

4. สรุป

จากการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จากตับของกุ้งแชบ๊วยและศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ รวมทั้งการศึกษาผลของการฉีดเชื้อ *V. harveyi* และจุลินทรีย์อื่นๆ ที่มีต่อระดับแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในงานวิทยานิพนธ์นี้สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. ภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและในซีรัมคือใช้สับสเตรทลามินารินที่ความเข้มข้น 4 mg/ml 30 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาใน 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 60 °ซ นาน 20 นาที และใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณในช่วง 0-500 nmole เป็นกราฟมาตรฐาน
2. ทำให้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์จากสารสกัดตับที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 70% โดยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel ตามด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 และวิธี preparative PAGE ตามลำดับ แยกได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ 11, 151 และ 345 เท่า ของสารสกัดตับเริ่มต้น ตามลำดับ
3. เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ เมื่อย้อมค้อมาซิปลูใน nondenaturing PAGE และปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ เช่นเดียวกันใน SDS-PAGE เมื่อย้อมแบบซิลเวอร์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 58,200 คัดค้นและเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลโดยคอลัมน์ Superdex 200 HR-10/30 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 74,000 คัดค้น บ่งชี้ว่าเอนไซม์นี้ไม่มีหน่วยย่อย
4. เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์มีแอกทิวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 °ซ และที่ pH 5.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิจนถึง 60 °ซ รวมทั้งมีจลนศาสตร์แบบ hyperbola และมีค่า K_m สำหรับลามินารินเป็น 5 mg/ml และค่า V_{max} เป็น 0.625 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$
5. พบแอกทิวิตีจำเพาะของทั้งเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในตับและกระเพาะมีค่าสูงกว่าในกล้ามเนื้อและในซีรัม
6. จากการฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* แบบ inactive หรือด้วยเชื้อไม่ก่อโรคนกุ้งแชบ๊วย เช่น *E. coli*, *V. cholerae* และไวรัส WSSV พบระดับแอกทิวิตีจำเพาะของทั้งเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์และสารสกัดตับไม่แตกต่างจากกุ้งชุดควบคุม
7. ระดับแอกทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์และสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* แบบ active (5×10^9 เซลล์) มี

ค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 2.57 และ 1.97 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl ในทำนองเดียวกัน ระดับแอกทิวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์และสารสกัดตับของกุ้งแช่บ๊วยที่ติดเชื้อ *V. harveyi* มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 1.99 และ 1.5 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุม ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าระดับแอกทิวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ที่เพิ่มสูงขึ้นในฮีโมลิมฟ์และในตับ น่าจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแช่บ๊วย

8. เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะเครียดของกุ้งเพราะพบระดับแอกทิวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อกระตุ้นให้กุ้งแช่บ๊วยตกใจ