1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ระบบไคติโนไลติก (chitinolytic system) เป็นระบบเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือไคติเนส (chitinase) และไคโตไบเอส (chitobiase) ระบบนี้อาจทำหน้าที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตต่างชนิด บทบาทส่วนใหญ่ของระบบไคติโนไลติกคือ การย่อยสลายไคติน (chitin) ซึ่งเป็นสารโพลิเมอร์ (polymer) ที่พบมากในธรรมชาติประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็น N-acetyl glucosamine ไคตินส่วนใหญ่พบในโครงสร้างที่ให้ความแข็งแกร่งได้แก่เปลือกของสัตว์พวกครัสเตเชียน (crustacean) เช่น กุ้ง กั้ง ปู หอย กระดองของหมึก และแมลง รวมทั้งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์

เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส (N-acetyl glucosaminidase,, NAGase) หรือไคโตไบเอส เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายของการสลายไคตินโดยสลายไคโตไบโอส (chitobiose) ไปเป็น N-acetyl glucosamine เอนไซม์ NAGase ในระบบไคติโนไลติกมีบทบาททางชีวภาพที่หลากหลายอาทิเช่น มีบทบาทเกี่ยวกับการลอกคราบ การเจริญเติบโต โดยพบเอนไซม์ NAGase ในตับและ midgut gland ของกุ้งในกระเพาะอาหารของปลาไหลและทางเดินอาหารของแมงกะพรุน เอนไซม์นี้ยังมีบทบาทเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองจากศัตรูหรือเชื้อก่อโรค โดยพบเอนไซม์ในเลือดของปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) ปลาเทอร์บอท (turbot) และในไข่ของหอยเม่น (sea urchin) รวมทั้งมีบทบาทเกี่ยวกับการช่วยผสมพันธุ์ของตัวอสุจิ (sperm) กับไข่ของเพรียง (ascidian) คางคกและของหนู

กุ้งแชบ๊วยมีชื่อสามัญว่า banana prawn มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus merguiensis* เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยเนื่องจากมีรสชาติดี

เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศโดยเฉพาะญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีความต้องการกุ้งทะเลในปริมาณมาก ลูกกุ้งแชบ๊วยมีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ดูแลอนุบาลง่ายและโตเร็วกว่าลูกกุ้งกุลาดำ (black tiger prawn, *Penaeus monodon*) ในช่วงต้นของการเลี้ยง (ศรีรัตน์ สอดสุข และ พนม กระจ่างพจน์, 2541) แต่หลังจากเลี้ยงนาน 2 เดือนไปแล้วกุ้งแชบ๊วยมีอัตราการเจริญช้าและมีอัตราการรอดตายต่ำกว่ากุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วยจึงเป็นที่นิยมในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่ากุ้งกุลาดำ (ธวัช ศรีวีระชัย และฐานันดร์ ทัตตานนท์, 2538) แต่ปัจจุบันกุ้งกุลาดำซึ่งนิยมเลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมได้ประสบปัญหาการขยายพื้นที่เลี้ยงได้น้อยลงและพื้นที่เลี้ยงเดิมมีสภาพเสื่อมโทรมรวมทั้งมีปัญหาสำคัญคือ เกิดโรคระบาดที่ไม่สามารถควบคุมได้ทำให้ต้องพักบ่อนานเป็นเหตุให้ผลผลิตกุ้งกุลาดำไม่ต่อเนื่อง ราคาผันผวนและส่งผลให้ผลผลิตกุ้งกุลาดำของประเทศไทยลดน้อยลงมาก นอกจากนี้ต้นทุนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำค่อนข้างสูงและการผลิตลูกกุ้งกุลาดำต้องอาศัยแม่พันธุ์จากธรรมชาติซึ่งมีราคาสูงทำให้ลูกกุ้งมีราคาสูงตามไปด้วย กุ้งแชบ๊วยจึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเรื่องต้นทุนการผลิตลูกกุ้งเพราะกุ้งแชบ๊วยสามารถเจริญพันธุ์ได้รวดเร็วและสามารถใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดินในการผลิตลูกกุ้งได้ (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) หากสามารถเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ได้ขนาดที่ต้องการแล้วจะพบว่ากุ้งแชบ๊วยมีราคาสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่มีขนาดเท่ากัน (เมธี วัฒนสิงห์, 2543) แต่การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยยังต้องการหลักวิชาการที่ต่างจากกุ้งกุลาดำหลายประการ เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยมีพฤติกรรมการกินอาหารและนิสัยการว่ายน้ำของกุ้งแชบ๊วยต่างจากกุ้งกุลาดำ ปัจจุบันนักวิชาการและนักวิจัยจึงให้ความสนใจศึกษาและหาทางที่จะพัฒนาการเพาะฟักและพัฒนาการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ดียิ่งขึ้น งานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาเอนไซม์ NAGase ในด้านการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์นี้เพื่อเป็นข้อมูลนำไปสู่การศึกษาบทบาททางชีวภาพของเอนไซม์อันจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยต่อไปในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1.1 ชีววิทยาของกุ้งแชบ๊วย

กุ้งแชบ๊วยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus merguiensis* de Man มีชื่อสามัญว่า banana prawn โดยมีลำดับอนุกรมวิธานรายงานไว้ดังนี้ (Grey *et al*., 1983)

Phylum Arthropoda

Superclass Crustacea

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus Penaeus

1.1.1 ลักษณะทั่วไป

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดปานกลาง ตัวโตเต็มวัยมีขนาดลำตัวยาว 10-15 เซนติเมตร ขนาดใหญ่สุดอาจยาวถึง 25 เซนติเมตร น้ำหนักตัวประมาณ 50-400 กรัม ลักษณะลำตัวมีสีขาวครีมปนเหลืองมีจุดสีน้ำตาล เขียวแก่และเขียวอ่อนกระจายอยู่ เปลือกหุ้มลำตัวเรียบเป็นมันลักษณะเปลือกบาง เนื้อมาก มีเปลือกหัวหรือกรีส่วนบนเป็นรูปสามเหลี่ยม มีฟันทั้งด้านบนและด้านล่าง โดยฟันกรีด้านบนมีประมาณ 7-8 ซี่ ด้านล่าง มี 5-6 ซี่ เปลือกคลุมหัวมีร่องตามยาวและร่องตามขวาง มีแพนหาง ด้านข้างของหางไม่มีหนาม ลักษณะทั่วไปที่ต่างจากกุ้งกุลาดำ กุ้งกุลาลาย (green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus*) คือไม่มีแถบสีน้ำตาลเข้มพาดขวางลำตัวและเปลือกหัว หนวดคู่ที่หนึ่งมีแถบสีน้ำตาล หนวดคู่ที่สองสีน้ำตาลไม่มีแถบขวาง ขาเดินและขาว่ายน้ำมีสีเหลืองบางครั้งมีสีน้ำตาลหรือสีชมพู (Grey *et a*l., 1983) โดยมีลักษณะเด่นที่เป็นข้อบ่งชี้ทางอนุกรมวิธานดังนี้ (บุญศรี จารุธรรมโสภณ, 2537)

1. สันข้างกรี (androstral carina) ยาวไม่ถึงฟันกรีซี่สุดท้าย
2. สันหน้าหนามข้างแก้ม (gastro orbital carina) ยาวประมาณ 1/3 ระหว่างหนามข้างแก้ม (hepatic spine) กับขอบหลังตา (orbital margin)
3. maxilliped คู่ที่ 3 ของกุ้งเพศผู้ปล้องสุดท้าย (dactylus) ยาว

ประมาณครึ่งหนึ่งของปล้องถัดมา (propodus)

4. กลุ่มขนตรงปลายปล้อง propodus ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของปล้องสุดท้าย

5. แผ่นบนของอวัยวะเพศเมีย (anterior plate of thelycum) เป็นรูปครึ่งวงกลม มีติ่งเนื้อ (fleshy) เห็นชัดเจน

6. ขอบด้านข้างของแผ่นล่าง (margin of lateral plates or seminal receptacle) โค้ง

1.1.2 ลักษณะที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย

พบกุ้งแชบ๊วยมากบริเวณน้ำตื้นหรือปากอ่าวหรือปากแม่น้ำที่น้ำค่อนข้างขุ่นบางครั้งจะพบอยู่รวมกันเป็นจำนวนมากสามารถจับได้ด้วยประมงอวนลากหรือโป๊ะอวน พบลูกกุ้งระยะ post larva และ juvenile ได้ทั่วไปตามชายฝั่งทะเลตรงที่มีพื้นดินเลนหรือพื้นดินโคลนปนทราย โดยอาศัยอยู่ได้ตั้งแต่ชายฝั่งจนถึงทะเลลึก พบได้ทั้งในทะเลและเขตน้ำกร่อยที่มีความเค็มระหว่าง 10-36 ppt ส่วน pH ที่เหมาะสมประมาณ 7.8-8.5 อุณหภูมิ 25-32 °ซ ตัวเต็มวัยจะวางไข่ในทะเลที่มีความลึกประมาณ 10 เมตรขึ้นไป จากการสำรวจพบการกระจายของกุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตอินโดแปซิฟิกฝั่งตะวันตก (West-Indopacific coast) ตั้งแต่อ่าวเปอร์เซีย ชายฝั่งทะเลปากีสถาน อินเดีย มาเลเซีย ไทย ตอนใต้ของจีน อินโดนีเซีย ปาปัวนิวกินี ฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย (วิวัฒนชัย พรหมสาขา ณ สกลนคร และสมพร โล่สวัสดิ์กุล, 2532)

1.1.3 การสืบพันธุ์และการวางไข่

จากการเลี้ยงกุ้งในบ่อดินพบกุ้งเพศผู้สามารถสร้างน้ำเชื้อ (milt) ได้เมื่อมีอายุ 136 วันขึ้นไป โดยกุ้งเพศผู้สร้างน้ำเชื้อและปล่อยเข้าเก็บที่บริเวณหน้าอกในส่วนของธีไลกัม (thelycum) ของกุ้งเพศเมีย เมื่อกุ้งเพศเมียมีไข่แก่จะปล่อยไข่ออกมาผสมกับน้ำเชื้อเพศผู้และฟักเป็นตัว เจริญเติบโตภายนอกตัวกุ้ง กุ้งแชบ๊วยเจริญพันธุ์จะมีขนาดความยาวตั้งแต่ 14.5 เซนติเมตรขึ้นไป (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) กุ้งสามารถวางไข่ผสมพันธุ์ได้ทั้งปี เดือนที่พบกุ้งระยะที่มีไข่แก่ตามธรรมชาติมากที่สุดได้แก่ เดือนมกราคม มิถุนายน กันยายน และธันวาคม (เมธี วัฒนสิงห์, 2543)

1.1.4 ลักษณะและพฤติกรรมการกินอาหาร

กุ้งแชบ๊วยมีนิสัยการกินอาหารแบบกัดแทะโดยจับชิ้นอาหารแล้วว่ายน้ำกัดกินไปเรื่อย ๆ ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่ต่างจากกุ้งกุลาดำที่จับอาหารแล้วหยุดกัดกินอาหารนิ่งอยู่กับที่ กุ้งแชบ๊วยปราดเปรียวและว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลาแม้แต่เวลาที่กินอาหาร อาหารธรรมชาติของกุ้งแชบ๊วยได้แก่ ตัวอ่อนสัตว์น้ำ แมลงน้ำ ซากพืช ซากสัตว์ สาหร่ายชนิดต่าง ๆ หอย ปลา ลูกกุ้ง พืชน้ำ (เมธี วัฒนสิงห์, 2543)

รูปที่ 1 **กุ้งแชบ๊วย** (banana prawn, *Penaeus merguiensis*)

1.2 ระบบไคติโนไลติก

ไคตินเป็นสารโพลีเมอร์ที่พบมากในธรรมชาติ ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ N-acetyl glucosamine (NAG) เชื่อมด้วยพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic bond) เป็นเส้นตรงคล้ายกับเซลลูโลส (cellulose) แต่ต่างจากเซลลูโลสที่หมู่ hydroxyl ตำแหน่งที่ 2 ของคาร์บอนในกลูโคส (glucose) จะถูกแทนที่ด้วยหมู่อะซิติล (acetyl group) (รูปที่ 2)

ไคตินเป็นสารที่พบมากในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีเปลือกนอกแข็ง (exoskeleton) ได้แก่ สัตว์ในไฟลัมอาร์โธรโปดา (Phylum arthropoda) เช่น กุ้ง กั้ง ปู แมลง และสัตว์ในกลุ่มมอลลัสค์ (mollusc) เช่น หมึก หอยชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบในผนังเซลล์ของเชื้อรา เช่น *Penicilium chrysogenum* แบคทีเรีย และยีสต์ (Knorr, 1984)

รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลสและไคติน (Cabib, 1987)

ระบบไคติโนไลติกเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ ไคติเนส และ NAGase ระบบนี้อาจทำหน้าที่แตกต่างกันใน สิ่งมีชีวิตต่างชนิด บทบาทส่วนใหญ่ของระบบไคติโนไลติกคือการย่อยสลายไคตินซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็น NAG

รูปที่ 3 ขั้นตอนการย่อยสลายไคตินโดยเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์ NAGase (Brine, 1984)

1.3 **เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส** (N-Acetyl-glucosaminidase, NAGase)

เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส หรือไคโตไบเอส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของเอนไซม์ในระบบไคติโนไลติก โดยเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนสุดท้ายของการสลายไคตินซึ่งสลายไคโตไบโอสไปเป็น NAG 2 โมเลกุล (Shaikh and Deshpande, 1993)

เอนไซม์ NAGase ที่ไม่อยู่ในระบบไคติโนไลติกแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามรูปแบบการเร่งปฏิกิริยา คือเป็นชนิด endo-NAGase และ exo-NAGase โดย endo-NAGase ตัดสายโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ที่พันธะไกลโคซิดิกระหว่างโมเลกุลแบบสุ่ม ส่วน exo-NAGase ตัดสายโอลิโกแซคคาไรด์ที่พันธะไกลโคซิดิกจากปลายน้ำตาลที่ไม่รีดิวซ์ (non-reducing sugar) เข้ามาทีละหน่วยจนได้ผลผลิต เป็น NAG

ในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกใน *p*-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide (*p*NP-NAG) ของเอนไซม์ NAGase จาก *Serratia marcescen* พบว่า *p*NP-NAG ต้องมีหมู่อะซิติลตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 และปฏิกิริยาถูกยับยั้งได้ด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่มีหมู่อะซิติลในคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (Drouillard *et al*., 1997)

1.3.1 **แหล่งที่พบเอนไซม์** NAGase

เอนไซม์ NAGase พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งโปรคาริโอท (prokaryote) และยูคาริโอท (eukaryote) ได้แก่

1.3.1.1 **ในสัตว์**

พบเอนไซม์ NAGase ได้ในสัตว์ทั่ว ๆ ไป ได้แก่ สัตว์ในกลุ่ม annelida บางชนิด เช่น *Spirographis spallanzani* , *Allolobophora caliginosa* และ *Hirudo medicinalis* (Orlacchio *et al*., 1985) สัตว์ในกลุ่มโคพีพอด (copepod) บางชนิด เช่น *Temora longicornis* (Oosterhuis *et al*., 2000) ในกลุ่มหนอน (worm) เช่นหนอนไหม (silk worm, *Bombyx mori*) พบเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์ (hemolymph), อินทีกูเมนท์ (integument) ต่อมสร้างใยไหม (silk gland) (Kimura, 1977) และในลำไส้ของหนอนใบยาสูบ (*Manduca sexta*) (Zhu *et al*., 2001) และในทางเดินอาหารของแมงกะพรุน (jellyfish) (Nagai *et al*., 1997)

ในสัตว์กลุ่มแมลง พบเอนไซม์ NAGase ที่เมมเบรน (membrane) ของตัวอสุจิแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) และเพรียง (*Phallusia mammillata*) (Cattaneo *et al*., 2002; Godknecht and Honegger, 1991) ในอินทีกูเมนท์ของแมลงหวี่ (*Drosophila hydei*) และตั๊กแตน (*Locusta migratoria*) (Spindler, 1976; Zielkowski and Spindler, 1978) ในฮีโมลิมฟ์ของหอยทากน้ำจืด (freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*) (Zelck *et al*.,1996) รวมทั้งพบที่คอร์ติคอลกรานูล (cortical granule) ของไข่หอยเม่น (Wessel *et al*., 1987) และยังพบเอนไซม์นี้ในพิษของงูอัฟริกันพัฟฟ์ (African puff adder, *Bitis arietans*) (Nok *et al*., 2001)

ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนพบเอนไซม์ NAGase ในอิพิเดอร์มิส (epidermis) และตับ (hepatopancreas) ของปูฟิดเดลอร์ (fiddler crab, *Uca pugilator*) แมงดาทะเล (horseshoe crab) (Zou and Fingerman, 1999; Jain *et al*., 1977) แพลงก์ตอน (plankton) เช่น แอนตาร์คติคคริลล์ (Antarctic krill, *Euphausia superba*) (Peters *et al*., 1998) และ กุ้งนอร์ทเทิร์น (Northern shrimp, *Pandalus borealis*) (Esaiassen *et al*., 1992) พบเอนไซม์ในทางเดินอาหารของกุ้งมังกร (lobster, *Homarus americanus*) (Lynn, 1990) และกุ้งขาว (white shrimp, *Penaeus vannamei*) (Le Chevalier and Van Wormhoudt, 1998) กุ้งลายเสือ (kuruma prawn, *Penaeus japonicus*) (Koga *et al*., 1996) และ *Penaeus indicus* (Omondi and Stark, 1995) และยังพบเอนไซม์นี้ในคิวติเคิล (cuticle) ของกุ้งลายเสือ (Watanabe and Kono, 1997)

พบเอนไซม์นี้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ได้แก่ พบเอนไซม์ NAGase ในกระเพาะอาหารของปลาไหล (eel, *Anguilla anguilla*) (Deelder, 1978) ยังพบเอนไซม์นี้ในเลือดของปลาเรนโบว์ เทราท์ (*Salmo gairdneri*) (Lindsay, 1986) และปลาเทอร์บอท (*Scophthalmus maximus*) (Manson *et al*., 1992) และยังพบเอนไซม์ NAGase ในเนื้อเยื่อ lymphomyeloid ของปลาทะเล (Lundblad *et al*., 1979) คางคก (*Bufo arenarum*) (Martinez *et al*., 2000) ม้ามและตับของหนู (Dennis and Hart, 1994; Aronson *et al*., 1989) สมองของวัว (Overdijk *et al*., 1981) เป็นต้น

และจากการทดลองของ Hutchinson และคณะ (2002) พบว่าเอนไซม์ NAGase ไม่ได้ยึดติดกับ glycosylphosphatidyl inositol (GPI-anchor) ในเมมเบรนของตัวอสุจิคน และยังสามารถพบเอนไซม์นี้ในปัสสาวะของคนที่ถูกไฟไหม้ (Kang *et al*., 2001) ในเลือดของผู้ป่วยที่มีระดับ oxalate สูงในปัสสาวะ (Khan *et al*., 1989) ในสมอง ซีรัม และตับของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส (Costanzi *et al*., 1996; Sasaki *et al*., 1991; Hultberg *et al*., 1996) จากการทดลองของ Hultberg และ Isaksson (1983) และการทดลองของ Antoniello และคณะ (1989) ยังพบเอนไซม์นี้ในผู้ป่วยโรคตับ ตับอักเสบเฉียบพลันเนื่องจากแอลกอฮอล์ (alcohol) ผู้หญิงที่กำลังตั้งครรภ์ ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ผู้ป่วยที่มีทางเดินน้ำดีอุดตัน

1.3.1.2 ในจุลินทรีย์

เอนไซม์ NAGase พบในเชื้อรา *Phycomyces blakesteeanus* โดยพบอยู่ในไซโตพลาซึม (cytoplasm) ของ sporangiophore มากกว่าใน mycelium (Cohon, 1986) พบเอนไซม์นี้ในเชื้อราที่เป็นปรสิต (parasite) ของนีมาโทด (nematode) เช่น เชื้อรา *Verticillium chlamydosporium* และ *Verticillium suchlasporium* (Tikhonov *et al*., 2002) นอกจากนี้เอนไซม์ NAGase ยังพบใน filament ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (Omero *et al*., 2001) และในอาหารเหลวจากการเลี้ยงเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Havukkala *et al*., 1993)

1.3.1.3 ในพืช

การศึกษาเอนไซม์ไคติโนไลติกในพืชส่วนใหญ่เน้นศึกษาเฉพาะเอนไซม์ไคติเนส มีรายงานการศึกษาเอนไซม์ NAGase น้อยมากเนื่องจากส่วนประกอบในเซลล์พืชไม่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ แต่จากการศึกษาของ Choi และ Gross (1994) พบเอนไซม์ NAGase ในแอปเปิล (apple) พันธุ์ golden delicious และเมล็ดเรดิช (radish seed) โดยพบเอนไซม์นี้มากในใบเลี้ยง (cotyledon) ช่วงที่พืชกำลังงอก (Berger *et al*., 1995)

1.4 บทบาททางชีวภาพของเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ มีบทบาททางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่

1.4.1 บทบาทเกี่ยวกับการลอกคราบ

เอนไซม์ NAGase ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนสารพวกไคตินที่เป็นส่วนประกอบของเปลือกนอกที่แข็ง โดยย่อยสลายไคตินจากเปลือกนอกที่แข็งก่อนการลอกคราบ (molting) ให้อยู่ในรูป NAG แล้วมีการดูดกลับไปเก็บไว้ใน molting fluid สำหรับนำมาสร้างเปลือกใหม่ในครั้งต่อไปซึ่งการทำงานของเอนไซม์ถูกควบคุมโดยฮอร์โมน ecdysteroid (Flach *et al*., 1992)

บทบาทของเอนไซม์ NAGase ในแมลงชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์ในอินทีกูเมนท์ของตั๊กแตน *L. migratoria* และ แมลงหวี่ *D. hydei* โดยพบมีแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase สูงในช่วงสุดท้ายของการลอกคราบเพื่อเพิ่มขนาดของแมลง (Spindler, 1976; Zielkowski and Spindler, 1978) เช่นเดียวกับในต่อมสร้างใยไหมของหนอนไหมและในลำไส้ของหนอนใบยาสูบโดยพบเอนไซม์มีแอคทิวิทีสูงเพื่อช่วยในการลอกคราบ (Kimura, 1977; Zhu *et al*., 2001)

ในโคพีพอด *T. longicornis* มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการลอกคราบเพื่อเพิ่มขนาด (Oosterhuis *et al*., 2000) ทำนองเดียวกับการลอกคราบของปูฟิดเดลอร์, แอนตาร์คติคคริลล์ และกุ้งลายเสือ โดยพบเอนไซม์ในตับมากกว่าในอิพิเดอร์มิส (Zou and Fingerman, 1999; Peters *et al*., 1998; Watanabe and Kono, 1997)

1.4.2 บทบาทเกี่ยวกับการเจริญเติบโต

เอนไซม์กลูโคซิเดส (glucosidase) ทำหน้าที่ในการสลายคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกลูโคสเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต พบเอนไซม์ NAGase ในเชื้อราที่เป็นปรสิตของนีมาโทด เช่น *V. chlamydosporium* และ *V. suchlasporium* สามารถผลิตเอนไซม์ NAGase เพื่อทำลายผิวของนีมาโทดระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งสองชนิด (Tikhonov *et al*., 2002) เอนไซม์ NAGase ในตับของกุ้งขาวและกุ้งลายเสือ (Le Chevalier and Van Wormhoudt, 1998; Koga *et al*., 1996) และในทางเดินอาหารของกุ้งนอร์ทเทิร์น (Esaiassen *et al*., 1992) *P. indicus*

(Omondi and Stark, 1995) หรือของแมงกะพรุน (Nagai *et al*., 1997) ทำหน้าที่ย่อยสลายอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของกุ้งเหล่านี้ ส่วนในปลาไหล พบเอนไซม์ไคติเนสและ NAGase ในกระเพาะอาหารเพื่อย่อยสลายอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ (Deelder, 1978) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ NAGase มีแอคทิวิทีสูงในใบเลี้ยงของเมล็ดเรดิชช่วงกำลังงอก โดยเอนไซม์ย่อยสลายไกลโคโปรตีนที่เก็บสะสมเพื่อใช้ในการงอกของเมล็ดพืช (Berger *et al*., 1995)

1.4.3 บทบาทเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองจากศัตรูหรือเชื้อก่อโรค

เอนไซม์ไกลโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลายและควบคุม glycoconjugate เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค พบเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์ของทากน้ำจืดโดยจำเพาะกับน้ำตาลต่าง ๆ ได้แก่น้ำตาลแมนโนส (mannose), กลูโคส, ฟูโคส (fucose) และ NAG ซึ่งพบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ mycobacteria และยีสต์ โดยเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียไม่สามารถทำงานได้ (Zelck *et al*., 1996) เช่นเดียวกับที่พบเอนไซม์ไคติเนสและ NAGase ปริมาณสูงในเลือดของปลาเรนโบว์เทราท์และปลาเทอร์บอทที่มีการติดเชื้อ โดยเอนไซม์ NAGase ทำหน้าที่สลายไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Lindsay, 1986; Manson *et al*., 1992) รวมทั้งพบเอนไซม์นี้ในเนื้อเยื่อ lymphomyeloid ของปลาทะเลโดยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ตัวปลา (Lundblad *et al*., 1979)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบเอนไซม์ NAGase มีแอคทิวิทีสูงเมื่อต่อมน้ำนมของแกะมีการติดเชื้อ ซึ่งในน้ำนมปกติมีระดับของเอนไซม์ในปริมาณต่ำแต่เมื่อมีการติดเชื้อระดับของเอนไซม์มีปริมาณสูงขึ้น (Moroni and Cuccuru, 2001; Leitner *et a*l., 2001) และยังพบเอนไซม์ NAGase มีแอคทิวิทีสูงในปัสสาวะของผู้ป่วยที่ไตถูกทำลาย ซึ่งเอนไซม์นี้จำเพาะกับเชื้อโรคที่อยู่ในท่อไตโดยเอนไซม์มีปริมาณสูงเมื่อไตถูกทำลายมาก (Kang *et al*., 2001)

ส่วนในพืชพบเอนไซม์ NAGase มีแอคทิวิทีสูงในแอปเปิลชนิด golden delicious เมื่อแอปเปิลมีการติดเชื้อ (Choi and Gross, 1994)

1.4.4 บทบาทเกี่ยวกับการผสมพันธุ์

พบเอนไซม์ NAGase มากสุดในกลุ่มเอนไซม์กลูโคซิเดสในตัวอสุจิโดยพบอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์บริเวณส่วนหัวตัวอสุจิของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยจำเพาะกับน้ำตาลที่อยู่บนผิวของไข่ เช่นผิวด้านนอกของไข่แมลงหวี่ *D. melanogaster* ที่โตเต็มที่จะพบน้ำตาล β-NAcGlc และ α-Man เป็นตำแหน่งที่ตัวอสุจิเข้าผสมกับไข่ (Cattaneo *et al*., 2002) เช่นเดียวกับพบเอนไซม์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ของส่วนหัวอสุจิทำหน้าที่ช่วยจับหรือสลายชั้นเนื้อเยื่อของไข่ เพื่อช่วยในการผสมพันธุ์ของเพรียง (Godknecht and Honegger, 1991) คางคก (Martinez *et al*., 2000) และหนู (Miller *et al*., 1993) ในขณะที่ยังพบเอนไซม์นี้ในคอร์ทิคอลกรานูลของไข่หอยเม่นโดยเมื่อเกิดการผสมพันธุ์เอนไซม์จะถูกหลั่งออกมาจากกรานูล เพื่อไปจับกับ hyaline layer ของไข่ ซึ่งอาจทำหน้าที่เกี่ยวกับการป้องกันไข่ (Wessel *et al*., 1987) ส่วนเอนไซม์ NAGase ของคน ไม่ยึดติดกับเยื่อหุ้มเซลล์บริเวณ GPI anchor โดยพบว่าเอนไซม์ NAGase ถูกหลั่งมาจากเซลล์บริเวณผิวของอิพิดิไดมิส (epididymal epithelial cell) ปริมาณมากในทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศชายโดยเอนไซม์ที่กระจายอยู่ใน luminal fluid ต่างจากเอนไซม์ที่เมมเบรนของตัวอสุจิ ซึ่งเอนไซม์ NAGase ที่เมมเบรนอยู่ในภาวะที่เป็นกรด (Hutchinson *et al*., 2002)

1.5 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ NAGase

สามารถทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากเชื้อรา *P. blakesteeanus* ได้โดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) โครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography, DEAE-cellulose) ตามด้วยโครมาโทรกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน (gel filtration chromatography, Sephacryl S-200) (Cohon, 1986)

มีการแยกเอนไซม์ NAGase จากส่วนต่าง ๆ ของแอนตาร์คติคริลล์ โดยคอลัมน์ Q-Sepharose HP XK, phenyl Sepharose HP XK ตามด้วย concanavalin A-Sepharose (Con A-Sepharose) และ Sephadex G-200 (Peters *et al*., 1998) จากทางเดินอาหารของกุ้งมังกรแยกเอนไซม์ NAGase โดยคอลัมน์ Sephadex G-50, CM-

52 cellulose ตามด้วย DEAE-Sepharose และ HPLC TSK-G300SWG (Lynn, 1990) ในการแยกเอนไซม์ NAGase ออกจากตับของกุ้งนอร์ทเทิร์นใช้คอลัมน์ Q-Sepharose, Sephacryl S-200 HR และตามด้วย phenyl Sepharose (Esaiassen *et al*., 1992) และจากการทดลองของ Jain และคณะ (1977) แยกเอนไซม์ NAGase จากแมงดาทะเลโดยคอลัมน์ *p*-aminophenyl-thio-beta-L-fucopyranoside-Sepharose 4B ส่วนเอนไซม์ NAGase จากพิษของงูอัฟริกันพัฟฟ์แยกได้โดยคอลัมน์ Q-Sepharose ตามด้วย CM-cellulose และ N-acetyl-alpha-D-glucosamine-agarose (Nok *et al*., 2001)

ได้มีการทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ ได้แก่ จากม้ามของหนูโดยคอลัมน์ DEAE-cellulose, Con A-Sepharose, Phenyl-Sepharose ตามด้วย hydroxyl apatite และ Superose 12 (Dennis and Hart, 1994) ส่วนจากเซลล์ไข่ของหนูไชนิสแฮมสเตอร์ (Chinese hamster) แยกเอนไซม์ได้โดยคอลัมน์ Con A-Sepharose 4B ตามด้วย Poros 20-heparin และ aminooctyl-agarose (Zhao and Neufeld, 2000) จากการทดลองของ Overdijk และคณะ (1981) พบว่าสามารถทำบริสุทธิ์เอนไซม์ NAGase จากสมองของวัวโดยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, ตามด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-200 หรือ Sepharose 6B, Con A- Sepharose, phenyl และ octyl Sepharose และตามด้วย CM-Sephadex C-50, DEAE-Sephacel และ Sephadex G-25

จากรายงานเหล่านี้จะเห็นว่าการทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากแหล่งต่าง ๆ ทำได้ค่อนข้างยาก ต้องใช้คอลัมน์หลายขั้นตอน

1.6 สมบัติของเอนไซม์ NAGase

1.6.1 น้ำหนักโมเลกุล

เอนไซม์ NAGase มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันในช่วง 43,000-300,000 ดัลตัน (dalton) เช่นเอนไซม์จากเชื้อรา *P. blakesteeanus* และ *B. bassiana* มีน้ำหนักโมเลกุล 72,000 และ 45,000 ดัลตัน ตามลำดับ (Cohon, 1986; Havukkala *et al*., 1993)

ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ พบเอนไซม์ NAGase มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันได้แก่ เอนไซม์จากสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน เช่นจากกุ้งมังกร พบเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 116,000 ดัลตัน (Lynn, 1990) Zou และ Fingerman (1999) ศึกษาเอนไซม์ NAGase จากปูฟิดเดลอร์ในตับพบเอนไซม์ 2 isoform ขนาด 89,000 และ 45,000 ดัลตัน และจากอิพิเดอร์มิสพบเอนไซม์เพียง 1 isoform ขนาด 89,000 ดัลตัน เอนไซม์ NAGase B จากแอนตาร์คติคคริลล์มีน้ำหนักโมเลกุล 70,000, 120,000, 140,000, 160,000 และ 240,000 ดัลตัน ส่วน NAGase C มีน้ำหนักโมเลกุล 150,000 ดัลตัน (Peters *et al*., 1998) เอนไซม์ NAGase จากพิษของงูอัฟริกันพัฟฟ์มีขนาด 102,000 ดัลตันและประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (subunit) แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 51,000 ดัลตัน (Nok *et al*., 2001) เอนไซม์ NAGase จากอินทีกูเมนท์ของแมลงหวี่ *D. hydei* มีน้ำหนักโมเลกุล 100,000 ดัลตัน (Spindler, 1976)

ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ พบเอนไซม์ NAGase มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กันได้แก่ เอนไซม์ NAGase จากม้ามและตับของหนูมีขนาด 106,000 และ 43,000 ดัลตัน ตามลำดับ โดยเอนไซม์จากม้ามประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 54,000 ดัลตัน (Dennis and Hart, 1994; Aronson *et al*., 1989) เอนไซม์ NAGase จากส่วนต่าง ๆ ของคนได้แก่ ในรก สมอง และตับมีน้ำหนักโมเลกุล 190,000, 43,000 และ 300,000 ดัลตัน ตามลำดับ (Overdijk *et al*., 1981; Sasaki *et al*., 1991) ส่วนในเซลล์ไข่หนูไชนิสแฮมสเตอร์พบเอนไซม์มีขนาด 83,000 ดัลตัน (Zhao and Neufeld, 2000)

1.6.2 จลนศาสตร์ (Kinetic) ของเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase มีความจำเพาะกับสับสเตรทหลายชนิดและมีค่า K_m ต่อสับสเตรทแต่ละชนิดแตกต่างกัน พบว่าเอนไซม์ NAGase จากแต่ละแหล่งมีความจำเพาะกับสับสเตรทต่างกัน เอนไซม์ NAGase ที่มีความจำเพาะต่อ 4-methylum-belliferyl-N-acetyl-β-d-glucosaminide (MUFNAG) ได้แก่เอนไซม์จากตับและอิพิเดอร์มิสของปูฟิดเดลอร์ มีค่า K_m ต่อ MUFNAG เท่ากับ 0.19 ± 0.027 และ 0.203 ± 0.16 mM ตามลำดับ (Zou and Fingerman, 1999) และเอนไซม์ NAGase จากเซลล์ไข่ของคนมีค่า K_m เท่ากับ 0.22 mM (Zhao and Neufeld, 2000)

เอนไซม์ NAGase ที่มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl-β-N-acetyl glucosamine ได้แก่เอนไซม์จากเชื้อรา *P. blakesteeanus* มีค่า K_m เท่ากับ 0.3 mM (Cohon, 1986) จากอินทีกูเมนท์ของตั๊กแตน *L. migratoria* และแมลงหวี่ *D. hydei* มีค่า K_m เท่ากับ 5 และ 5.7 mM ตามลำดับ (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976) และจากตับคนมีค่า K_m เท่ากับ 0.13-0.20 mM (Sasaki *et al*., 1991)

เอนไซม์ NAGase ที่มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl-β-N-acetyl galactosaminide ได้แก่จากเชื้อรา *P. blakesteeanus* มีค่า K_m เท่ากับ 2.3 mM (Cohon, 1986) จากอินทีกูเมนท์ของตั๊กแตน *L. migratoria* และแมลงหวี่ *D. hydei* มีค่า K_m เท่ากับ 0.9 และ 3.6 mM ตามลำดับ (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976)

เอนไซม์ NAGase ที่มีความจำเพาะต่อ N,N′-diacetylchitobiose ได้แก่ เอนไซม์จากเชื้อรา *P. blakesteeanus* มีค่า K_m เท่ากับ 0.33 mM (Cohon, 1986)

1.6.3 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase

1.6.3.1 ผลของ pH

เอนไซม์ NAGase จากแหล่งต่าง ๆ ทำงานได้ดีและมีความเสถียรที่ pH เป็นกรดและเป็นกลาง เช่น จากเชื้อรา *P. blakesteeanus* และ *T. harzianum* พบเอนไซม์มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 5.0 และ pH 3.5 ตามลำดับ (Cohon, 1986; Deane *et al*., 1998) พบเอนไซม์ NAGase จากอินทีกูเมนท์ของตั๊กแตน *L. migratoria* มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 4-5 และเอนไซม์ NAGase จากแมลงหวี่ *D. hydei* ฮีโมลิมฟ์ของหอยทากน้ำจืด ตับและอิพิเดอร์มิสของปูฟิดเดลอร์ มีแอคทิวิทีสูงที่ pH 5.0-6.5 (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976; Zelck, 1996; Zou and Fingerman ,1999) ส่วนเอนไซม์จากตับของกุ้งนอร์ทเทิร์นพบมีแอคทิวิทีสูงที่ pH 4-6 (Esaiassen *et al*., 1992) และเอนไซม์ NAGase จากพิษงูอัฟริกันพัฟฟ์พบว่ามีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 5.5 (Nok *et al*., 2001) นอกจากนี้ในสมองของวัวพบเอนไซม์มีแอคทิวิทีสูงที่ pH 6-7 ส่วนเอนไซม์จากรกและตับของคนมีแอคทิวิทีสูงที่ pH 5-7 และ 4.5 ตามลำดับ (Overdijk *et al*., 1981; Sasaki *et al*., 1991)

1.6.3.2 ผลของอุณหภูมิ

เอนไซม์ NAGase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 40-70 °ซ เช่น จากเชื้อรา *T. harzianum* แมลงหวี่ *D. hydei* และในตับคนพบเอนไซม์มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ 50 °ซ (Deane *et al*., 1998; Spindler, 1976; Sasaki *et al*., 1991) จากอินทีกูเมนท์ของตั๊กแตน *L. migratoria* พบเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70 °ซ (Zielkowski and Spindler, 1978) เอนไซม์จากตับ อิพิเดอร์มิสในปูฟิดเดลอร์และในกุ้งนอร์ทเทิร์นมีแอคทิวิทีสูงที่อุณหภูมิในช่วง 50-60 °ซ (Zou and Fingerman, 1999; Esaiassen *et al*., 1992) นอกจากนี้ในพิษของงูอัฟริกันพัฟฟ์ พบเอนไซม์มีแอคทิวิทีสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 °ซ (Nok *et al*., 2001)

1.6.3.3 ผลของไดวาเลนท์แคทไอออนและสารประกอบบางชนิด

ไดวาเลนท์แคทไอออน (divalent cation) มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ NAGase จากการศึกษาเอนไซม์นี้จากสมองของคน พบว่าไดวาเลนท์ไอออนมีผลยับยั้งแอคทิวิทีของเอนไซม์ โดย Fe^{2+} มีผลยับยั้งแอคทิวิทีของเอนไซม์มากที่สุด รองลงมาเป็น Zn^{2+} และ Cu^{2+} ตามลำดับ (Overdijk *et al*., 1981) เช่นเดียวกับเอนไซม์ NAGase จากม้ามของหนูพบว่า 1 mM ของ Cu^{2+}, Hg^{2+}, Zn^{2+}และ Cd^{2+} มีผลยับยั้งแอคทิวิทีของเอนไซม์ แต่ที่ความเข้มข้น 1 mM ของ Mg^{2+}, Fe^{3+}, Ca^{2+}, Mn^{2+} และ Co^{2+} ไม่มีผลต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์ (Dennis and Hart, 1994) ในขณะที่ EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) ไม่มีผลต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase จากกุ้งมังกร (Lynn, 1990)

สารประกอบบางชนิดมีผลต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase จากการศึกษาเอนไซม์ NAGase ของเชื้อรา *P. blakesteeanus* พบว่า diacetylchitobiose สามารถยับยั้งแอคทิวิทีของเอนไซม์นี้ได้ (Cohon, 1986) ส่วนการศึกษาเอนไซม์ NAGase ของ annelida 3 ชนิด ได้แก่ *S. spallanzani*, *A. caliginosa* และ *H. medicinalis* พบว่า NAG และ N-acetyl galactosamine (NAcGal) เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์แบบแข่งขัน (competitive inhibitor) โดย NAG มีผลยับยั้งแอคทิวิทีของเอนไซม์มากกว่า NAcGal (Orlacchio *et al*., 1985) เอนไซม์ไคติเนสและ NAGase จากอินทีกูเมนท์ของแมลงหวี่ *D. hydei* ถูกยับยั้งโดย NAG ซึ่งเป็นผลผลิตของปฏิกิริยา

(Spindler, 1976) ขณะที่ Zielkowski และ Spindler (1978) ศึกษาเอนไซม์ไคติเนสและไคโตไบเอสจากตั๊กแตน *L. migratoria* พบว่า $HgCl_2$, $CuSO_4$ และ N-ethyl-maleinimide ที่ความเข้มข้นมากกว่า 1 mM ยับยั้งแอคทิวิทีของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด

ในหนูพบว่าเอนไซม์ NAGase จากม้ามไม่ถูกยับยั้งโดย NAG (Dennis and Hart, 1994) ต่างจากเอนไซม์นี้ในสมองของวัวซึ่งถูกยับยั้งแบบแข่งขันโดย 8 mM NAG แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย acetate และ NAcGal และยังพบว่าที่ 10 mM ของ dithiothreitol และ β-mercaptoethanol มีผลกระตุ้นแอคทิวิทีของเอนไซม์ (Overdijk *et al*., 1981) และจากการทดลองของ Zhao และ Neufeld (2000) พบว่าเอนไซม์ NAGase จากเซลล์ไข่ของคนถูกยับยั้งโดย 0.45 M 2-acetamido-1,2-dideoxynojirimycin และ 0.087 M 6-acetamido-6-deoxycastanospermine

1.7 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ NAGase

1.7.1 ประโยชน์ในงานวิจัย

ได้มีการนำเอนไซม์ NAGase ไปใช้ศึกษาชนิดและลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างไกลโคโปรตีน (glycoprotein) วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไกลโคโปรตีนบนผิวเซลล์ในระหว่างการเจริญเปลี่ยนแปลงของ diploid cell และใช้ศึกษาชนิดและลำดับของน้ำตาลที่จับกับโปรตีนในไกลโคโปรตีน รวมทั้งการกำจัดสายโซ่น้ำตาลเพื่อให้เอนไซม์เปปทิเดส (peptidase) เข้าย่อยสายโปรตีนหลัก ซึ่งการศึกษาเหล่านี้ในห้องปฏิบัติการนิยมใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดสหลายชนิดรวมทั้ง NAGase เข้าย่อยสลายสายโซ่น้ำตาลบนโปรตีนหลัก อาทิเช่น ผลงานวิจัยของ Tarentino และคณะ (1972) ศึกษาลำดับโครงสร้างน้ำตาลของโอวัลบูมิน (ovalbumin) โดยใช้เอนไซม์ endo-chitobiase เป็นตัวตัดน้ำตาล เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hutchinson และคณะ (2002) พบว่าเอนไซม์ NAGase ไม่ได้ยึดติดอยู่กับ GPI-anchor ที่เมมเบรนของตัวอสุจิคน ส่วนการศึกษาของ Cacan และ คณะ (1996) พบว่าเอนไซม์ไคโตไบเอสกระจาย อยู่ในไซโทซอล (cytosol) และมีแอคทิวิทีต่อ oligomannoside ที่หลั่งออกมาในช่วงที่เกิดการเติมน้ำตาล (N-glycosylation) การทำงานของเอนไซม์ NAGase ในการสลายไคตินขึ้นอยู่กับฮอร์โมนการลอกคราบ (molting hormone) ใน

ขณะที่มีการลอกคราบจะพบฮอร์โมนปริมาณมาก โดยฮอร์โมนจะไปกระตุ้นให้เอนไซม์ที่ใช้ในการลอกคราบทำงาน (Spindler, 1976) และจากการศึกษาของ Dennis และคณะ (1994) พบว่าเอนไซม์ NAGase เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการดึง NAG ออกจาก O-NAG ที่เชื่อมติดกับ serine หรือ threonine ของไกลโคโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม เมื่อเกิดกระบวนการการเติมน้ำตาล

1.7.2 ประโยชน์ในทางการแพทย์

ระดับของเอนไซม์ NAGase ที่เพิ่มสูงขึ้นในเลือดหรือในปัสสาวะสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคได้ เช่นใช้เอนไซม์ NAGase ในการตรวจสอบสัตว์ที่ติดเชื้อได้ จากการศึกษาของ Moroni และ Cuccuru (2001) พบเอนไซม์ NAGase มีแอคทิวิทีสูงเมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรียที่ต่อมน้ำนมของแกะสายพันธุ์ Sardinia (Sardinian breed ewe) เช่นเดียวกับของแกะ Israeli Assaf (Leitner *et al*., 2001) ยังใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้โรคของผู้ป่วยที่ไตถูกทำลาย เนื่องจากพบปริมาณของเอนไซม์ NAGase มากในปัสสาวะโดยปริมาณของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับท่อไตที่ถูกทำลาย (Kang *et al*., 2001) ในผู้ป่วยที่มี oxalate เพิ่มขึ้นในระบบทางเดินปัสสาวะจะพบปริมาณเอนไซม์ NAGase เพิ่มขึ้นด้วย (Khan *et al*., 1989) เอนไซม์ NAGase ยังเป็นตัวบ่งชี้โรคของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสในซีรัม (serum) ได้เนื่องจากพบเอนไซม์ในซีรัมสูงในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส (Costanzi *et al*., 1996) ส่วนในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับแข็ง ทางเดินน้ำดีอุดตัน ตับอักเสบเฉียบพลันจากแอลกอฮอล์ ผู้หญิงที่ตั้งครรภ์ และผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน พบมีปริมาณของเอนไซม์ NAGase เพิ่มสูงขึ้นในซีรัมเช่นเดียวกับหนูทดลองที่เป็นโรคตับแข็งเนื่องจาก CCl_4 (Antoniello *et al*., 1989; Hultberg and Isaksson, 1983) ในทำนองเดียวกัน Hultberg และคณะ (1996) พบว่าเอนไซม์ β-hexosaminidase A และ B ใช้เป็นตัวบ่งชี้โรค cerebrovascular ได้เนื่องจากพบปริมาณของเอนไซม์มากในซีรัมของผู้ป่วยโรคนี้ นอกจากนี้ยังใช้เอนไซม์ NAGase เป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็งเต้านม โดยพบเอนไซม์ NAGase มีแอคทิวิทีสูงในเนื้อเยื่อของผู้หญิงที่เริ่มเป็นมะเร็ง (Slawson *et al*., 2001)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกุ้งแชบ๊วย
2. เพื่อทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากซีรัมของกุ้งแชบ๊วย
3. เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์
4. เพื่อศึกษาบทบาทเบื้องต้นทางชีวภาพของเอนไซม์ NAGase