมโนวาเลนต์ Shaw และ Chen (1994) พบว่า Na^+ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (APase-I และ Apase-II) ที่บริสุทธิ์แล้วให้เพิ่มขึ้นได้

ส่วนเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (Table 10) พบว่า sodium azide สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากที่สุด รองลงมาเป็น Hg^{2+}, sodium dodecyl sulfate และ ethylenediamenetetra acetic acid ตามลำดับ เอธานอล และเมทานอล ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในระดับปานกลาง (ร้อยละ 23) การเติมอิออน K^+, Na^+, Li^+, Ca^{2+} และ Mg^{2+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ให้เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Yang และคณะ (1994) ซึ่งได้กล่าวว่า K^+ และ Na^+ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่บริสุทธิ์แล้วให้เพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้ Poh และคณะ(1992) รายงานว่า Hg^{2+} และ heparin มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

Table 10. Effect of ions and chemicals on the activities of alkaline phosphatase and hyaluronidase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Ions and chemicals	Concentration	Residual activity (%)	
		Alkaline phosphatase	Hyaluronidase
Control	-	100	100
KCl	10 mM	103.45	125.14
NaCl	10 mM	104.83	127.68
LiCl	10 mM	103.45	130.93
$CaCl_2$	10 mM	131.72	105.65
$MgCl_2$	10 mM	136.55	113.98
$ZnSO_4$	10 mM	101.38	97.03
$CuSO_4$	10 mM	66.76	97.03
$HgCl_2$	10 µM	47.03	1.90
EDTA	10 mM	16.69	1.95
Ethanol	2%	101.38	74.72
Methanol	2%	103.45	77.54
SDS	0.5%	16.69	1.95
NaN_3	10 µM	15.17	1.76

SDS = Sodium dodecyl sulfate; EDTA = Ethylenediamenetetra acetic acid