คุณลักษณะของเอนไซม์ไคโตไบเอสในกุ้งก้ามกรามจากบ่อเลี้ยง

Characterization of Chitobiase of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii* De Man) in Cultured Pond

สุวรรณา หมาดโหยด [1,3*] และ สุไหลหมาน หมาดโหยด [2,3]

Suwanna Madyod [1,3*] and Sulaiman Madyod [2,3]

บทคัดย่อ

การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไคโตไบเอสของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* De Man) ในบ่อเลี้ยงทั้งตัวผู้และตัวเมีย โดยเก็บตัวอย่างจากเลือด ตับและตับอ่อน หัวใจ ลำไส้ กระเพาะอาหาร และกล้ามเนื้อ เพื่อศึกษาคุณลักษณะของเอ็นไซม์ไคโตไบเอส ซึ่งประกอบด้วย การหาค่าการทำงาน (activity) ของเอนไซม์ไคโตไบเอส การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอ็นไซม์ไคโตไบเอส การทำให้เอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิในกุ้งก้ามกราม และการหาปริมาณโปรตีนจากเนื้อเยื่อ จากการศึกษาพบว่า ค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงสุดมาจากเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนทั้งตัวผู้และตัวเมีย เท่ากับ 129.48 และ 120.37 นาโนโมล/นาที/มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส พบว่าปริมาณของเอนไซม์ไคโตไบเอสต่อการเกิดปฏิกิริยาการทำงานสูงสุดที่ปริมาตร 15 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส เวลาที่เหมาะสมคือ 10 นาที และ pH ที่เหมาะสมสูงสุดอยู่ที่ pH 5.0 และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์จากตับและตับอ่อนไปสกัดกึ่งบริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (DEAE-Sephacel) และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์มีค่าการทำงานสูงสุดที่ pH 5 มีความเสถียร

[1] คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 109 ตำบลถ้ำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

[1] Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, 109 Tamyai, Thung Song, Nakhon Si Thammarat 80110, Thailand.

[2] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 133 ตำบลทุ่งใหญ่ อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80240

[2] Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya, 133 Thungyai, Nakhon Si Thammarat 80240, Thailand.

[3] หน่วยวิจัยการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย 109 ตำบลถ้ำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช 80110

[3] Aquatic Animal Health Management Unit, Agricultural Faculty, Rajamangala University of Technology Srivijaya, 109 Tamyai, Thung Song, Nakhon Si Thammarat 80110, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): joy067@yahoo.com Tel: 08 5883 3356

ต่ออุณหภูมิในช่วง 0-70 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรต่อ pH ที่ 4-9 การทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์ต้องอาศัยโคแฟคเตอร์ คือ Ca^{2+} และ Mg^{2+} และพบปริมาณโปรตีนสูงสุดในซีรัมจากเลือดของกุ้งก้ามกรามเพศผู้ และในตับและตับอ่อนของกุ้งก้ามกรามเพศเมีย ซึ่งจากการศึกษาทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามได้ โดยสามารถใส่ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม ซึ่งจะส่งผลกระตุ้นต่อการลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโต

คำสำคัญ: กุ้งก้ามกราม, เอนไซม์ไคโตไบเอส

ABSTRACT

Characterization of chitobiase in both male and female giant freshwater prawn was investigated. Samples were collected from their blood, hepatopancrease, heart, stomach and muscle to probe enzymatic characteristics in terms of activity, optimal conditions for activity and half-purification of enzymes via DEAE-Sephacel ion exchange chromatography column, biochemical characteristics of the half-purified chitobiase enzyme as well as muscle protein contents were probed . Chitobiase derived from both male and femalehepatopancrease showed their maximal enzymatic activity at 129.48 and 120.37 nmole/min/ml respectively. In terms of optimal conditions, chitobiase content was 15 microlitre at 50 C for 10 min at pH 5. Half-purified chitobiase obtained from hepatopancreasethrough DEAE-Sephacel ion exchange chromatography column and based on biochemical study, maximal activity was at pH 5, relatively stable at temperature in the range of 0-70 C and pH in the range of 4-9. Chitobiase activity demands Ca^{2+} and Mg^{2+}as co-factors. In addition, maximal protein contents were found in serum samples from male giant fresh water prawn and in hepatopancrease from female prawn. These findings can be applied for giant freshwater prawn culture in that Ca^{2+} and Mg^{2+} supplementation in giant fresh water prawn pond to stimulate molting forits rapid growth.

Key words: giant freshwater prawn, chitobiase enzyme

บทนำ

กุ้งก้ามกรามจัดเป็นสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนซึ่งเป็นที่นิยมในการเพาะเลี้ยงของเกษตรกร และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย งานวิจัยที่ผ่านมาส่วนมากเป็นการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการที่ทำให้กุ้งมีการเจริญเติบโตในแง่ของการเพาะเลี้ยง แต่งานวิจัยด้านเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตยังมีการศึกษาน้อย ซึ่งในการเจริญเติบโตของสัตว์ในกลุ่มนี้ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในระบบ ไคติโนไลติก (chitinolytic system) โดยพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด และมีการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และเอนไซม์ไคโตไบเอส (chitobiase) ระบบไคติโน

ไลติกอาจทำหน้าที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน บทบาทส่วนใหญ่ของระบบไคติโนไลติก คือ การย่อยสลายไคติน (chitin) ซึ่งเป็นสารโพลิเมอร์ (polymer) ของ N–acetyl-glucosamine พบมากในเปลือกของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน ผนังเซลล์ของเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเอนไซม์ไคโตไบเอสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายของการสลายไคติน โดยสลายไคโตไบโอส (chitobiose) ไปเป็น N-acetyl glucosamine (NAG) 2 โมเลกุล (Shaikh and Deshpande, 1993)

โดยทั่วไปหน้าที่ทางชีวภาพของเอนไซม์ไคโตไบเอสมีหลากหลาย เช่น มีหน้าที่เกี่ยวกับการลอกคราบโดยไคตินเป็นพอลิเมอร์ของ N-acetyl-glucosamine ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 -glycosidic เป็นส่วนประกอบสำคัญของเปลือกนอก (exoskeleton) ของ arthropod มีการลอกคราบ (molting) ติดต่อกันหลายครั้งโดยเปลือกนอกอันเก่าจะถูกสลัดทิ้ง และเปลือกใหม่จะถูกสังเคราะห์ในระหว่างกระบวนการ ecdysis ของสัตว์ในกลุ่ม arthropod เอนไซม์ไคโตไบเอสจะถูกหลั่งออกมา และปริมาณไคโตไบเอสที่หลั่งออกมาเป็นสัดส่วนกับขนาดของสิ่งมีชีวิตที่เกิดการลอกคราบสร้างเปลือกนอกขึ้นมาใหม่ จากการสังเคราะห์ไคตินทำให้เกิดสภาวะการลอกคราบสมบูรณ์ (Hanson and Lagadic, 2005) หน้าที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต โดยผิวด้านนอกของแมลงจะมีคิวติเคิล ส่วนเปลือกของแมลงจะมีไคตินเป็นองค์ประกอบ การเจริญเติบโตของแมลงเกิดจากการสลายเปลือกเก่าแล้วสร้างเปลือกใหม่ขึ้นแทนเปลือกเก่าเป็นระยะๆ (Merzendorfer and Zimoch, 2003) นอกจากนั้นเอนไซม์ไคโตไบเอสยังมีหน้าที่เกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองจากศัตรูหรือเชื้อก่อโรค โดย exo-chitinase เป็นเอนไซม์ที่มีความสัมพันธ์กับการต่อสู้กับการป้องกันเชื้อโรคโดยเฉพาะเชื้อรา ซึ่งทำให้เกิดโรคที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อของพืชได้ เชื้อราจะเข้าทำลายเนื้อเยื่อของพืชในระหว่างการพัฒนาโครงสร้างเครือข่าย (net) และยังไม่ทำปฏิกิริยาจนกระทั่งพืชเจริญพันธุ์เต็มที่ (40 วัน หลังการออกดอก) มีรายงานการทดลองของ Judkins *et al* . (1999) ในแคนตาลูปโดยการกระตุ้นให้เกิดการติดเชื้ออย่างต่อเนื่องซึ่งเป็นระยะแฝงตัวในช่วงที่ผลไม้เจริญพันธุ์เต็มที่ พบว่ามีปฏิกิริยาของเอนไซม์ chitobiase ในเนื้อเยื่อชั้น mesocarp และ exocarp เป็นต้น เอนไซม์ไคโตไบเอสพบได้ในสัตว์หลายกลุ่ม ได้แก่ สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนพบในเปลือกกุ้งและกระดองของปูสัตว์ ในกลุ่มโคพิพอด (copepod) บางชนิด เช่น *Calanus finmarehieus*, *Temora longicornis* และ *Daphnia* (Oosterhuis *et al*., 2000) ในกลุ่มของ annelid บางชนิดเช่น กลุ่มของหนอน (worm) เช่น หนอนใบยาสูบ (*Manduca sexta*) (Merzendorfer and Zimoch, 2003) ในกลุ่มของแมลงพบเอนไซม์ไคโตไบเอสบริเวณคิวติเคลของแมลง เช่น ตั๊กแตน (*Locusta migratoria*) (Kramer and Schirme, 1995) แมลงปีกแข็ง Australian spider และแมลงเต่าทอง (Merzendorfer and Zimoch, 2003) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ในตับหนู ส่วนในพืชส่วนใหญ่เน้นศึกษาเฉพาะเอนไซม์ไคติเนส มีรายงานการศึกษาเอนไซม์ไคโตไบเอสน้อยมาก เนื่องจากส่วนประกอบในเซลล์พืชไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสในกุ้งก้ามกราม และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์ในกุ้งก้ามกราม เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ทางชีวภาพของเอนไซม์ไคโตไบเอสบริสุทธิ์ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างกุ้งก้ามกราม และการเตรียมซีรัม (serum) จากเลือดกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกรามที่นำมาศึกษาเป็นกุ้งก้ามกรามที่มีอายุ 6 เดือน จากบ่อเลี้ยงที่อำเภอเชียรใหญ่ จ. นครศรีธรรมราช จากนั้นนำตัวอย่างกุ้งก้ามกรามมาดูดเลือดจากขาเดินคู่ที่ 3 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มขนาด 24 G x 1 นิ้ว ประมาณ 100 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอด เซ็นตริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสหรือซีรัมไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2. การเตรียมสารสกัดจากตับและตับอ่อน หัวใจ ลำไส้ และกล้ามเนื้อของกุ้งก้ามกราม

นำตับและตับอ่อน หัวใจ ลำไส้ กล้ามเนื้อ และกระเพาะอาหารของกุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมีย อย่างละ 1 ตัว โดยใช้อวัยวะละ 1 กรัม มาบดในหลอดเซ็นตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย 0.1 โมลาร์ Tris–HCl, pH 6.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

3. การเตรียมกราฟมาตรฐาน *p* – nitrophenol

เตรียมกราฟมาตรฐาน *p*–nitrophenol โดยใช้สารละลาย 0.5 มิลลิโมลาร์ *p*–nitrophenol ใน 0.1 โมลาร์ Tris–HCl, pH 6.0 ให้มีความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 20, 40, 60, 80 และ 100 นาโนโมล นำสารละลายที่เตรียมไปเติม 1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง VIS Spectrophotometer รุ่น SN 3SGE354003 ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

4. การศึกษาการทำงาน (Activity) ของเอนไซม์ไคโตไบเอส

การหาค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส โดยดัดแปลงตามวิธีการของสุวรรณา (2546) ดังนี้ นำส่วนใสของทุกๆ ตัวอย่างมาหาค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส โดยใช้ *p*–nitrophenyl–N–acetyl-β-D–glucosaminide (*p*NP–NAG) เป็นสับสเตรท (substrate) นำสารละลายเอนไซม์ 75 มิลลิลิตร ผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 มิลลิโมลาร์ *p*NP–NAG ปริมาณ 60 ไมโครลิตร ใน 0.1 โมลาร์ Tris–HCl, pH 6.0 ปริมาตร 465 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงของ *p*–nitrophenol ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ที่เกิดขึ้น โดยใช้ *p*–nitrophenol ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนเตรียมกราฟมาตรฐาน ซึ่งกำหนดให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส 1 หน่วย (unit) เท่ากับปริมาณ 1 ไมโครโมล ของ *p* – nitrophenol ที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 นาที นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสในแต่ละเนื้อเยื่อตัวอย่าง

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ดัดแปลงตามวิธีการของสุวรรณา (2546) ดังนี้

5.1 การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

นำสารละลายเอนไซม์จากเนื้อเยื่อที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงสุดของกุ้งก้ามกราม ปริมาตร 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 50 ไมโครลิตร มาผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 มิลลิโมลาร์ *p*NP – NAG ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรในแต่ละหลอดให้เป็น 200 ไมโครลิตร ด้วย 0.1 โมลาร์ Tris – HCl, pH 6.0 จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 800 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

5.2 การศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

นำสารละลายเอนไซม์จากเนื้อเยื่อที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงสุดของกุ้งก้ามกราม ปริมาตรที่ได้จากการทดลองในข้อ 5.1 เป็นปริมาตรที่เหมาะสมมา ผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 มิลลิโมลาร์ *p*NP – NAG ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใน 0.1 โมลาร์ Tris – HCl, pH 6.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิตั้งแต่ 0, 25, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

5.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

นำสารละลายเอนไซม์จากเนื้อเยื่อที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงสุดของกุ้งก้ามกราม ปริมาตรที่ได้จากการทดลองในข้อ 5.1 ซึ่งเป็นปริมาตรที่เหมาะสมมาผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 มิลลิโมลาร์ *p*NP – NAG ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใน 0.1 โมลาร์ Tris – HCl, pH 6.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิตามผลที่ได้จากข้อ 5.2 ที่เวลาตั้งแต่ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 50 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

5.4 การศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

นำสารละลายเอนไซม์จากเนื้อเยื่อที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงสุดของกุ้งก้ามกรามและปูทะเล ปริมาตรที่ได้จากการทดลองในข้อ 5.1 ไปทำปฏิกิริยากับ 5 มิลลิโมลาร์ *p*NP–NAG ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ที่มี pH 3–11 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยช่วง pH 3–6 ใช้ 0.1 โมลาร์ $NaCOOH_3$ และช่วง pH 6–9 ใช้ 0.1 โมลาร์ Tris–HCl หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิตามผลที่ได้จากข้อ 5.2 ตามเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 5.3 หยุดปฏิกิริยา ด้วย 1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้คำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ ไคโตไบเอส

6. การเตรียมเอนไซม์ไคไบเอสกึ่งบริสุทธิ์จากกุ้งก้ามกราม

การเตรียมเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของสุวรรณา (2546) โดยเตรียมคอลัมน์ DEAE – Sephacel ขนาด 2.5 x 9.5 เซนติเมตร มีปริมาตรของเรซิน (resin) เป็น

47 มิลลิลิตร ล้างคอลัมน์ด้วย 0.2 โมลาร์ sodium citrate-0.2%Triton x–100 แล้วปรับคอลัมน์ให้สมดุลย์ (equilibrate) ด้วย TB buffer (25 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 7.5) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นเติมตัวอย่าง 4.8 มิลลิลิตร แล้วล้างคอลัมน์ด้วย TB – PMSF ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกล้างออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำมาหาปริมาณโปรตีน แล้วล้างคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนค่าปริมาณโปรตีนเข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย 0.5 โมลาร์ NaCl ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิม และเก็บสารละลายหลอดละ 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้แต่ละหลอดไปหาค่าปริมาณโปรตีนและหาค่าการทำงานของเอนไซม์ในแต่ละหลอดแล้ว ทำการรวมสารละลายหลอดที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน หลังจากนั้นนำไปหาค่าการทำงานของเอนไซม์ หาปริมาณโปรตีน ทดสอบความบริสุทธิ์ โดยวิธี non–denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (non–denaturing PAGE) และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ

7. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์จากกุ้งก้ามกราม

การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์ ดัดแปลงตามวิธีการของสุวรรณา (2546) ดังนี้

7.1 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

นำสารละลายเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์จากกุ้งก้ามกราม ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 มิลลิโมลาร์ *p*NP – NAG ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ใน 0.1 โมลาร์ $NaCOOH_3$ ที่ pH 3 – 6, 0.1 โมลาร์ Tris–HCl, pH 6–9 และ 0.1โมลาร์ Tris–glycine, pH 10, 11 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์

7.2 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไคโตไบเอสต่อ pH

นำสารละลายเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์จากกุ้งก้ามกราม ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 โมลาร์ $NaCOOH_3$ ที่ pH 3–6, 0.1 โมลาร์ Tris–HCl, pH 6-9 และ 0.1 โมลาร์ Tris–glycine pH 10,11 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ปรับ pH ให้ได้ 7.5 ด้วย 0.5 โมลาร์ Tris–HCl, pH 7.7 จากนั้นเติม 5 มิลลิโมลาร์ *p*NP – NAG ปริมาตรหลอดละ 60 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์

7.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไคโตไบเอสต่ออุณหภูมิ

นำสารละลายเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธ์จากกุ้งก้ามกราม ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 โมลาร์ Tris–HCl, pH 6.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆกัน ตั้งแต่ 0, 30, 40, 50, 60, 70 , 80 และ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นเติม 5 มิลลิโมลาร์

*p*NP-NAG ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วแช่น้ำแข็งนาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์

7.4 การศึกษาผลของ $CaCl_2$ $MgCl_2$ และ EDTA ต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์

7.4.1 การศึกษาผลของ $CaCl_2$

นำสารละลายเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์จากกุ้งก้ามกราม ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 มิลลิโมลาร์ *p*NP–NAG ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และ 0.1 โมลาร์ $CaCl_2$ ในปริมาตร ตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 600 ไมโครลิตร โดยใช้ 0.1 โมลาร์ Tris – HCl, pH 6.0 จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์

7.4.2 การศึกษาผลของ $MgCl_2$

นำสารละลายเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธ์จากกุ้งก้ามกราม ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 มิลลิโมลาร์ *p*NP – NAG ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และ0.1 โมลาร์ $MgCl_2$ ในปริมาตร ตั้งแต่ 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 600 ไมโครลิตร โดยใช้ 0.1 โมลาร์ Tris–HCl, pH 6.0 จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์

7.4.3 การศึกษาผลของ EDTA

นำสารละลายเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์จากกุ้งก้ามกราม ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ผสมกับสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 5 มิลลิโมลาร์ *p*NP – NAG ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และ 0.1 โมลาร์ EDTA ปริมาตร ตั้งแต่ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 ปรับปริมาตรให้ได้ 600 ไมโครลิตร โดยใช้ 0.1 โมลาร์ Tris–HCl, pH 6.0 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 โมลาร์ Na_2CO_3 ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์

8. การศึกษาปริมาณโปรตีนของเนื้อเยื่อต่างๆจากกุ้งก้ามกราม

การศึกษาปริมาณโปรตีนของเนื้อเยื่อ โดยดัดแปลงตามวิธีการของสุวรรณา (2546) ดังนี้

8.1 การเตรียมกราฟมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA)

เตรียมกราฟมาตรฐาน BSA โดยใช้ BSA ที่ความเข้มข้น 3, 5, 7, 9 มิลลิกรัม จากนั้นเติมสารละลาย Bradford ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าดูดกลื่นแสงนำค่าที่ได้หาฟังก์ชันความเอียง

8.2 การศึกษาปริมาณโปรตีนของเนื้อเยื่อต่าง ๆ จากกุ้งก้ามกราม

หาปริมาณโปรตีนของเนื้อเยื่อต่างๆจากกุ้ง

ก้ามกราม โดยดัดแปลงตามวิธีของ Bradford (1976) ดังนี้ ดูดสารตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร เติมสารละลายชุดหาโปรตีน 3 มิลลิลิตร โดยทำควบคู่ไปกับ BSA

ผลการทดลอง

1. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งก้ามกราม

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งก้ามกราม พบว่าสารละลายเอนไซม์จากตับและตับอ่อนมีค่าการทำงานสูงสุดทั้งในกุ้งเพศผู้และเพศเมียโดยมีค่าเท่ากับ 129.48 และ 120.37 นาโนโมล/นาที/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

2. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

2.1 การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

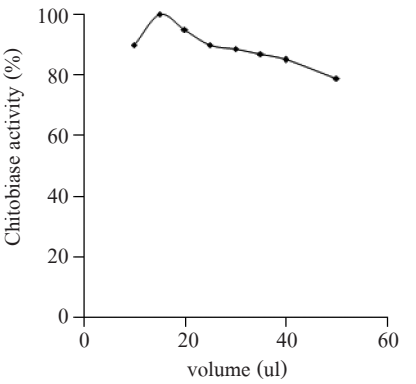
การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส โดยใช้ผลการทำงานสูงสุดจากข้อ 1 พบว่า ปริมาณเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาสูงสุดอยู่ที่ปริมาตร 15 ไมโครลิตร (ภาพที่ 1)

2.2 การศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

การศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส พบว่าเอนไซม์ไคโตไบเอสมีค่าการทำงานเพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิในช่วง 0–50 องศาเซลเซียส และสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสลดลงตามลำดับ (ภาพที่ 2)

2.3 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการ



ภาพที่ 1 การผันแปรของปริมาณเอนไซม์ต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

ตารางที่ 1 ค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้งก้ามกราม

ชนิดเนื้อเยื่อ	ค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส (นาโนโมล/นาที/มิลลิลิตร)	
	เพศผู้	เพศเมีย
กระเพาะ	122.53	119.56
กล้ามเนื้อ	119.2 9	91.25
ลำไส้	118.40	117.98
ตับและตับอ่อน	129.48	120.37
หัวใจ	111.80	104.62
ซีรัม	127.05	113.92

ทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส พบว่า เอนไซม์ไคโตไบเอสมีค่าการทำงานสูงสุดที่เวลา 10 นาที จากนั้นค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสลดลงจนต่ำสุด ที่ 50 นาที ดังนั้นในการทดลองต่อๆ ไป จึงเลือกใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ 10 นาที (ภาพที่ 3)

2.4 การศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

การศึกษาระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส พบว่า ค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสมีค่าต่ำที่ pH 3 และมีค่าการทำงานสูงสุดที่ pH 5 จากนั้นค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส เริ่มลดลงจนมีค่าการทำงานต่ำสุดที่ pH 11 (ภาพที่ 4)

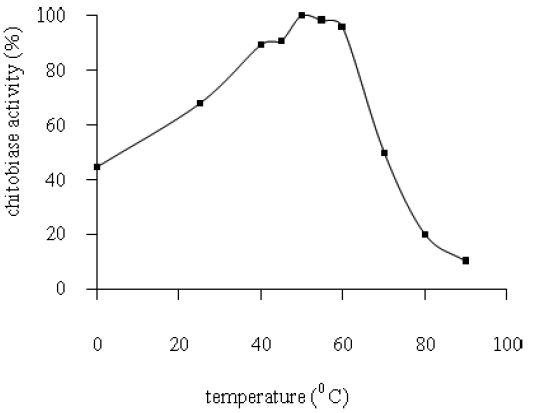
3. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์จากกุ้งก้ามกราม

3.1 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

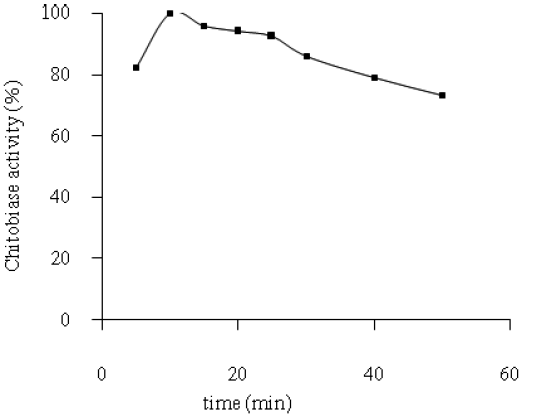
การศึกษาผลของ pH พบว่าเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์มีค่าการทำงานต่ำที่ pH 3 มีค่าการทำงานเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH ในช่วง 4–5 และสูงที่สุดที่ pH 5.0 จากนั้นค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสลดลงเมื่อ pH มีค่าเพิ่มขึ้นจนมีค่าการทำงานน้อยสุดที่ pH 11 (ภาพที่ 5)

3.2 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์ต่อ pH

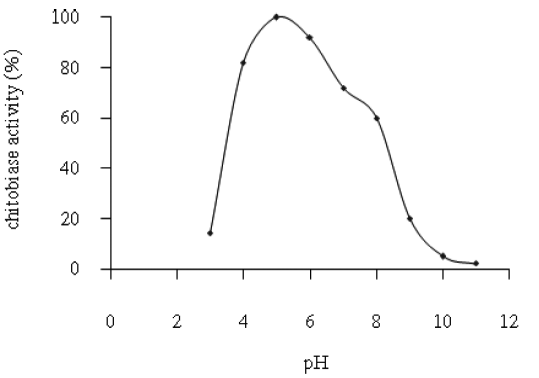
การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์ต่อ pH พบว่าเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์มีความเสถียรต่อ pH ในช่วง 4–9 และเริ่มมีค่าการทำงานลดลงตามลำดับเมื่อบ่มที่ pH 10 จนเสียค่าการทำงานอย่างสมบูรณ์ที่ 11 (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 2 การผันแปรของอุณหภูมิต่อค่าการของเอนไซม์ไคโตไบเอส



ภาพที่ 3 การผันแปรของเวลาต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส



ภาพที่ 4 การผันแปรของพีเอชของค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส

3.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์ต่ออุณหภูมิ

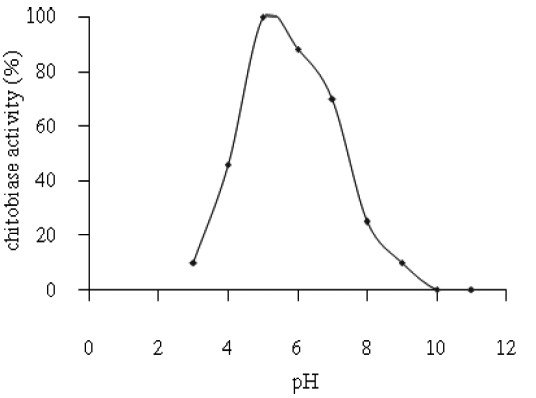
การศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิ พบว่าเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 0–70 องศาเซลเซียส และเริ่มมีค่าการทำงานลดลงตามลำดับ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 และ 90 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 8)

3.4 การศึกษาผลของ $CaCl_2$, $MgCl_2$ และ EDTA ต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์

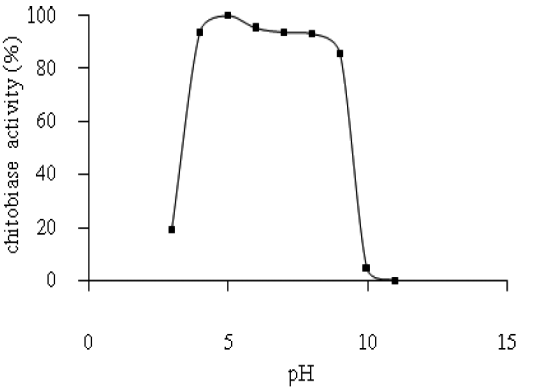
การศึกษาผลของ $CaCl_2$ ต่อการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์ พบว่า Ca^{2+} มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส โดยกระตุ้นมากขึ้นตามความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่เพิ่มขึ้น และกระตุ้นได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ การศึกษาผลของ $MgCl_2$ พบว่า Mg^{2+} มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส โดยกระตุ้นมากขึ้นตามความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่เพิ่มขึ้น และกระตุ้นได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ การศึกษาผลของ EDTA พบว่า EDTA มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยยับยั้งได้มากที่สุดที่ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 7)

4. การศึกษาปริมาณโปรตีนของเนื้อเยื่อต่างๆจากกุ้งก้ามกราม

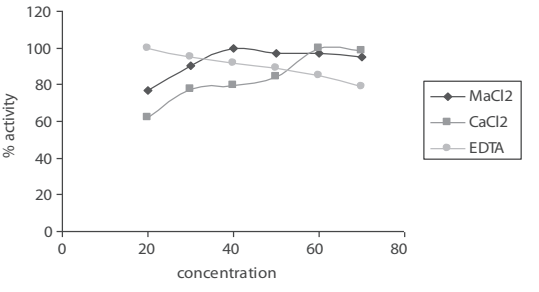
จากการนำส่วนใสจากกระเพาะอาหาร กล้ามเนื้อ ลำไส้ ตับและตับอ่อน หัวใจ และซีรัมที่ผ่านการเซ็นตริฟิวก์ทั้งกุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมียไปหาปริมาณโปรตีน โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Bradford (1976) ปริมาณ 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร พบว่าในซีรัมของเพศผู้มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด เท่ากับ 1.999



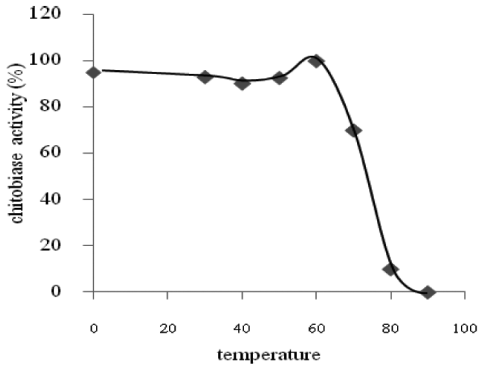
ภาพที่ 5 ความผันแปรของพีเอชต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์



ภาพที่ 6 ความเสถียรของ pH ต่อค่าการทำงานเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์



ภาพที่ 7 ความเข้มข้น $CaCl_2$, $MgCl_2$ และ EDTA ต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ



ภาพที่ 8 ความเสถียรของอุณหภูมิต่อค่าการทำงานของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์

มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่วนเพศเมียในตับมีปริมาณโปรตีนมากที่สุดอยู่ที่ 0.844 (ตารางที่ 2)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไคโตไบเอส ในกุ้งก้ามกราม พบว่าปริมาณเอนไซม์จากตับและตับอ่อนมีค่าการทำงานสูงสุด ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองในกุ้งแชบ๊วยของสุวรรณา (2546) พบค่าการทำงานสูงสุดในซีรัม ผลการศึกษาดังกล่าวแตกต่างกันเนื่องจากสัตว์ที่ศึกษาต่างชนิดกัน มีสภาพแวดล้อมและแหล่งที่อยู่อาศัยแตกต่างกัน และเกี่ยวกับการย่อยสารอาหารที่ต่างกัน ส่วนการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 15 ไมโครลิตร, เวลาที่เหมาะสมคือ 10 นาที จึงเลือกใช้ระดับเวลาดังกล่าว ในการหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส และระดับ pH ที่เหมาะสม คือ pH 5.0 ซึ่งได้ผลในทิศทางเดียวกันกับการทดลองของสุวรรณา (2546) ซึ่งพบปริมาณเอนไซม์มีค่าเหมาะสมที่ 25 ไมโครลิตร, เวลาที่เหมาะสมเริ่มคงที่ที่ 15 นาที, อุณหภูมิมีค่าเหมาะสมที่ 55 องศาเซลเซียส และระดับ pH มีค่าเหมาะสมที่ 6.0 และขณะที่ในกุ้งกุลาดำ พบว่าอุณหภูมิมีค่าเหมาะสมที่ 50 องศาเซลเซียส และระดับ pH มีค่าเหมาะสมที่ 5.5 (นิทรา, 2543) และผลการทดลองดังกล่าวยังใกล้เคียงกับเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์ที่พบจากแหล่งต่างๆ เช่น จากผิวหนังของตั๊กแตน *Locusta migratoria* ที่มีค่าการทำงานสูงสุดที่ pH 4-5 (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976) จากตับและผิวชั้นนอกของปูฟิดเดลอร์ พบเอนไซม์ไคโตไบเอสมีค่าการทำงานสูงสุดที่ pH 5-6 (Zou and Fingerman, 1999) รวมถึงจากการทดลองของ Overdijk *et al*. (1981) พบเอนไซม์ไคโตไบเอสจากตับกุ้งนอร์ทเทิร์นมีค่าการทำงานสูงที่ pH 4-6

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อต่างๆ ของกุ้ง

ชนิดเนื้อเยื่อ	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	
	เพศผู้	เพศเมีย
กระเพาะ	1.419	0.762
กล้ามเนื้อ	1.40	0.68
ลำไส้	0.892	0.525
ตับและตับอ่อน	0.988	0.844
หัวใจ	0.957	0.719
ซีรัม	1.999	0.416

จากผลการทดลองนำเอนไซม์จากตับและตับอ่อนทำให้กึ่งบริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ DEAE-sephacel แล้วนำไปศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า เอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 0–70 องศาเซลเซียส, ผลของแคทไอออนชนิด $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ส่วน EDTA มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ผลการศึกษาดังกล่าวแตกต่างจากผลการทดลองของสุวรรณา (2546) พบว่าผลของความเสถียรต่ออุณหภูมิมีค่าเหมาะสมอยู่ในช่วง 25–50 องศาเซลเซียส, ผลของแคทไอออนชนิด $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ มีผลยับยั้งการทำงานที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ ส่วน EDTA มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวอาจมีผลมาจากสภาพแวดล้อมของการดำรงชีวิตของกุ้งก้ามกรามและกุ้งแชบ๊วยที่ต่างกันจึงทำให้ค่าความเสถียรต่อค่าการทำงานของคุณลักษณะเอนไซม์ ไคโตไบเอสต่างๆแตกต่างกันเพราะกุ้งน้ำจืดและกุ้งทะเลมีการปรับตัวกับสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน

งานวิจัยครั้งนี้สามารถนำข้อมูลไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาคุณสมบัติและหน้าที่ทางชีวภาพของเอนไซม์ไคโตไบเอสบริสุทธิ์และนำข้อมูลไปใช้ในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามได้ เนื่องจากเอนไซม์ ไคโตไบเอสเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต้องอาศัย cofactor ในการทำงานได้แก่ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ซึ่งเมื่อกุ้งก้ามกรามได้รับ Ca^{2+} และ Mg^{2+} เพิ่มขึ้นก็จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส ซึ่งส่งผลกระตุ้นการลอกคราบเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสในกุ้งก้ามกราม สามารถสรุปได้ดังนี้ คือ พบสารละลายจากตับและตับอ่อนมีค่าการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอสสูงสุด ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมอยู่ที่ 15 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่สามารถทำงานได้เหมาะสมที่สุดอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส ในเวลา 10 นาที และระดับ pH ที่มีการทำงานเหมาะสม คือ 5.0 จากนั้นนำเอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์มาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่า ค่า pH ที่เอนไซม์ไคโตไบเอสกึ่งบริสุทธิ์ทำงานสูงสุดอยู่ที่ 5.0 มีความเสถียรต่อ pH อยู่ในช่วง 4 – 9 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 0 – 70 องศาเซลเซียส $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไคโตไบเอส ส่วน EDTA มีผลยับยั้งการทำงาน ดังนั้นในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามควรมีการตรวจสอบปริมาณของแคลเซียม และแมกนีเซียมในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งจะช่วยในเรื่องการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการลอกคราบเพื่อการเจริญเติบโตที่ดี

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนที่เกี่ยวข้องกับบทบาททางชีวภาพเบื้องต้นของเอนไซม์ เช่น บทบาทที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ บทบาทที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม เป็นต้น เพื่อเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามของเกษตรต่อไป

เอกสารอ้างอิง

นิทรา มาศวิวัฒน์. 2543. การทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของเอนไซม์ไคติเนสและไคโตไบเอสจากเลือดกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต,

มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์.

สุวรรณา ผลใหม่. 2546. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.

Hanson, M.L. and Lagadic, L. 2005. Chitobiase activity as an indicator of aquatic ecosystem health. **Aquatic Ecosystem Health and Management** 8: 441-450.

Judkins, M., Pardue, T., Biles, C., Bruton, B. and Zhang, J. 1999. **Characterization of exochitinase of cantaloupe fruit tissue.** Available Source: http://www.digital.library.okstate.edu/IOAS/oas_htm_file/v79/p99_101nf.html, Jenuary 24, 2006.

Kramer, W. and Schirmer, U. 1995. Modern Crop Protection Compounds. Verlag GmbH & Co., Weinheim, Germany.

Merzendorfer, H and Zimoch, L. 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology** 206: 4393–4412.

Oosterhuis, S.S., Baars, M.A. and Breteler, W.C. M.K. 2000. Release of the enzyme chitobiase by the copepod *Temora lomgicornis*: characteristics and potential tool for estimating crustacean biomass production in the sea. **Marine Ecology. Progress series** 196: 195–206.

Overdijk, B., Kroef, W.M.J.V.D., Steijn, G.V. and Lisman, J.J.W. 1981. Isolation and further characterization of bovine brain hexosaminidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology** 659: 255 - 266.

Shaikh, S.A. and Deshpande, M.V. 1993. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and Applied research. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 9: 468-475.

Spindler, K.D. 1976. Initial characterization of chitinase and chitobiase from the integument of *Drosophila hydei*. **Insect Biochemistry** 6: 663–667.

Zielkowski, R. and Spindler, K.D. 1978. Chitobiase and chitobiose from the integument of *Locusta migratoria*: characterization and titer during the fifth larval instar. **Insect Biochemistry** 8: 67–71.

Zou, E. and Fingerman, M. 1999. Chitobiase activity in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab *Uca pugilator* during the molting cycle. **Marine Biology** 133: 97–101.