โครงการวิจัยเรื่อง การสกัดและการแยกให้บริสุทธิ์เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และไฮยาลูโรนิเดสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล ฉวีวรรณ มลิวัลย์ และพูนสุข ประเสริฐสรรพ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

เฮพปาโตแพนเครียส หรือตับอ่อน (ต่อมสร้างน้ำย่อย) เป็นอวัยวะภายในซึ่งอยู่บริเวณหัวของกุ้งจัดเป็นวัสดุเศษเหลือประเภทของแข็งที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตกุ้งแช่แข็ง กุ้งกุลาดำเลี้ยง มีปริมาณตับอ่อนคิดเฉลี่ยเป็นร้อยละ 0.51 ของน้ำหนักตัว เมื่อนำตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงมาสกัดด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และ Tween 80 ร้อยละ 0.2 โดยใช้อัตราส่วนของตับอ่อนของกุ้งกุลาดำต่อสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปปั่นผสมที่ความเร็วระดับปานกลาง นาน 5 นาที แล้วสกัดต่อโดยการกวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (12,735x*g*) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้เอนไซม์สกัดจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำมา 2 ส่วนได้แก่ ส่วนสกัดสารละลาย และส่วนสกัดอิมัลชั่น เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดส จากเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วนดังกล่าว พบว่าส่วนสกัดสารละลายให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเท่ากับ 0.037 และ 0.0124 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 3.40×10^{-3} และ 1.14×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และส่วนสกัดอิมัลชั่นให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสเท่ากับ 0.022 และ 0.0166 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1.61×10^{-3} และ 1.21×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อนำเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากส่วนสกัดสารละลายของกุ้งกุลาดำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ร้อยละ 40-60 ตามด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟี 2 ชนิดคือ DEAE-Toyopearl 650M และ Sephadex G-100 พบว่าเอนไซม์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่แยกได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 176 และ 139 เท่าของเอนไซม์สกัดเริ่มต้น ตามลำดับ

เมื่อนำเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่แยกได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยพอลิอะคริลาไลด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE) พบแถบโปรตีน 1 แถบ ส่วนพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE) พบแถบโปรตีนเพียง 1 แถบเช่นเดียวกับวิธีพอลิอะคริลาไลด์เจลอิเล็ก-โทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ โดยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 31.62 และ 45.71 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน เท่ากับ 9 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความคงตัวสูงที่พีเอชและอุณหภูมิในช่วง 8.0-9.0 และ 37-40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที ส่วนเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 4.0 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความคงตัวสูงที่พีเอชและอุณหภูมิในช่วง 3.0-5.0 และ 37-40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ถูกยับยั้งมากกว่าร้อยละ 80 โดย sodium azide, sodium dodecyl sulfate และ ethylenediaminetetra acetic acid ส่วน Cu^{2+} และ Hg^{2+} ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงร้อยละ 35 และ 53 ตามลำดับ การเติมอิออน K^{+}, Na^{+} และ Li^{+} เอทานอลและเมทานอลไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในขณะที่ Ca^{2+} และ Mg^{2+} นั้นกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ให้เพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 130

กรณีของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส พบว่า sodium azide, sodium dodecyl sulfate, ethylenediamenetetra acetic acid และ Hg^{2+} ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 98 ขณะที่เอธานอล และ เมทานอล ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ร้อยละ 23-25 และการเติมอิออน K^{+}, Na^{+}, Li^{+} และ Mg^{2+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ให้เพิ่มสูงขึ้นได้เล็กน้อย

Research Project: Extraction and Purification of Alkaline Phosphase and Hyaluronidase form Hypatopancreas of Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*)

Aran H-Kittikun, Chaweewan Maliwan and Poonsuk Prasertsan

Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University.

Abstract

Hepatopancreas (digestive gland), the part of shrimp head is solid waste from the frozen shrimp industry. The cultured black tiger shrimp had hepatopancreas 0.51% of body weight. One part of the hepatopancreas was extracted with three parts of 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 1M NaCl and 0.2% Tween 80 at 4° C for 1 hr. The extracts of enzyme from hepatopancreas were separated into two phases: solution and emulsion by centrifugation at 10,000 rpm (12,735 *g*), 4°C. The activities of alkaline phosphatase and hyaluronidase were compared. Alkaline phosphatase showed the highest activity in both phases. The activities of alkaline phosphatase and hyaluronidase in the lower solution had 0.037 and 0.0124 units/ml and the specific activities were 3.40×10^{-3} and 1.14×10^{-3} units/mg protein, respectively. In the upper emulsion, the activities of alkaline phosphatase and hyaluronidase were 0.022 and 0.0166 units/ml whereas the specific activities were 1.61×10^{-3} and 1.21×10^{-3} units/mg protein, respectively. The alkaline phosphatase and hyaluronidase from the solution were precipitated and purified by ammonium sulfate precipitation (40-60%), ion-exchange chromatography (DEAE-Toyopearl 650M) and gel filtration chromatography (Sephadex G-100), respectively. The purity of the purified alkaline phosphatase and hyaluronidase increased to 176 and 139 folds, respectively.

The purified alkaline phosphatase and hyaluronidase showed single band in polyacrylamide gel electrophoresis under nondenaturing conditions and denaturing

condition. The molecular weights of alkaline phosphatase and hyaluronidase were 31.62 and 45.71 kDa, respectively.

The characterization of purified alkaline phosphatase showed the maximal activity at pH 9.0 and temperature 40°C. The purified alkaline phosphatase was stable in the pH and temperature ranges of 8.0-9.0 and 37-40°C, respectively. When incubated at 50°C for 60 minutes, the activity of the enzyme was reduced by half. The purified hyaluronidase had maximal activity at pH 4.0 and temperature 37°C. The purified hyaluronidase was stable in the pH and temperature ranges of 3.0-5.0 and 37-40 °C, respectively.

The purified alkaline phosphatase was strongly inhibited by sodium azide, sodium dodecyl sulfate and ethylenediaminetetraacetic acid. The inhibition was also strongly affected by Cu^{2+} and Hg^{2+}. K^{+}, Na^{+} and Li^{+} were slightly activated enzyme activity. However, Ca^{2+} and Mg^{2+} increased enzyme activity to 130%.

The purified hyaluronidase was strongly inhibited by sodium azide, sodium dodecyl sulfate, ethylenediaminetetraacetic acid and Hg^{2+}. Ethanol and methanol slightly decreased the enzyme activity whereas K^{+}, Na^{+}, Li^{+} and Mg^{2+} slightly activated the enzyme activity.