บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์จากตับอ่อนของกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง

1.1 การสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ

จากการสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง มาคำนวณขนาดเฉลี่ยของตัวกุ้งต่อกิโลกรัม ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ พบว่ากุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยงมีขนาดเฉลี่ย 16 และ 34 ตัวต่อกิโลกรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นนำส่วนของตับอ่อนของกุ้งมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาสัดส่วนของตับอ่อนของกุ้งกุลาดำต่อน้ำหนักตัวกุ้ง พบว่ากุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยงมีสัดส่วนของตับอ่อนต่อตัวกุ้งที่ใกล้เคียงกันโดยมีค่าเท่ากับ 1.17 และ 1.02 กรัมต่อตัวกุ้ง ตามลำดับ ซึ่งจากตัวอย่างกุ้งกุลาดำทะเลที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่ทราบอายุที่แน่นอนของกุ้ง เนื่องมาจากเป็นกุ้งกุลาดำที่จับได้จากแหล่งธรรมชาติ แต่สำหรับกุ้งกุลาดำเลี้ยงจะทราบอายุเนื่องมาจากได้จากการเพาะเลี้ยงในฟาร์ม โดยตัวอย่างกุ้งกลาดำเลี้ยงที่ได้ทำการทดลองนี้มีอายุประมาณ100-110 วัน แต่จากข้อมูลสัดส่วนของตับอ่อนของน้ำหนักตับอ่อนต่อตัวกุ้งที่ได้รายงานไว้ข้างต้น พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงให้ทราบว่าสัดส่วนของน้ำหนักตับอ่อนต่อตัวกุ้งจะคงที่ โดยจะไม่ขึ้นอยู่กับอยู่ขนาดหรืออายุของกุ้ง (Table 4)

Table 4 Comparison of an average hepatopancreas weight between seawater and cultured black tiger shrimp

Parameter	Seawater black tiger shrimp	Cultured black tiger shrimp
Size (shrimp/kg)	16±0.47	34±1.25
Hepatopancreas (g/kg)	18.7±0.22	34.5±8.17
Hepatopancreas (g/shrimp)	1.17	1.01

Data : Means ± S.D. (n=3)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ

เมื่อนำตับอ่อนกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิดมาทำการสกัดเอนไซม์พบว่าได้เอนไซม์สกัด 2 ส่วน คือ ส่วนสกัดสารละลาย (solution) และส่วนสกัดอิมัลชั่น (emulsion) โดยส่วนสกัดละลายจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง คิดเป็นร้อยละ 94.93 และ 95.29 ของปริมาตรเอนไซม์สกัดทั้งหมด ตามลำดับ และส่วนสกัดอิมัลชั่นคิดเป็นร้อยละ 5.11 และ 4.71 ของปริมาตรสารละลายทั้งหมด ตามลำดับ (Table 5)

Table 5 Properties of enzyme from hepatopancreas of seawater and cultured black tiger shrimp

Source of enzyme	Extracted volume (ml)	(%)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)
Solution				
- seawater shrimp	165	94.93	12.83	2,117.0
- cultured shrimp	164	95.29	12.89	2,114.0
Emulsion				
- seawater shrimp	8.88	5.11	16.51	146.6
- cultured shrimp	8.10	4.71	13.44	108.9

เมื่อนำเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วนจากกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิด มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน พบว่าส่วนสกัดสารละลายจากกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยงมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกัน มีค่าเท่ากับ 12.83 และ 12.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณโปรตีนจากส่วนสกัดอิมัลชั่น มีค่าเท่ากับ 16.51 และ 13.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 5)

ผลการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ จากเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วนจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิด (Table 6) พบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จำนวน 9 ชนิดได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส, ไลเปส, แอลฟา-อะมัยเลส, แคทาเลส, อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส, เปอร์ออกซิเดส, พอลิฟีนอลออกซิเดส, ไคติเนส และไฮยาลูโรนิเดส ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์สกัดทั้งสองส่วนจากกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิดมีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสสูงสุดและมีค่ากิจกรรม

ของเอนไซม์ใกล้เคียงกันโดยส่วนสกัดสารละลายของกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยงมีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสเท่ากับ 4,904.71 และ 4,956.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (16,185.54 และ 16,256.70 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมน้ำหนักเปียก ตามลำดับ) คิดเป็นกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 382.28 และ 384.49 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนสกัดอิมัลชั่นของกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยงมีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส เท่ากับ 6,292.43 และ 5,276.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (1,117.53 และ 497.05 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมน้ำหนักเปียก) คิดเป็นกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แคทาเลสเท่ากับ 381.13 และ 392.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Gamble และคณะ (1995) ซึ่งศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสจากต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) ของสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด ได้แก่ *Mytilus edulis Pecten maximus Carcinus maenas* และ *Asterias rubens* พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 5,870 36,100 280 และ 20,000 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมน้ำหนักเปียก ตามลำดับ นอกจากนี้มีการศึกษากิจกรรมเอนไซม์แคทาเลสจากปลา saithe และ mackerel พบว่าปลาทั้ง 2 ชนิดนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงในส่วนของตับ โดยมีค่าเท่ากับ 6,135 และ 9,003 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมน้ำหนักเปียก ตามลำดับ (Aksnes and Njaa, 1981) ผลการศึกษาเอนไซม์แคทาเลสจากต่อมสร้างน้ำย่อยของ *Perna perna* พบว่ามีค่าแตกต่างกันไปในแต่ละเดือน เช่นเดือนพฤษภาคมและเดือนธันวาคม มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 28,500±2.7 และ 22,200±5.4 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมน้ำหนักเปียก และเดือนมีนาคมและกันยายน มีกิจกรรมเท่ากับ 810±1.7 และ 980±2.0 ไมโครโมลต่อนาทีต่อน้ำหนักเปียก ตามลำดับ จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่มีความแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากผลของฤดูกาลและการได้รับสารอาหารของสัตว์ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต (Filno *et al*., 2001) ขณะที่เอนไซม์ชนิดอื่นๆ พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลสมีและโปรติเอสมีปานกลาง แต่เมื่อทำการพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจากเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วน จากกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิด พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วนจากกุ้งกุลาดำเลี้ยงจะมีค่าสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วนจากกุ้งกุลาดำทะเล ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกุ้งกุลาดำเลี้ยงได้รับสารอาหารจำพวกโปรตีนจากอาหารที่ใช้เลี้ยงในปริมาณที่สูงกว่ากุ้งกุลาดำทะเลซึ่งอาศัยแหล่งโปรตีนจากอาหารในธรรมชาติ ดังนั้นจึงสามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสใน

ปริมาณที่สูงกว่า ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เปอร์ออกซิเดส พอลิฟีนอลออกซิเดส ไคติเนส และไฮยาลูโรนิเดสมีค่าน้อยมาก กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสของตัวอย่างกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิดจากเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วน มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสมีในปริมาณสูงเช่นเดียวกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของปริมาตรของเอนไซม์สกัดทั้ง 2 ส่วน พบว่าส่วนสกัดอิมัลชั่นมีปริมาตรน้อยกว่ามากเปรียบเทียบกับส่วนสกัดสารละลาย อีกทั้งตัวอย่างตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลมีไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นจึงเลือกส่วนสกัดสารละลายของกุ้งกุลาดำเลี้ยงมาทำบริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลสและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป

2. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ

2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำไดอะไลซิส

นำสารละลายเอนไซม์สกัดจากกุ้งกุลาดำเลี้ยงมาทำบริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลสโดยเริ่มจากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต จากการทดลองโดยค่อยๆ เพิ่มปริมาณของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้มีความอิ่มตัวร้อยละ 20-80 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสในตะกอนมีมากที่สุดเมื่อตกตะกอนจนมีความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ ร้อยละ 40 (Table 7) ดังนั้นจึงทำการนำสารละลายเอนไซม์สกัดใหม่มาทำการตกตะกอน โดยพบว่ามีกิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แคทาเลสจากกุ้งกุลาดำเลี้ยงเท่ากับ 11,235.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 1,128.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (Table 8)

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าได้ช่วงของการตกตะกอนที่เหมาะสมมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองของการตกตะกอนเอนไซม์แคทาเลสจากตับแพะ ซึ่งมีช่วงของการตกตะกอนที่เหมาะสมที่ระดับความความอิ่มตัวร้อยละ 55 (Miyahara *et al.*, 1978) และการทำบริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลสจากจมูกข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ก็พบว่ามีช่วงการตกตะกอนที่เหมาะสมที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 45 (Garcia *et al.*, 2000) นอกจากนี้ Yumoto และคณะ (1990) ได้รายงานว่าช่วงของการตกตะกอนเอนไซม์แคทาเลสจาก *Bacillus* YN-2000 ที่เหมาะสมมีค่าที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 50

Table 6 Activity of enzymes from hepatopancreas of seawater and cultured black tiger shrimp in solution and emulsion

Activity of enzyme	Crude enzyme			
	Solution		Emulsion	
	Seawater shrimp	Cultured shrimp	Seawater shrimp	Cultured shrimp
Protease				
(Units/ml)	10.82±0.92	20.01± 0.54	9.99±3.89	17.87±2.05
(Units/mg protein)	0.84±0.20	1.55±0.13	0.61±0.10	1.33±0.14
Lipase				
(Units/ml)	0.048±0.01	0.045±0.02	0.047±0.02	0.031±0.01
(Units/mg protein)	0.004±0.01	0.003±0.01	0.003±0.01	0.002±0.01
α-Amylase				
(Units/ml)	29.29±2.70	28.47±5.40	16.13±1.20	16.08±1.46
(Units/mg protein)	2.28±0.13	2.21± 0.19	0.98± 0.11	1.20±0.56
Catalase				
(Units/ml)	4,904.71±181.80	4,951.31±108.50	6,292.43±148.50	4,661.81±156.40
(Units/mg protein)	382.28±22.50	384.49±20.24	381.13±17.50	346.86±32.75
Peroxidase				
(Units/ml)	2.790± 0.35	2.535± 0.16	3.485± 0.25	2.660± 0.10
(Units/mg protein)	0.022± 0.04	0.197± 0.02	0.211± 0.01	0.198± 0.03
Polyphenol oxidase				
(Units/ml)	5.223± 0.58	5.063± 0.45	11.108± 1.40	12.242± 0.60
(Units/mg protein)	0.407± 0.04	0.393± 0.01	0.673± 0.08	0.911± 0.11
Alkaline phosphatase				
(Units/ml)	0.051± 0.01	0.073± 0.01	0.149± 0.03	0.083± 0.02
(Units/mg protein)	3.98×10^{-3}± 0.00	5.66×10^{-3}±0.00	9.02×10^{-3}± 0.00	6.18×10^{-3}±0.00
Chitinase				
(Units/ml)	0.021± 0.01	0.022± 0.01	0.032± 0.01	0.026± 0.01
(Units/mg protein)	1.64×10^{-3}±0.00	1.71×10^{-3}±0.00	1.94×10^{-3}±0.00	1.93×10^{-3}±0.00
Hyaluronidase				
(Units/ml)	0.0345±0.01	0.0420± 0.01	0.0396±0.01	0.044±0.01
(Units/mg protein)	2.69×10^{-3}±0.00	3.26×10^{-3}±0.00	2.40×10^{-3} ±0.00	3.27×10^{-3}±0.00

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

เมื่อตกตะกอนโปรตีนส่วนสกัดสารละลายจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว นำตะกอนที่ได้ละลายในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 จนตะกอนละลายหมดแล้วนำไปผ่านการกำจัดเกลือออกโดยวิธีการไดอะไลซิส เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แคทาเลสพบว่ามีค่าเท่ากับ 1,294.58 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Table 9) ในขั้นตอนนี้พบว่าเอนไซม์แคทาเลสที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นไม่มากนัก ซึ่งสังเกตจากค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นเพียงเล็กน้อยทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขั้นตอนการทำไดอะไลซิสอาจกำจัดเกลือออกไปไม่หมด ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ถูกรบกวนจากเกลือส่วนที่เหลืออยู่ทำให้ค่ากิจกรรมที่ได้สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อคิดเป็นผลผลิต (yield) พบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 18.91 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.87 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น (Table 9)

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

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Catalase	
			Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg protein)
Crude extract	90	10.67	5,893.91	552.38
0-20% sat. $(NH_4)_2SO_4$ precipitate	9.0	8.61	7,307.40	848.71
20-40% sat. $(NH_4)_2SO_4$ precipitate	9.0	9.14	10,098.35	1,104.85
40-60% sat. $(NH_4)_2SO_4$ precipitate	7.0	7.94	1,448.95	182.49
60-80% sat. $(NH_4)_2SO_4$ precipitate	4.5	2.17	884.32	160.24

Table 8 Ammonium sulfate precipitation at 40% salt saturation for catalase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Catalase	
			Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg protein)
Crude extract	146	9.27	6,420.66	692.63
40% sat.$(NH_4)_2SO_4$ precipitate	25.50	9.96	11,235.03	1,128.02
40% supernatant	90	5.06	590.68	116.74

Table 9 Summary of catalase purification steps

Purification steps	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Protein (mg)	Total activity (Units)	Specific activity (Units/ mg)	Yield (%)	Purity (fold)
Crude extract	146	9.27	1,353.42	937,416.36	692.63	100	1
40% sat. $(NH_4)_2SO_4$	25.50	9.96	253.98	286,493.27	1,128.02	30.56	1.63
Dialysis	38.25	3.58	136.94	177,279.19	1,294.58	18.91	1.87
DEAE-Toyopearl 650M	10.00	0.15	1.50	4,314.00	2,881.76	0.460	4.16
Sephadex G-100	11.50	0.016	0.18	2,832.22	15,392.50	0.302	22.22

2.2 การทำโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนอิออน (Ion-exchange chromatography)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลซิสแล้ว ปริมาตร 38.25 มิลลิลิตร มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เรซินแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M ผลการทดลอง (Figure 5) พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมาสองพีคติดกันในช่วงแรกที่ทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ อยู่ในช่วงแฟรคชั่นที่ 36-63 เมื่อนำมาตรวจวัดกิจกรรมของ

เอนไซม์แคทาเลส พบว่าไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสของโปรตีนทั้งสองพีคเลย ต่อมาเมื่อทำการชะโปรตีนที่ไม่จับกับเรซินในคอลัมน์ออกหมดแล้วซึ่งสังเกตจากโปรตีนที่ 280 นาโนเมตรมีค่าเข้าใกล้ศูนย์หรือเท่ากับศูนย์แล้ว จึงเริ่มชะโปรตีนที่จับกับเรซินในคอลัมน์ด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-0.35 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ภายหลังการชะพบว่ามีโปรตีนออกมาสี่พีค โดยสามพีคแรกที่ติดกันนั้นพบว่าไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสในพีคใดเลย แต่ในพีคที่สี่ซึ่งเป็นพีคที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรสูงกว่าสามพีคแรกนั้น พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส จากกราฟพบว่าอยู่ในช่วงของแฟรคชั่นที่ 76-89 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสองพีคที่ถูกชะออกมาก่อนในช่วงที่ทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ในช่วงแรกนั้นเป็นโปรตีนที่ไม่สามารถจับกับเรซินชนิด DEAE-Toyopearl 650M ซึ่งเป็นเรซินชนิดประจุบวกที่พีเอช 7.0 ได้ ต่อมาเมื่อทำการชะคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันแต่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ด้วย พบว่ามีโปรตีนซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสถูกชะออกมา ทั้งนี้เนื่องมาจากอิออนของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ชะในช่วงหลังนี้จะเข้าไปเกาะกับเรซินแทนที่เอนไซม์แคทาเลสที่เกาะอยู่กับเรซิน จึงทำให้เอนไซม์คาทาเลสถูกชะออกมา (Deutcher, 1990) จากผลการทดลองนี้แสดงว่าเรซินชนิดนี้มีความเหมาะสมในการทำเอนไซม์แคทาเลสให้บริสุทธิ์

เมื่อรวบรวมสารละลายเอนไซม์ที่ถูกชะออกมาในช่วงเวลาที่กล่าวมาแล้วข้างต้นเฉพาะหลอดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีอุลตราฟิวเตรชั่นผ่านเมมเบรน Vivacell 70 concentrator (ขนาด molecular weight cut off เท่ากับ 10,000 ดาลตัน) เพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป โดยได้สารละลายทั้งหมดปริมาตรเท่ากับ 10 มิลลิลิตร คิดเป็นปริมาณปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 2,881.76 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ในสารละลายเอนไซม์สกัดเพื่อแสดงผลผลิตที่ได้ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้ พบว่าผลผลิตเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนอิออนมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.46 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 4.16 เท่า (Table 9)

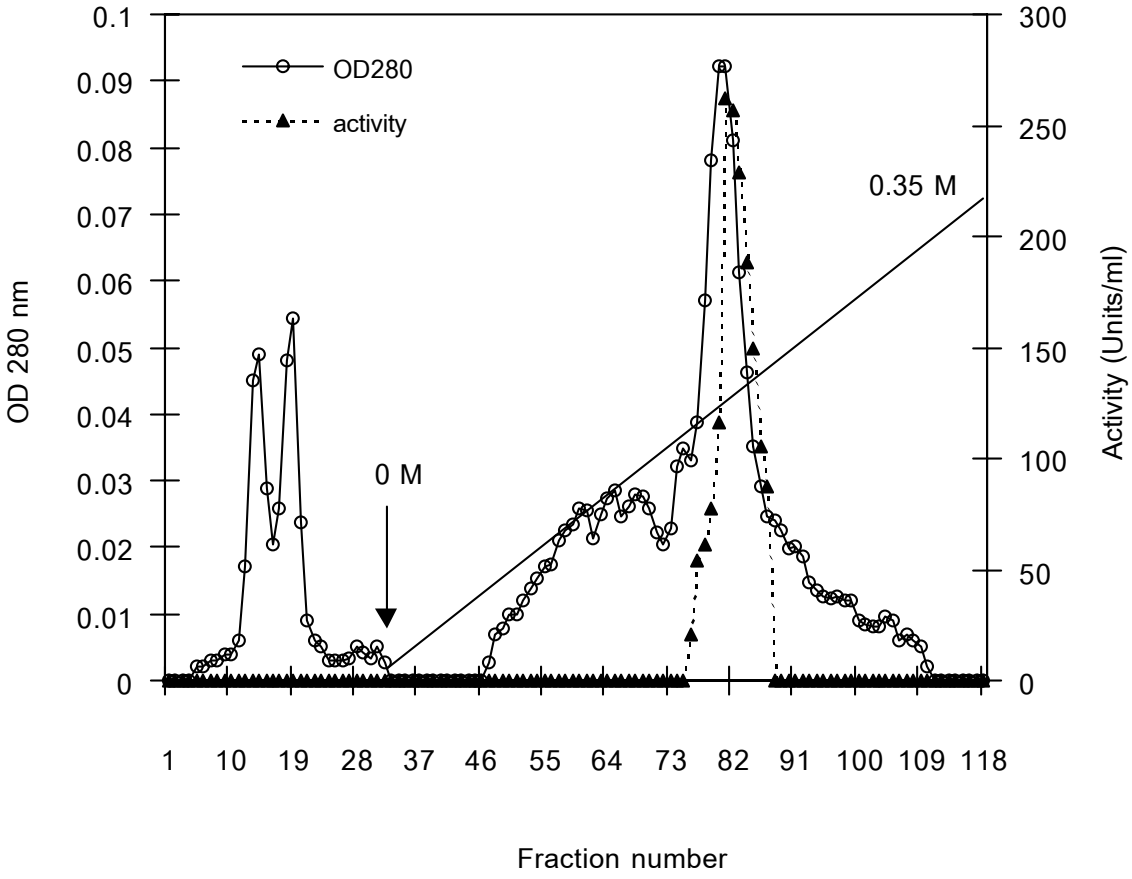


Figure 5 Anion exchange column chromatography on DEAE-Toyopearl 650M for catalase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and protein. The sample applied on the column (1.4x20 cm) was washed with 50mM Tris-HCl, pH 7.0 in 3.0 ml fractions at a flow rate of 0.3 ml/min. The bound protein was eluted with a linear gradient of 0 to 0.35 M NaCl in 50mM Tris-HCl, pH 7.0

2.3 การทำโครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิวเตรชัน (Gel filtration chromatography)

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M ในแฟรคชั่นที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงมารวมกันแล้วนำสารละลายที่ได้ทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้นโดยวิธีอุลตราฟิวเตรชั่นด้วยเมมเบรน Vivacell 70 concentrator เพื่อทำให้สารละลายที่ได้มีปริมาตรลดลงและมีปริมาณของโปรตีนเข้มข้นขึ้นเหมาะสมต่อการนำตัวอย่างไปผ่านคอลัมน์ชนิดเจลฟิวเตรชันต่อไป พบว่าปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่ได้หลังจากการผ่านอุลตราฟิวเตรชั่นด้วยเมมเบรน Vivacell 70 concentrator ลดลงเหลือเพียง 11.50 มิลลิลิตร จาก 55.0 มิลลิลิตร นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 (Figure 6) พบว่าโปรตีนที่แยกได้มีเพียงพีคเดียว โดยออกมาจากคอลัมน์ในช่วงแฟรคชั่นที่ 9-14 เมื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 246.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 15,392.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของผลผลิต (yield) มีค่าเท่ากับ 0.30 และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 22.22 เท่าเทียบกับสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น (Table 9) จากผลการทดลองเป็นไปได้ว่าเอนไซม์แคทาเลสที่ได้มีโมเลกุลขนาดใหญ่เนื่องจากพีคโปรตีนที่ได้นี้ถูกชะออกจากคอลัมน์ในช่วงแรก ซึ่งสอดคล้องกับหลักการของโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตรชันที่แยกโปรตีนโดยอาศัยหลักการแยกตามขนาดของโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ก็ควรถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ก่อนโปรตีนที่มีขนาดของโมเลกุลเล็กกว่า (Deutscher, 1990)

2.4 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่แยกได้โดยวิธีโครมาโทกราฟีชนิดเจลฟิว-เตรชัน (Gel filtration chromatography)

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่แยกได้ โดยวิธีเจลฟิวเตรชันด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 เมื่อนำผลการทดลองมาเทียบกับกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานทั้ง 4 ชนิด กับค่าสัมประสิทธิ์การกระจาย (K_{av}) พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66.6 กิโลดาลตัน (Figure 7) ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับผลรวมค่าน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีน 2 แถบ ที่แยกได้จากวิธี SDS-PAGE (ขนาด 32.7 และ 36.0 กิโลดาลตัน) รวมเป็น 68.7 กิโลดาลตัน ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้นี้สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์แคทาเลสที่แยกได้จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ขนาด 36

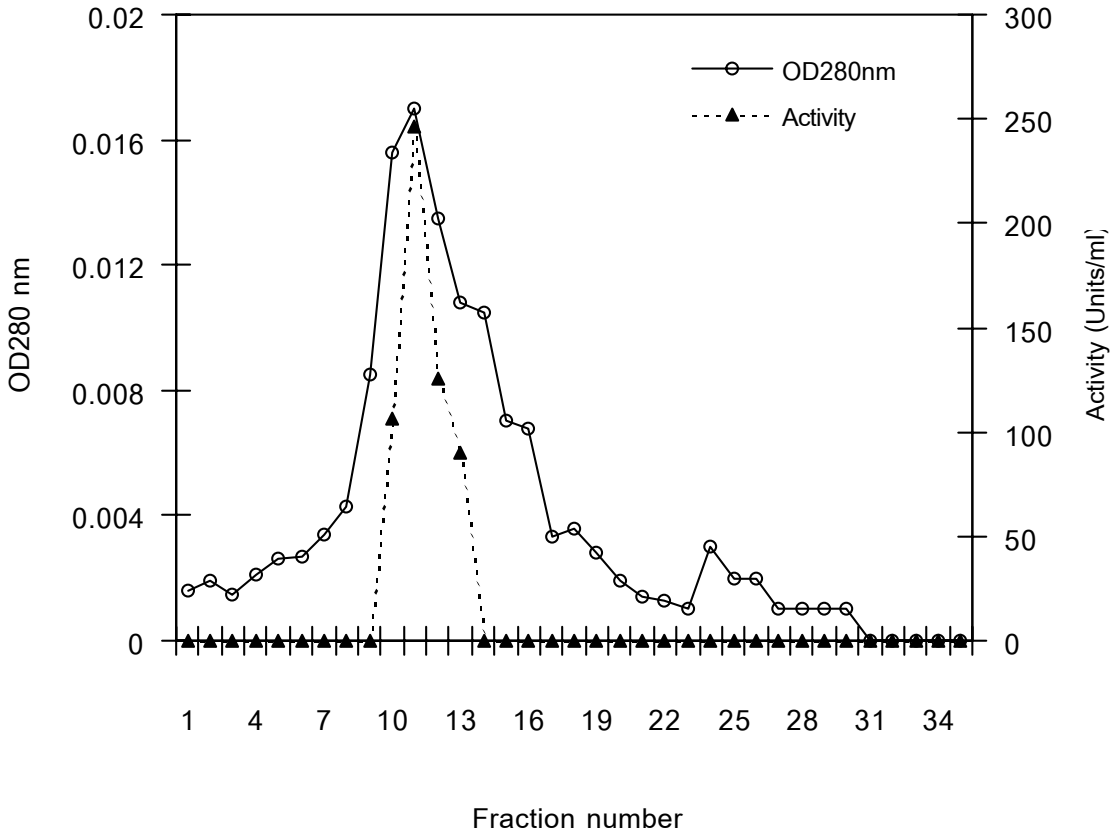


Figure 6 Gel filtration on Sephadex G-100 for catalase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and protein. The sample applied on the column (1.4x25 cm) was eluted with 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 in 3.0 ml fractions at a flow rate of 0.3 ml/min.

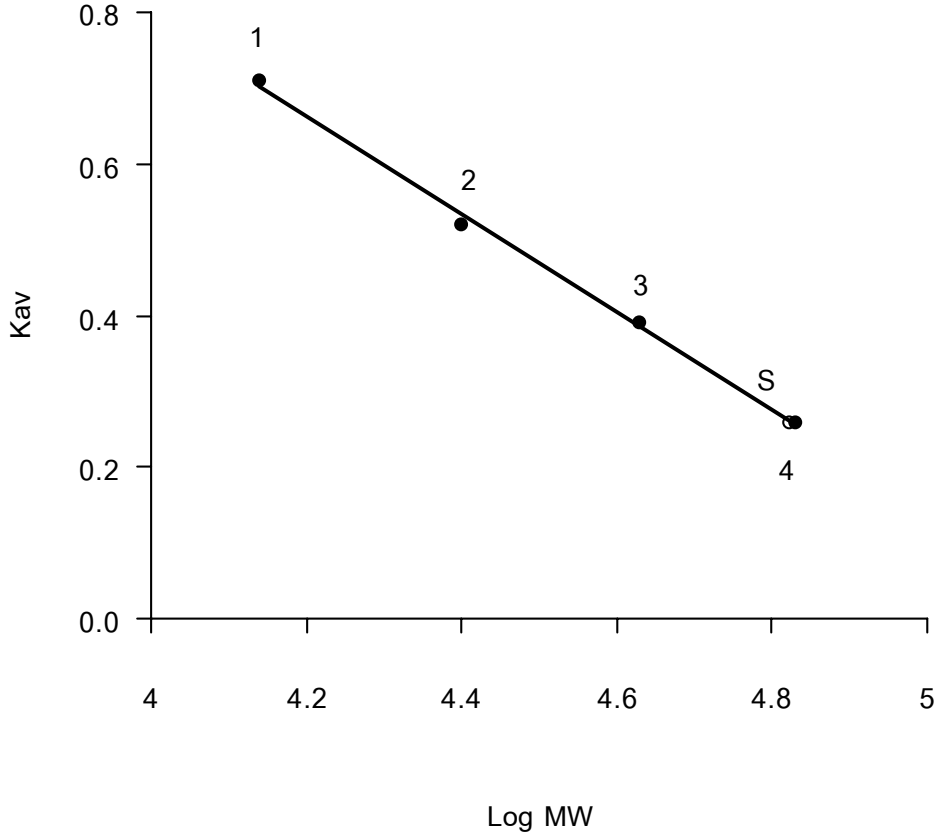


Figure 7 Calibration curve for the molecular weight determination of the purified catalase on Sephadex G-100 chromatography. S, the purified catalase, MW 66,600 dalton; 1, ribonuclease A, MW 13,700 dalton; 2, chymotrypsinogen A, MW 25,000 dalton; 3, ovalbumin, MW 43,000 dalton; 4, albumin, MW 67,000 dalton.

และ 32.7 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แตกต่างจากเอนไซม์แคทาเลสจากแหล่งอื่น เช่น พืช และจุลินทรีย์ ที่พบมีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยประมาณ 60-97 กิโลดาลตัน (Table 10)

Table 10 Comparison of molecular weight of catalase derived from this experiment and those from other sources

Source	Molecular weight of subunit (Dalton)	Reference
1. Animals		
Goat liver	60,000	Miyahara *et al*. (1978)
Bovine liver	60,000	Miyahara *et al*. (1978)
Human placental	60,000	Goncalves *et al*. (1999)
Human erythrocyte	60,000	Goncalves *et al*. (1999)
Beef liver	60,000	Goncalves *et al*. (1999)
Hepatopancreas of cultured black tiger shrimp	**66,600** **36,000 (form I),** **32,700 (formII)**	**This experiment by gel filtration** **This experiment by SDS-PAGE** **“**
2. Plants		
Sweet potato root microbodies	60,000	Esaka and Asahi (1982)
Loblolly pine (*Pinus taeda* L.)-megagametophytes	59,000	Mullen and Gifford (1993)
Leaves (*Zantedeschia aethiopica*)	54,000	Trindade *et al*. (1988)
Cottonseed (*Gossypium hissutum* L.)	57,000	Kunce *et al*. (1988)
3. Microorganisms		
Aspergillus niger	97,000	Kikuchi-Torii *et al*. (1982)
Bacillus YN-2000	73,000	Yumoto *et al*. (1990)
Streptomyces coelilor ATCC 10147	57,000	Kim *et al*. (1994)
Halobacterium halobium	62,000	Brown-Peterson and Salin (1995)
Thermoascus aurantiacus	75,000	Wang *et al*. (1998)

2.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่เตรียมได้โดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซีส (Electrophoresis)

2.5.1 การทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE: Nondenatured polyacrylamide gel electrophoresis)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์จากขั้นตอนต่างๆ มาศึกษาแบบแผนและความบริสุทธิ์ของโปรตีนโดยใช้อิเล็กโทรฟอรีซิสแบบ Native-PAGE ผลการทดลองปรากฏแบบแผนของโปรตีนโดยเรียงลำดับจากซ้ายไปขวา (Figure 8) โดยในแถวที่ 1 แถบโปรตีนในเอนไซม์สกัดประกอบด้วยโปรตีนชนิดต่างๆ หลายชนิดซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน แถบโปรตีนในแถวที่ 2 เป็นแถบโปรตีนที่ผ่านการไดอะไลซิสซึ่งแถบโปรตีนที่ได้จะมีลักษณะคล้ายกับแถวที่ 1 หลังจากนำเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนไดอะไลซิสผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M และผ่านการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอุลตราฟิวเตรชั่นแล้ว พบว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏในแถวที่ 3 มีเฉพาะแถบโปรตีนช่วงกลางๆ โดยแถบโปรตีนส่วนบนและส่วนล่างจะถูกกำจัดออกไปซึ่งแสดงว่าคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M นี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนชนิดที่มีประจุบวกและทำให้โปรตีนที่มีประจุลบมีความเข้มข้นและบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ต่อมาเมื่อนำเอนไซม์ผ่านคอลัมน์เจลฟิวเตรชันชนิด Sephadex G-100 พบว่ามีแถบโปรตีนเหลืออยู่เพียงแถบเดียวดังแถวที่ 4 แสดงว่าคอลัมน์เจลฟิวเตรชั่นชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ ดังนั้นเพื่อทำการทดสอบว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏเพียงแถบเดียวนี้เป็นแถบโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสและทราบน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์จึงทำการทดสอบตามวิธีการในข้อ 2.6 และ 2.5.2 ตามลำดับต่อไป

2.5.2 การทำอิเล็กโทรฟอรีซีสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากแต่ละขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์มาศึกษาแบบแผนของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าปรากฏแถบโปรตีนโดยเรียงลำดับจากซ้ายไปขวา (Figure 9) แถบโปรตีนแถวที่ 1 เป็นแถบโปรตีนของสารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด Low molecular weight แถวที่ 2 เป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์สกัดจะประกอบด้วยโปรตีนชนิดต่างๆ หลายชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน แถบโปรตีนในแถวที่ 3 เป็นแถบโปรตีนที่ผ่านการไดอะไลซิสซึ่งแถบโปรตีนที่ได้มีลักษณะคล้ายกับแถวที่ 2 ส่วนแถบโปรตีนในแถวที่ 4 เป็นแถบ

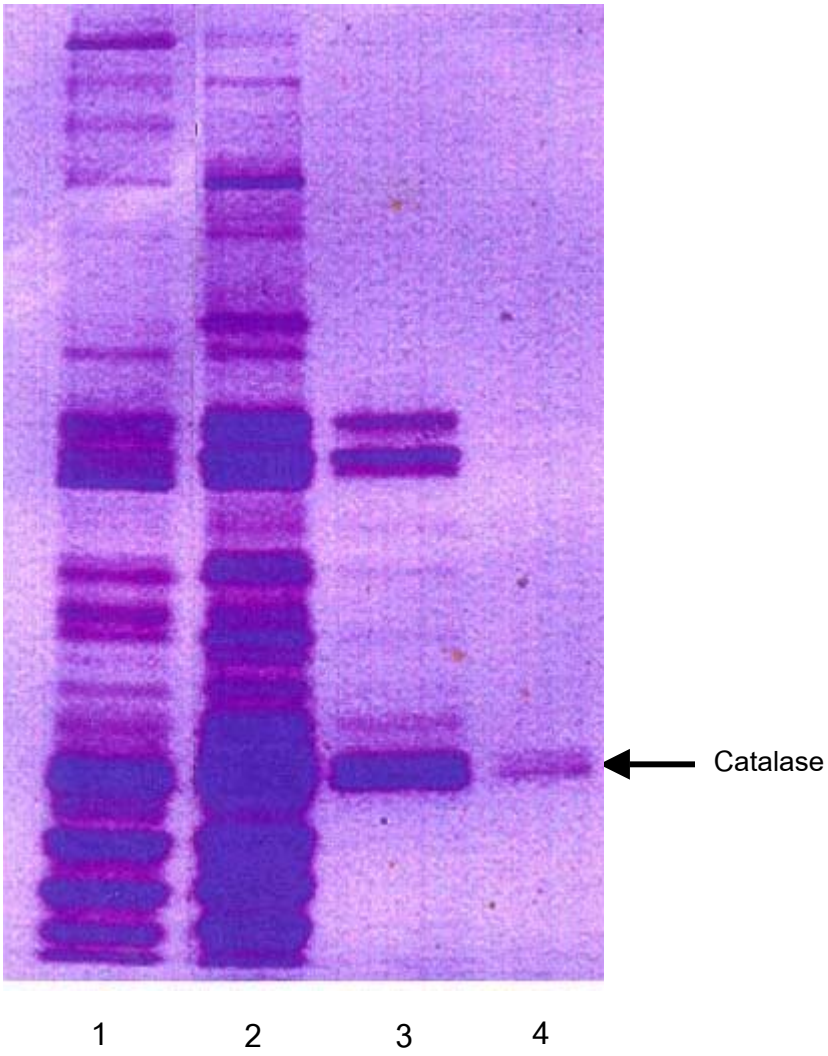


Figure 8 Nondenatured polyacrylamide gel electrophoresis electrophoresis of protein fractions objected during purification of catalase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp (*Peneaus monodon*).

[Lane 1, crude extract; Lane 2, dialysis; Lane 3, DEAE-Toyopearl 650M; Lane 4, Sephadex G-100.]

Protein concentration 15-20 μg/ml.

โปรตีนที่ได้หลังจากการผ่านคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M และทำให้มีความเข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอุลตราฟิวเตรชั่น พบว่าพบแถบโปรตีนที่ชัดเจนมีจำนวน 2 แถบบริเวณช่วงกลางของแถวที่ 4 ส่วนแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 45 กิโลดาลตัน หรือต่ำกว่า 25 กิโลดาลตัน มองเห็นเป็นแถบจางไม่ชัดเจน แสดงว่าคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนอิออนชนิด DEAE-Toyopearl 650M นี้มีประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนพวกที่มีประจุบวกและทำให้โปรตีนที่มีประจุลบมีความเข้มข้นและบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น สำหรับแถวที่ 5 เมื่อนำเอนไซม์มาผ่านคอลัมน์เจลฟิวเตรชันชนิด Sephadex G-100 พบว่ามีแถบโปรตีนช่วงกลางจำนวน 2 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (Log MW) กับระยะทางการเคลื่อนที่ (R_f) (Figure 10) พบว่าแถบโปรตีนแถบที่ 1 (ด้านบน) และแถบที่ 2 (ด้านล่าง) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36 และ 32.7 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งจากแบบแผนของโปรตีนแบบ SDS-PAGE นี้จะเห็นได้ว่าโปรตีนปริมาณมากถูกกำจัดออกไปในระหว่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์จนทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น สรุปผลการทำบริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนได้ (Table 9) ดังนั้นเพื่อทดสอบว่าแถบโปรตีนทั้ง 2 แถบที่ปรากฏอยู่เป็นแถบโปรตีนที่มีกิจกรรมของเอนไซม์คาทาเลสหรือไม่โดยการทดสอบตามวิธีการในข้อ 2.7 ต่อไป

2.6 การหาแถบของกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสที่สกัดจากแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Native-PAGE)

นำตัวอย่างเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 และได้ทดสอบความบริสุทธิ์แบบ SDS-PAGE และ Native-PAGE มาแล้ว ซึ่งพบว่าในการทดสอบแบบ SDS-PAGE ปรากฏว่ามีแถบโปรตีนที่เห็นจางๆ มีจำนวน 2 แถบ ซึ่งอยู่ใกล้ๆ กัน และการทดสอบแบบ Native-PAGE ปรากฏว่ามีแถบโปรตีนเพียง 1 แถบ ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันว่า แถบโปรตีนดังกล่าวเป็นแถบของเอนไซม์ (แคทาเลส) ที่ทำบริสุทธิ์หรือไม่ จึงทำการทดสอบแบบ Native-PAGE โดยใช้ตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้น แล้วทำการวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 2.6 จากผลการทดลองพบว่าซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อตัดเจลตรงบริเวณที่ตรงกับแถบโปรตีนที่ได้ย้อมไว้แล้วตามขั้นตอนในวิธีการที่กล่าวมาในข้อ 2.6 แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสที่ได้มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 235 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงว่าแถบของโปรตีนที่ปรากฏเป็นแถบของเอนไซม์แคทาเลส

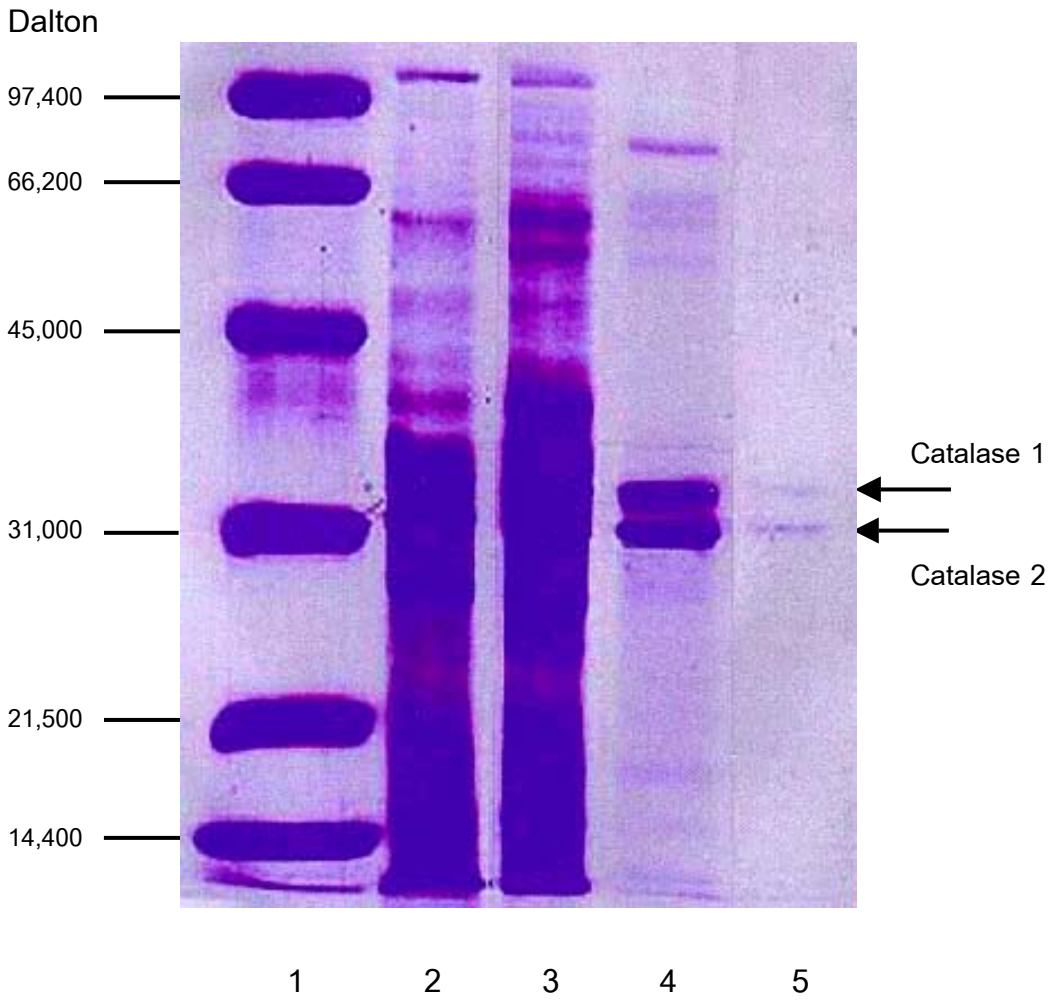


Figure 9 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of protein fractions obtained during purification of catalase from hepatopancreas of cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*).

[Lane 1, protein standard; Lane 2, crude extract; Lane 3, dialysis; Lane 4, DEAE-Toyopearl 650M; Lane 5, Sephadex G-100.]

Protein concentration 15-20 μg/ml.

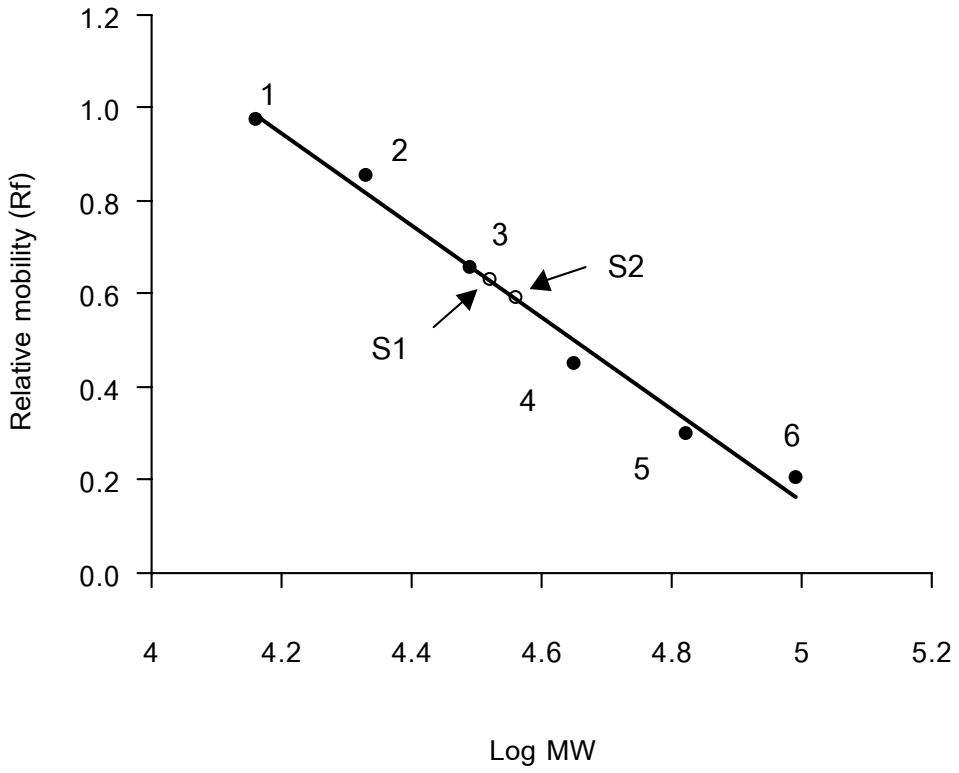


Figure 10 Calibration curve for the molecular weight determination of the purified enzyme on SDS-PAGE. S1, catalase II; S2, catalase I; 1, lysozyme, MW 14,400 dalton; 2, soybean trypsin inhibitor, MW 21,500 dalton; 3, carbonic anhydrase, MW 31,000 dalton; 4, ovalbumin, MW 45,000 dalton; 5, bovine serum albumin ovalbumin, MW 66,200; 6, phosphorylase b, MW 97,400 dalton.

2.7 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสในแผ่นเจลภายหลังการแยกโปรตีน**โดยอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ** (SDS-PAGE)

จากการทดสอบพบว่าเมื่อนำแผ่นเจลที่ไม่ได้ย้อมแถบโปรตีนเปรียบเทียบกับแผ่นเจลที่ย้อมโปรตีนเพื่อตัดเจลตรงบริเวณตำแหน่งที่ตรงกับตำแหน่งของโปรตีนที่ย้อม พบว่าแถบโปรตีนบนแผ่นเจลที่ย้อมนั้นมีแถบโปรตีน 2 แถบ ดังนั้นจึงตัดเจลเป็น 2 แบบคือ แบบแรกจะตัดเจลให้ครอบคลุมพื้นที่ของแถบโปรตีนทั้ง 2 แถบ และแบบที่สอง คือตัดเจลให้แยกออกจากกันโดยจะได้เป็นแถบที่ 1 และแถบที่ 2 เมื่อนำเจลที่ได้จากทั้ง 2 วิธีดังกล่าวมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสโดยการหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ลงบริเวณที่มีแถบโปรตีนบนแผ่นเจลที่ไม่ได้ทำการย้อมโปรตีน พบว่าทั้งในแบบแรกและแบบที่สองเกิดฟองฟูขึ้นเหมือนกัน จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า เอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จนถึงขั้นตอนที่ผ่านคอลัมน์เจลฟิวเตรชันชนิด Sephadex G-100 น่าจะประกอบไปด้วย 2 หน่วยย่อยของโปรตีน

3. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แคทาเลสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

3.1 พีเอชที่เหมาะสม

นำสารละลายเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เอนไซม์สกัดเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยง และเอนไซม์สกัดเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเล วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสในช่วงพีเอชตั้งแต่ 4.0-11.0 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แคทาเลสทั้ง 3 ชนิดคือ พีเอช 7.0 (ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์) (Figure 11) ที่พีเอชสูงหรือต่ำกว่านี้ พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากในสารละลายที่มีความเป็นกรดหรือเป็นด่างมากๆ ทำให้เอนไซม์เสียสภาพได้ง่าย จากการทดลองเอนไซม์แคทาเลสทั้ง 3 ชนิดนี้ พบว่าสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางซึ่งมีพีเอชในช่วง 6-9 สอดคล้องกับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แคทาเลสจากตับวัว (Maehly and Chance, 1954) ตับแพะ (Miyahara *et al*., 1978) จมูกข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) (Garcia *et al*., 2000) และใบ *Zantedeschia aethiopica* (Trindade *et al*., 1988) ซึ่งมีค่าของพีเอชที่เหมาะสมเท่ากันคือ พีเอช 7.0 นอกจากนี้มีการรายงานค่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์คาทาเลสจากมะละกอ (*Carica papaya*)(Chen *et al*., 1978) และต้นชา (*Camellia sinensis* L) มีค่าเท่ากับ พีเอช 6.1 และ 6.4 ตามลำดับ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลส

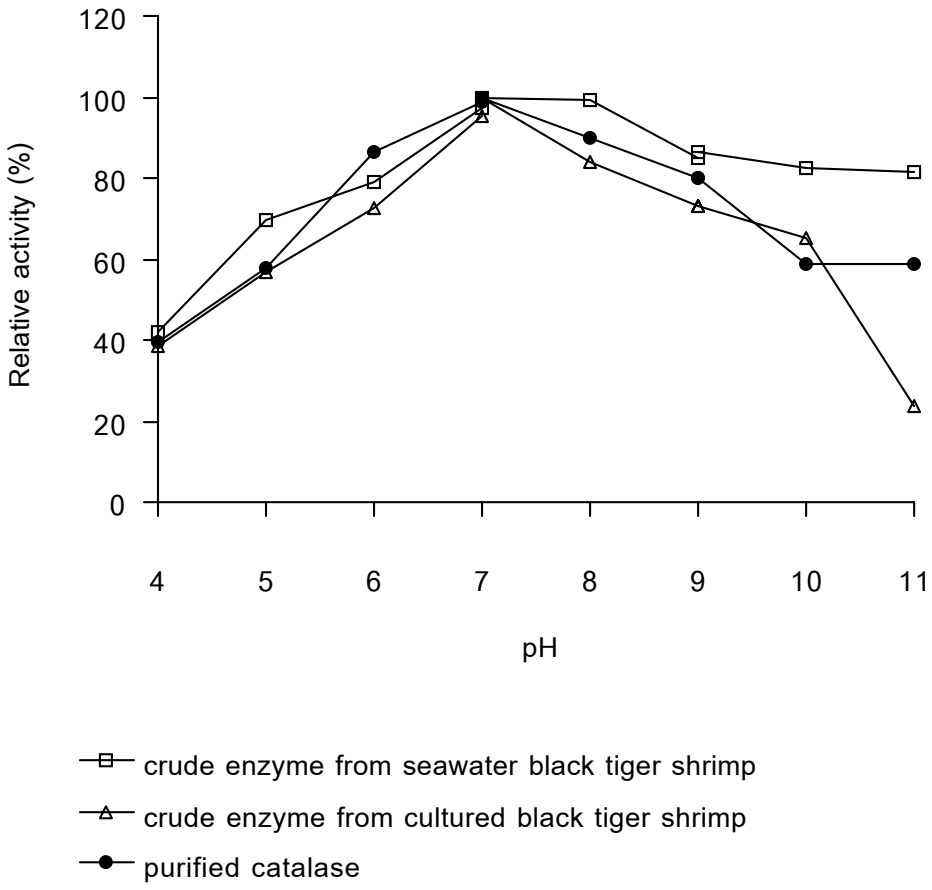
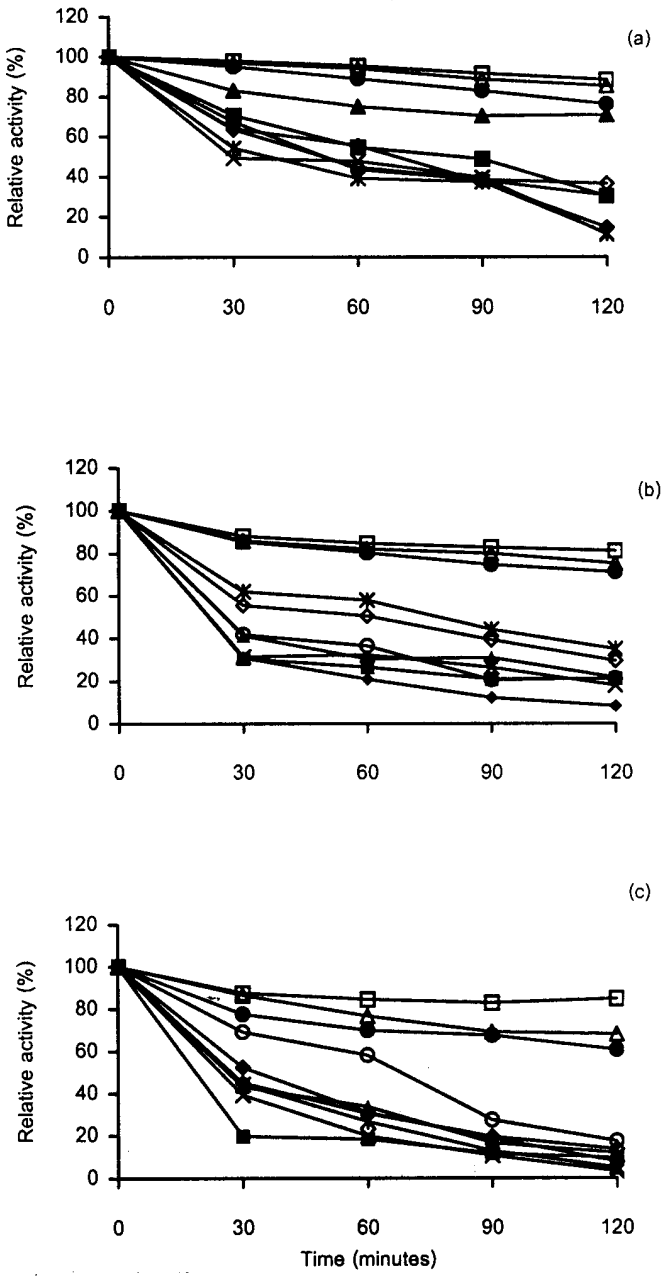


Figure 11 Effect of pH on the catalase activity from hepatopancreas of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Using buffer 0.05 M citrate-phosphate buffer (pH 4.0-7.0), 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.0-9.0) and 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.0-11.0).

ได้เช่นกัน ซึ่งได้แก่ *Escherichia coli*, *Rhodobacter capsulatus* และ *Bacillus* YN-2000 เป็นต้น พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 7.5, 6-6.5 และ 6.0 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ เอนไซม์ส่วนใหญ่จะเสียสภาพหรือสูญเสียความคงตัว เนื่องจากพีเอชของสารละลายจะมีผลต่ออิออนของกลุ่มพรอสเตติก (prototrophic groups) ของเอนไซม์ ส่งผลให้ความคงตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของกลุ่ม active site การจับกันของเอนไซม์กับสับสเตรตและการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรตไปเป็นผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป (Whitaker, 1994)

3.2 ความคงตัวต่อพีเอช

การทดสอบความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงพีเอช 6-8 สำหรับเอนไซม์สกัดเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยง และเอนไซม์สกัดเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเล พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วง พีเอช 7-8 ซึ่งพบว่าในช่วงพีเอชทั้ง 2 ช่วงนี้เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่มากกว่า 70% หลังจากทำการบ่มเป็นเวลานาน 120 นาที (Figure 12) ผลการทดลองนี้แสดงให้ทราบว่าเอนไซม์แคทาเลสสามารถทนต่อการสูญเสียสภาพได้ดีในสภาวะที่พีเอชเป็นกลาง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของเอนไซม์แคทาเลสจากพืชบางชนิด เช่น เอนไซม์แคทาเลสจากใบ *Zantedeschia aethiopica* ที่มีความคงตัวดีที่พีเอชในช่วง 6-8 (Trindade *et al*., 1988) และเอนไซม์แคทาเลสจากจมูกข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L) มีความคงตัวดีที่พีเอชเท่ากับ 8.0 (Garcia *et al*., 2000) แคทาเลสจากสัตว์บางชนิดให้ผลการทดลองสอดคล้องเช่นเดียวกัน เช่น เอนไซม์แคทาเลสจากตับแพะมีความคงตัวดีในช่วงพีเอช 6-8.5 พีเอชสูงหรือต่ำกว่านี้พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็วและที่พีเอชมีค่าต่ำกว่า 4.3 และสูงกว่า 11.0 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ (Miyahara *et al*.,1978) และเอนไซม์แคทาเลสจาก sweet potato root เมื่อบ่มที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 นาน 4 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูญเสียร้อยละ 80 แต่การบ่มที่พีเอช 8.5 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีกว่าการบ่มที่พีเอชต่ำๆ โดยสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เพียงร้อยละ 10 (Esaka and Asahi, 1982)



(a) purified catalase

(b) crude enzyme from cultured black tiger shrimp

(c) crude enzyme from seawater black tiger shrimp

Figure 12 pH stability of catalase activity from black tiger shrimp. Enzyme solution was dissolved at various pH (4.0 (♦), 5.0 (■), 6.0 (▲), and 7.0 (△) in 0.05M citrate-phosphate buffer; pH 7.0 (□), 8.0 (●) and 9.0 (O) in 0.05 M Tris-HCl buffer; pH 9.0 (◊), 10.0 (*) and 11.0 (X) in 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer

3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

สารละลายเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เอนไซม์สกัดเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยง และเอนไซม์สกัดเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเล นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสในช่วงอุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด คืออุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7.0 โดยพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นทำให้ความเร็วช่วงแรก (initial velocity) หรือกิจกรรมการย่อยสลาย (catalytic activity) ของเอนไซม์สูงขึ้นด้วย (Figure 13) และมีค่าสูงสุดเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว สาเหตุที่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงก็เนื่องมาจากโครงสร้างของเอนไซม์ในส่วนของหมู่พรอสเตติก (prosthetic grops) ถูกทำลายและเสียสภาพการทำงานไป (Garcia *et al*., 2000) จากผลการทดลองนี้ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แคทาเลสมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คาทาเลสจากแหล่งอื่นๆ เช่น เอนไซม์แคทาเลสจากใบ *Zantedeschia aethiopica* ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Trindade *et al*., 1988) เอนไซม์แคทาเลสจากต้นชา (*Camellia sinensis* L) ทั้ง 2 ชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 37 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์แคทาเลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และ 40 องศาเซลเซียสสำหรับแคทาเลสที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Tsagareli and Pruidze, 1991) เอนไซม์ชนิดเดียวกันจากแหล่งต่างกันอาจจะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ต่างกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลความแตกต่างกันของปัจจัยแวดล้อม เช่น แหล่งของวัตถุดิบที่สกัดเอนไซม์ ชนิดของสับสเตรต ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม และ พีเอช เป็นต้น

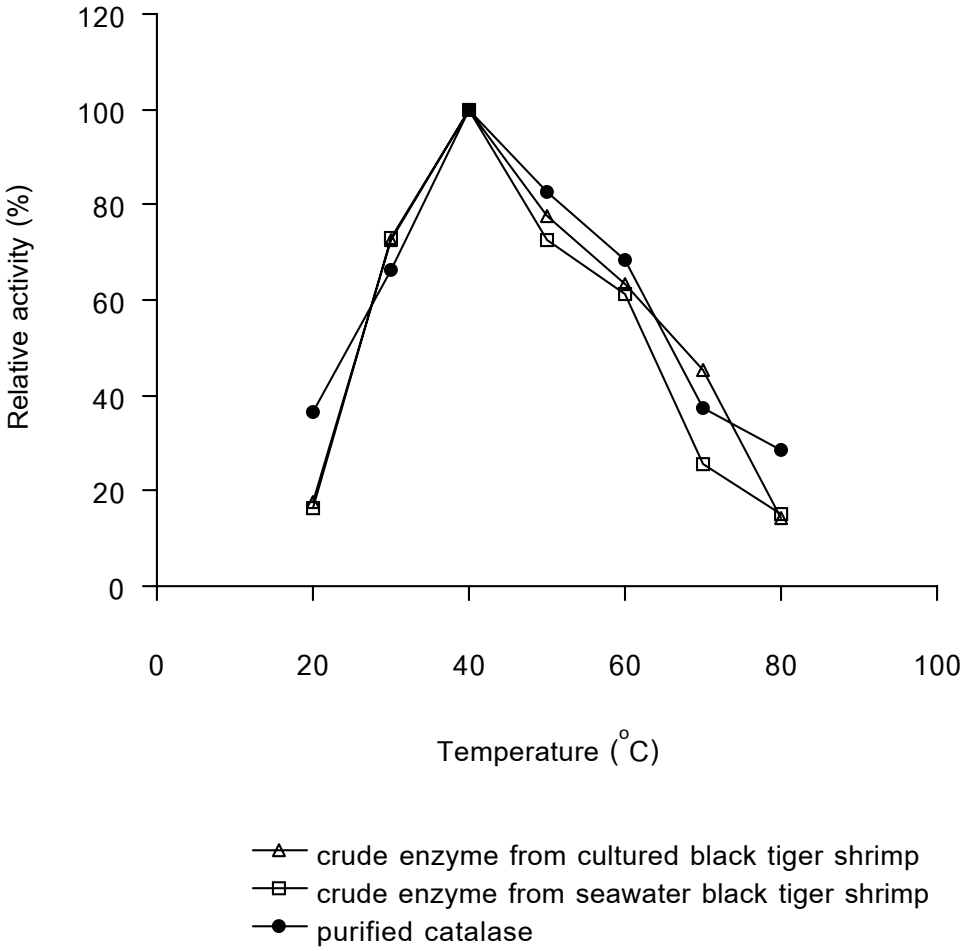
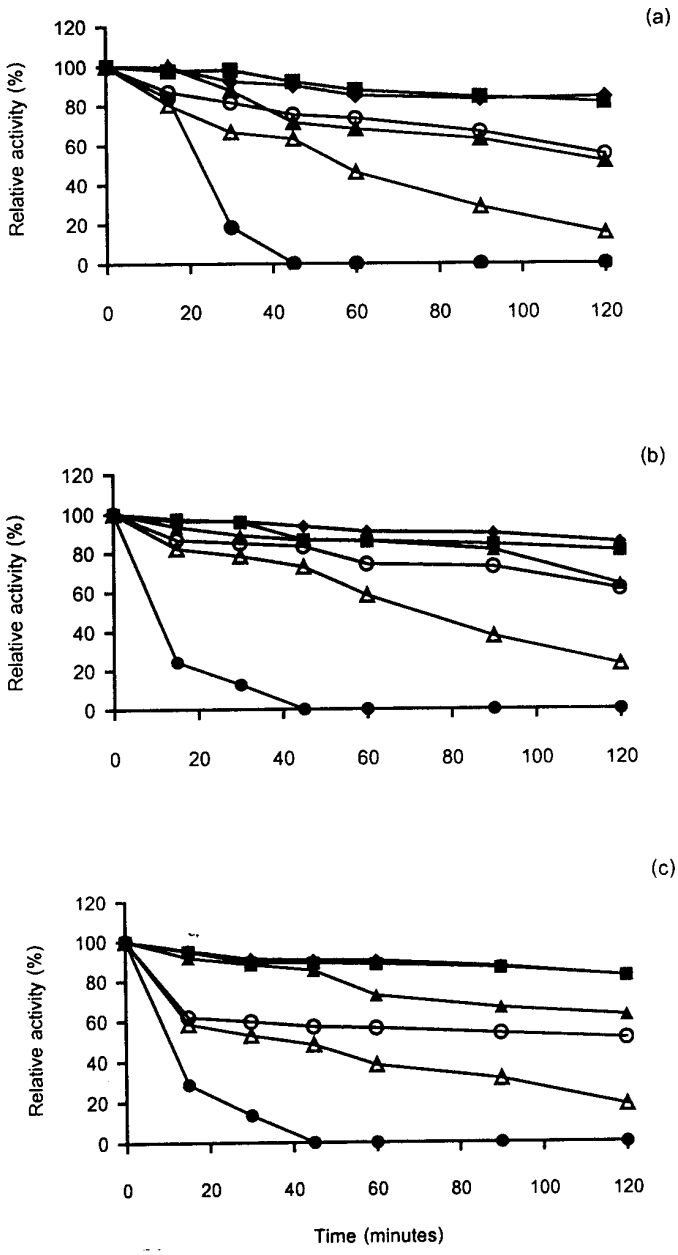


Figure 13 Effect of temperature on the activity of catalase of hepatopancreas of black tiger shrimp at pH 7.0.

3.4 **ความคงตัวต่ออุณหภูมิ** (Temperature stability)

ทำการบ่มสารละลายเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ เอนไซม์สกัดเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยง และเอนไซม์สกัดเริ่มต้นจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเล เป็นเวลา 30-120 นาที ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (Figure 14) โดยเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดลดลงเพียงเล็กน้อย และเมื่อทำการบ่มต่อไปอีกเป็นเวลา 120 นาที พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์มีค่าเท่ากับร้อยละ 84.32 85.13 และ 82.36 ตามลำดับ แต่ถ้าเพิ่มอุณหภูมิที่บ่มเป็น 70 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่งของกิจกรรมเริ่มต้นเมื่อบ่มเป็นเวลา 60 นาที และเมื่อทำการบ่มสารละลายเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 45 นาที พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วและไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เลย ผลการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์คาทาเลสสามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับเอนไซม์แคทาเลสจากแหล่งอื่นๆ ได้แก่ เอนไซม์แคทาเลสจากต้นชา (*Camellia sinensis* L) ทั้ง 2 ชนิด ทั้งชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ก็พบว่ามีความสอดคล้องกัน คือมีความคงตัวสูงที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส และกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งของกิจกรรมเริ่มต้น เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Tsagareli and Pruidze, 1991) นอกจากนี้มีรายงานของ Yumoto และคณะ (1990) พบว่าเอนไซม์แคทาเลสจากจุลินทรีย์กลุ่ม facultative alkalophilic *Bacillus* (*Bacillus* YN-2000) มีความคงตัวดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ส่วนเอนไซม์แคทาเลสจาก *Halobacterium halobium* พบว่าเป็นเอนไซม์ที่มีความคงตัวดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Brown-Peterson and Salin, 1995)



(a) purified catalase

(b) crude enzyme from cultured black tiger shrimp

(c) crude enzyme from seawater black tiger shrimp

Figure 14 Thermal stability of catalase from hepatopancreas of black tiger shrimp at various temperature

[30°C(♦), 40°C(■), 50°C(▲), 60°C(O), 70°C(△) and 80°C (●)

3.5 ผลของอิออนโลหะและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ผลการทดสอบอิออนของโลหะและสารเคมีบางชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (Table 11) พบว่า โซเดียมเอไซด์ (NaN_3) สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้รุนแรงที่สุด รองลงมาเป็น sodium dodecyl sulfate ร้อยละ 0.5 และ ethylenediamenetetra acetic acid ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาจากโครงสร้างของเอนไซม์แคทาเลสมีเหล็กเป็นองค์ประกอบอยู่ภายในโมเลกุล ดังนั้นเมื่อทำการเติม ethylenediamenetetra acetic acid ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารจับโลหะ (cheating agent) ลงไปก็จะส่งผลต่อเหล็กที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่เพียงเล็กน้อย จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แคทาเลสน่าจะเป็นพวกเมทธัลโลเอนไซม์ (metallo enzyme) ในขณะที่การเติมอิออน Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} และ Cu^{2+} สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงเช่นกัน แต่ K^+ และ Na^+ จะมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้สารประกอบอินทรีย์บางชนิด ได้แก่ เอธานอล และ เมทานอล พบว่ามีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Yumoto และคณะ (1990) ซึ่งได้กล่าวว่า เอนไซม์แคทาเลสโดยทั่วไปมีความคงตัวดีในสารประกอบอินทรีย์บางชนิด เช่น เอธานอล และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น อิออนของโลหะอาจมีผลยับยั้งหรือกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆได้ต่างกัน ได้แก่ cyanide และ azide ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสจาก *Thermoascus auranticus* รุนแรงที่สุด ในขณะที่อิออนโลหะหนัก ได้แก่ Ca^{2+}, Co^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} (0.1 มิลลิโมลาร์) และ Hg^{2+}(1 มิลลิโมลาร์) พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งกิจกรรมมากถึงร้อยละ 70 (Wang *et al*., 1998)

3.6 การศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แคทาเลส

การศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและพีเอช 7.0 ใช้สับสเตรต คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ระดับต่างๆ กัน คือ 10, 15, 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิโมลาร์ นำมาเขียนกราฟ Lineweaver-Burk plot ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง 1/[S] กับ 1/V (Figure 15) โดยจุดตัดบนแกน 1/[S] คือ $-1/K_m$ และจุดตัดบนแกน 1/V คือ $1/V_{max}$ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้สามารถวิเคราะห์ค่า K_m ได้เท่ากับ 16.7×10^{-2} โมลาร์ และ ค่า V_{max} เท่ากับ 1.67×10^3 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที โดยค่า K_m และ V_{max} เป็นค่าที่แสดงให้ทราบถึง

ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ โดยค่า K_m จะเป็นค่าที่แสดงถึงความสามารถของเอนไซม์ว่าสามารถจับกับสับสเตรตได้ดีเพียงใด ซึ่งถ้าค่า K_mมีค่าน้อยก็แสดงว่าเอนไซม์สามารถจับกับสับสเตรตได้ดี ในขณะที่ค่า V_{max} จะหมายถึง อัตราเร็วของการสลายตัวของเอนไซม์และสับสเตรตเพื่อให้เกิดผลิตผลของปฏิกิริยา ค่า K_m และ V_{max} จะเปลี่ยนแปลงไปโดยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ชนิดของสับสเตรต อุณหภูมิ และ พีเอชของปฏิกิริยานั้นๆ

Table 11 Effect of ions and chemicals on the catalase activity from cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Ions and chemicals	Concentration	Residual activity (%)
Control	-	100
KCl	10 mM	83.31
NaCl	10 mM	85.88
$CaCl_2$	10 mM	55.86
$MgCl_2$	10 mM	41.98
$ZnSO_4$	10 mM	27.00
$CuSO_4$	10 mM	27.68
EDTA	10 mM	19.61
Ethanol	2%	93.15
Methanol	2%	92.09
SDS	0.5%	14.11
NaN_3	10 μM	0

SDS = Sodium dodecyl sulfate; EDTA = Ethylenediamenetetra acetic acid

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ ซึ่งเปรียบเทียบค่า K_m ของเอนไซม์แคทาเลสจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำเลี้ยงกับค่า K_m ของเอนไซม์แคทาเลสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เมื่อใช้สับสเตรตเป็นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เหมือนกัน พบว่ามีความแตก

ต่างกันขึ้นกับสภาวะของปฏิกิริยานั้นๆ คือ เอนไซม์แคทาเลสจาก *Thermoascus aurantiacus* มีค่า K_m เท่ากับ $4.8x10^{-2}$ โมลาร์ (Wang *et al*., 1998) ในขณะที่ค่า K_m ของเอนไซม์แคทาเลสจาก *Halobacteruim halobium* มีค่า K_m เท่ากับ $60x10^{-2}$ โมลาร์ และ เอนไซม์จะถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมีความเข้มข้นของสับสเตรต (H_2O_2) ชนิดนี้มากกว่า $90x10^{-2}$ โมลาร์ (Brown-Peterson and Salin, 1995) นอกจากนี้ Yumoto และคณะ (1990) รายงานว่าเอนไซม์แคทาเลสจาก *Bacillus* YN-2000 มีค่า K_m ของเอนไซม์เมื่อใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสับสเตรต เท่ากับ $0.68x10^{-2}$ โมลาร์ และมีรายงานค่า K_m ของแคทาเลสจาก *Rhodobacter capsulatus*, *Neurospora crassac* และ *Escherichia coli* พบว่ามีค่าเท่ากับ $0.42x10^{-2}$ $2.5x10^{-2}$ และ $0.39x10^{-2}$ โมลาร์ ตามลำดับ

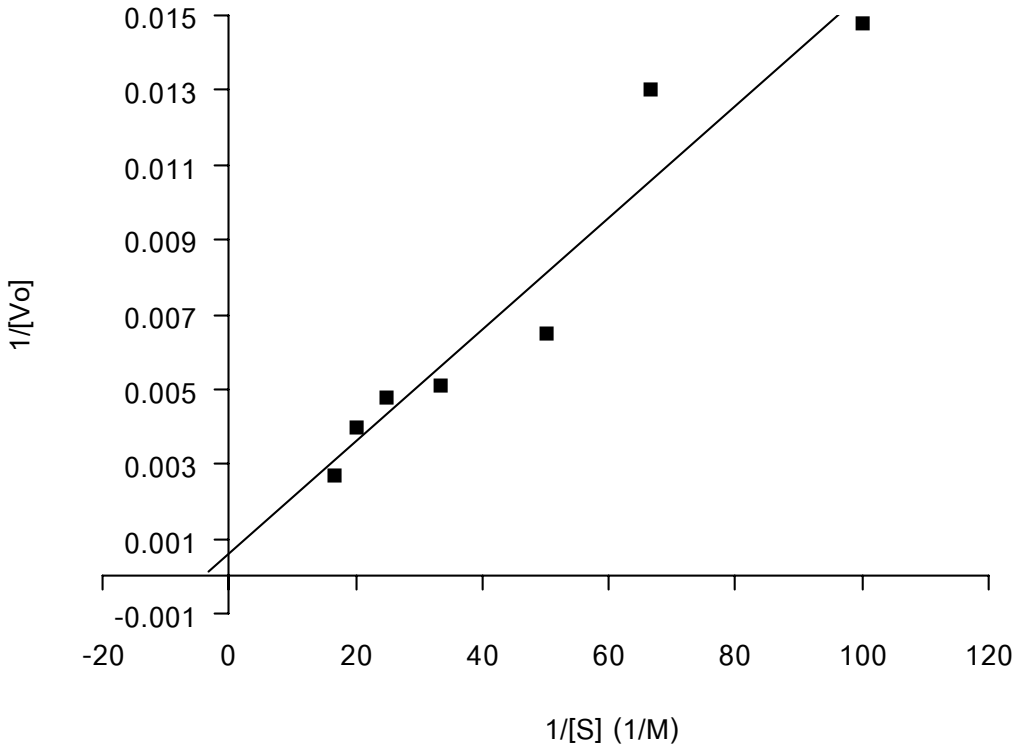


Figure 14 Lineweaver-Burk plot of catalase acitvity in various hydrogen peroxide (H_2O_2) concentrations at pH 7.0, 40°C