

ประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสรวม ทริปซิน และไคโมทริปซินของหอยหวาน
(*Babylonia areolata*)

ปัญญาพร สฤณดิษฐ์นนทา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาชีววาริชศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

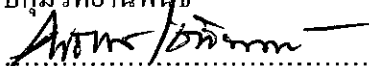
มิถุนายน 2549

ISBN 974-502-766-9

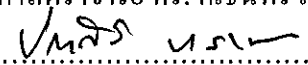
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ปัญพร สถิตย์ชัยนันทา ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

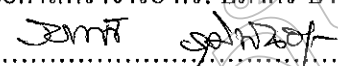
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร. คเชนทร เฉลิมวัฒน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปภาศิริ บาร์เนท)

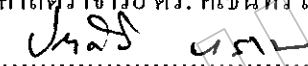
.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

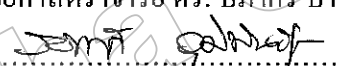
คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

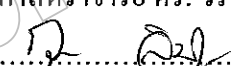
(รองศาสตราจารย์ ดร. คเชนทร เฉลิมวัฒน์)

.....กรรมการ

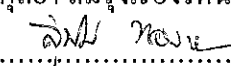
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปภาศิริ บาร์เนท)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

.....กรรมการ

(ดร. กุญญา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์)

.....กรรมการ

(ดร. สุพิศ ทองรอด)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประทุม ม่วงมี)

วันที่ 23 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2549

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา

จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปีภาคต้น ปีการศึกษา 2547

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ทั้งนี้ได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร.คเชนทร เถลิวัฒน์ ประธานควบคุมวิทยานิพนธ์ ให้คำปรึกษา แก้ไขข้อบกพร่องในการปฏิบัติงาน ตลอดจนช่วยเหลือสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน รวมถึงคณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปภาศิริ บาร์เนท รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒพันธ์ชัย ดร.กุลยา ลิ้มรุ่งเรืองรัตน์ ดร.สุพิศ ทองรอด ที่กรุณาให้แนวทางในการค้นคว้าหาความรู้ และตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว และคุณลลิตภัทร เศษพรมทอง ที่คอยสนับสนุน ช่วยเหลือให้คำปรึกษา รวมทั้งเป็นกำลังใจในการศึกษาเสมอมา ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปภาศิริ บาร์เนท ดร.เสาวภา สวัสดิ์พีระ ดร.วรเทพ มุธุวรรณ ดร.กฤษณา รุ่งเรืองศักดิ์-ทอรัสเช็น คุณลลิตา เข้าวเรืองฤทธิ์ คุณมยุรา ประยูรพันธ์ คุณทศพรธรรม ขาวสีงาน คุณธาริณี ผดุงศักดิ์ชยกุล คุณรัตนพร วิภาตะกลัศ และเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลเถียงสัตว์น้ำสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จไปด้วยดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้ อุปกรณ์ เครื่องมือ ตลอดจนสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ปัญญาพร สฤณดิษฐ์นนทา

44910613: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต)

คำสำคัญ: ต่อมย่อยอาหาร/ ทางเดินอาหาร/ ทริปซิน/ ไคโมทริปซิน/ *Babylonia areolata*

ปัญจพร สฤทธิชัยนันท์: ประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอสรวม ทริปซินและ
ไคโมทริปซินของหอยหวาน (*Babylonia areolata*) (CHARACTERIZATION OF TOTAL
PROTEASE TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN IN THE SPOTTED BABYLON, *Babylonia*
areolata) อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์: กเชนทร เฉลิมวัฒน์, Ph.D., ปภาศิริ บาร์เนท, Ph.D.,
วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย, Ph.D. 82 หน้า ปี พ.ศ. 2549. ISBN 974-502-766-9

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน
ในต่อมย่อยอาหารและทางเดินอาหารของหอยหวาน (*Babylonia areolata*) ที่อุณหภูมิ 20, 40 และ
60 องศาเซลเซียส โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท พบว่า
กิจกรรมของ ทริปซินในต่อมย่อยอาหารที่อุณหภูมิ 20, 40 และ 60 คือ 20.12, 43.27 และ 63.21
U mg. prot.⁻¹ ในทางเดินอาหาร คือ 42.06, 65.12 และ 94.87 U mg. prot.⁻¹ ส่วนกิจกรรมของ
ไคโมทริปซินในต่อมย่อยอาหาร คือ 13.29, 22.60 และ 35.92 U mg. prot.⁻¹ ในทางเดินอาหาร คือ
10.76, 14.14 และ 32.82 U mg. prot.⁻¹ เมื่อเปรียบเทียบแยกในแต่ละเพศ พบว่า กิจกรรมของทริปซิน
ในต่อมย่อยอาหารของเพศผู้คือ 35.45, 69.43 และ 99.45 U mg. prot.⁻¹ และของเพศเมียคือ 4.78,
13.84 และ 20.96 U mg. prot.⁻¹ ตามลำดับ โดยเอนไซม์ทริปซินในเพศผู้มีประสิทธิภาพสูงกว่าใน
เพศเมียที่อุณหภูมิต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญในต่อมย่อยอาหาร ($p < 0.01$) ซึ่งอาจเป็นเพราะมี
ทริปซินสองไอโซไซม์ คือ 33.08 และ 28.01 kDa ส่วนตัวเมียจะมีเพียงไอโซไซม์ขนาด 28.01 kDa
ในทางเดินอาหารกิจกรรมของทริปซินในเพศผู้คือ 52.11, 75.84 และ 111.64 U mg. prot.⁻¹ ส่วนใน
เพศเมียคือ 32.01, 50.18 และ 78.09 U mg. prot.⁻¹ ตามลำดับ โดยเอนไซม์ทริปซินในเพศผู้มี
ประสิทธิภาพสูงกว่าในเพศเมียที่อุณหภูมิต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และมีสองไอโซไซม์ คือ
26.15 และ 20.06 kDa อย่างไรก็ตามช่วงของกิจกรรมเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของทั้งสองเพศนั้น
ยังอยู่ในช่วงเดียวกัน ส่วนกิจกรรมของไคโมทริปซินในต่อมย่อยอาหารของเพศผู้คือ 10.76, 23.88
และ 31.73 U mg. prot.⁻¹ ส่วนของเพศเมียคือ 18.29, 21.32 และ 40.12 U mg. prot.⁻¹ ตามลำดับ โดย
กิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว ระหว่างทั้ง 2 เพศที่อุณหภูมิเดียวกันนั้นไม่มีความแตกต่างกันและมี
น้ำหนักโมเลกุล 42.15 kDa สำหรับกิจกรรมของไคโมทริปซินในทางเดินอาหารระหว่างทั้งสอง
เพศนั้นไม่แตกต่างกันโดยในเพศผู้คือ 14, 22.27 และ 32.26 U mg. prot.⁻¹ ส่วนในเพศเมียคือ 7.52,
6.01 และ 33.39 U mg. prot.⁻¹ ตามลำดับ และมีสองไอโซไซม์ คือ 19.37 และ 14.22 kDa เช่นกัน
โดยอุณหภูมิที่เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินมีประสิทธิภาพดีที่สุดคือที่ 60 องศาเซลเซียส

44910613: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc. (AQUATIC SCIENCE)

KEYWORDS: DIGESTIVE GLAND/ DIGESTIVE TRACT/ TRYPSIN/ CHYMOTRYPSIN/

Babylonia areolata

PUNJAPON SARITDICHAINANTA: CHARACTERIZATION OF TOTAL
PROTEASE TRYPSIN AND CHYMOTRYPSIN IN THE SPOTTED BABYLON, *Babylonia*
areolata. THESIS ADVISORS: KASHANE CHALERMWAT, Ph.D., PRAPASIRI BARNETT,
Ph.D., VEERAPONG WUTTIPANCHAI, Ph.D. 82 P. 2006. ISBN 974-502-766-9

The present study describes some characteristics and the activities of trypsin and chymotrypsin from the digestive gland and digestive tract of the spotted babylon (*Babylonia areolata*) at various temperature (20, 40 and 60 °C) by measurement of the absorbance of enzyme and specific substrate, trypsin using BAPNA and chymotrypsin using SAPNA. The activities of trypsin; from the digestive gland were 20.12, 43.27 and 63.21 U mg. prot.⁻¹ and from the digestive tract were 42.06, 65.12 and 94.87 U mg. prot.⁻¹ The activities of chymotrypsin; from the digestive gland were 13.29, 22.60 and 35.92 U mg. prot.⁻¹ and from the digestive tract were 10.76, 14.14 and 32.82 U mg. prot.⁻¹ In consideration between sexes, the activities of trypsin from the digestive gland of male babylon were 35.45, 69.43 and 99.45 U mg. prot.⁻¹, where in the female's were 4.78, 13.84 and 20.96 U mg. prot.⁻¹, respectively. The activities of male babylon were much higher than those females at all experiment temperatures (p<0.01). This could be because there were 2 isozymes of trypsin in the male's digestive gland (33.08 and 28.01 kDa), while only one was found in female (28.01 kDa). The activities of trypsin in the digestive tract of male babylon were 52.11, 75.84 and 111.64 U mg. prot.⁻¹ where in the female's were 32.01, 50.18 and 78.09 U mg. prot.⁻¹. The male's activities were higher than those of the female (p<0.05) and both have the same 2 isozymes which were 26.15 and 20.06 kDa, however, they were in the same range at the same temperature. Chymotrypsin activities in the digestive gland of male babylon were 10.76, 23.88 and 31.73 where those in the females' were 18.29, 21.32 and 40.12, respectively. The activity of chymotrypsin's digestive tract of male babylon was equal to that females (14, 22.27 and 32.26 U mg. prot.⁻¹ where of the females' were 7.52 6.01 and 33.39 U mg. prot.⁻¹). There were 2 isozymes of 19.37 and 14.22 kDa. The optimum temperature of both enzymes of babylons' from this study was 60 °C.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ชีววิทยาของหอยหวาน.....	4
กระบวนการสลายกรดอะมิโนในหอย.....	7
เอนไซม์ (Enzyme).....	9
เอนไซม์โปรติเอส (Protease)	10
การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์.....	15
การศึกษาด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (Photometric Assay).....	15
ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์.....	17
อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis).....	18
อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis).....	23
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
แบบแผนการวิจัย.....	25
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....	26
วิธีการวิจัย.....	29

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	36
4 ผลการวิจัย.....	37
กราฟ p-Nitroanilide มาตรฐาน.....	37
การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน ในต่อมย่อยอาหารและทางเดินอาหารของหอยหวานในแง่ความสัมพันธ์ ระหว่างเพศในแต่ละอุณหภูมิ.....	38
กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินในหอยหวานเพศผู้และ เพศเมีย.....	46
การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินในต่อมย่อย อาหารและทางเดินอาหารของหอยหวานในแง่ความสัมพันธ์กับเพศและ อุณหภูมิ.....	49
การทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบบอริกซ์ (Native Electrophoresis) และการทำ ไซโมแกรม (Zymogram) เพื่อศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์.....	51
5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	53
ประสิทธิภาพของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินในหอยหวาน (<i>Babylonia</i> <i>areolata</i>).....	53
น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน ในหอยหวาน (<i>Babylonia</i> <i>areolata</i>).....	55
สรุปผลการวิจัย.....	65
ข้อเสนอแนะ.....	65
บรรณานุกรม.....	66
ภาคผนวก.....	70
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารและสารเคมีต่าง ๆ.....	71
ภาคผนวก ข รายละเอียดเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส.....	75
ภาคผนวก ค คำย่อของสัณสเทรทที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์.....	80
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	82

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 รูปแบบการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโนในสัตว์จำพวกมอลลัสก์...	8
2 แสดงคุณสมบัติบางประการของซีรีน โปรติเอส และLipase.....	13
3 แสดงค่า %T ที่เหมาะสมกับช่วงโมเลกุลของสาร.....	21
4 การเจือจาง p-Nitroanilide ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน.....	31
5 สูตรในการเตรียม Polyacrylamide Seperating และ Staking Gel	34
6 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินในหอยหวานที่ อุณหภูมิ 20, 40 และ 60 องศาเซลเซียส ($R = 9$).....	48
7 เปรียบเทียบค่ากิจกรรมเฉลี่ยของเอนไซม์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย.....	50
8 กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซิน และค่ามวลโมเลกุลของเอนไซม์ ที่พบในสัตว์น้ำต่าง ๆ.....	59
9 ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการเตรียม และการใช้ SDS-Gel	78

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	หอยหวาน <i>Babylonia areolata</i>	2
2	หอยหวาน <i>Babylonia areolata</i>	2
3	หอยหวาน <i>Babylonia Spirata</i>	2
4	โพรบอสีตของหอยโพรโซแบรงเคียในระยะหัดตัวและคลายตัว.....	4
5	ลักษณะกายวิภาคของหอยน้ำเค็มโพรโซแบรงเคียออร์เคอร์นีโอแกสโทรโพดา <i>Busycon canaliculatum</i>	5
6	ฝักไข่ของหอยหวาน.....	6
7	โครงสร้างของทริปซิน.....	11
8	โครงสร้างของไคโมทริปซิน.....	11
9	โครงสร้างของเปปซิน.....	12
10	โครงสร้างของ Carboxypeptidase B.....	12
11	โครงสร้างของ Carboxypeptidase B.....	12
12	เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์.....	16
13	องค์ประกอบภายในเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	16
14	หลักการทำงานของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	16
15	คิวเวตแบบต่าง ๆ (Cuvett)	18
16	อิเล็กโตรโฟริซิสแบบแนวตั้ง	20
17	อิเล็กโตรโฟริซิสแบบแนวนอน.....	20
18	แสดงการเกิดโครงสร้างร่างแหของโพลีอะคริลาไมด์ เจล.....	22
19	2-เมอร์แคปโตเอธานอล.....	24
20	ไดโรโอโทรอล.....	24
21	แบบแผนการวิจัย.....	25
22	การทำอิเล็กโตรโฟริซิสและไซโมแกรมเพื่อใช้ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของ เอนไซม์.....	36
23	กราฟมาตรฐาน p-Nitro Anilide ที่ค่าการดูดกลืนแสง 410 นาโนเมตร.....	37
24	กราฟค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของเอนไซม์ทริปซินในต่อมย่อยอาหารของเพศผู้ และเพศเมียที่อุณหภูมิ 20, 40 และ 60 องศาเซลเซียส	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
25 กราฟค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของเอนไซม์ทริปซินในและทางเดินอาหารของเพศผู้และเพศเมียที่อุณหภูมิ 20, 40 และ 60 องศาเซลเซียส.....	41
26 กราฟค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของเอนไซม์ไคโมทริปซินใน Digestive Gland ของเพศผู้และเพศเมียที่อุณหภูมิ 20, 40 และ 60 องศาเซลเซียส	43
27 กราฟค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของเอนไซม์ไคโมทริปซินใน Digestive Track ของเพศผู้และเพศเมียที่อุณหภูมิ 20, 40 และ 60 องศาเซลเซียส	45
28 กราฟแท่งเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินจากต่อมย่อยอาหารและทางเดินอาหารของหอยหวานเพศผู้และเมียที่อุณหภูมิต่าง ๆ.....	48
29 แผนภาพแสดงน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของเอนไซม์ทริปซินจากต่อมย่อยอาหารและทางเดินอาหารของหอยหวานเพศผู้และเมีย.....	51
30 แผนภาพแสดงน้ำหนักโมเลกุล (kDa) ของเอนไซม์ไคโมทริปซินจากต่อมย่อยอาหารและทางเดินอาหารของหอยหวานเพศผู้และเมีย.....	52