

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบันสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยมูลค่าปีละหลายหมื่นล้านบาท (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2546, 2548) ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) และสัตว์ที่มีเปลือกแข็ง โดยเฉพาะกุ้งเป็นสัตว์ที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงจนสามารถเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นได้แต่ก็มีปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยากคือการเกิดโรคติดเชื้อในกุ้ง โดยเฉพาะจากเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเมื่อกุ้งได้รับเชื้อชนิดนี้จะเกิดเป็นโรคเรืองแสง ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีกลไกการป้องกันตนเองเพื่อป้องกันการบุกรุกของจุลชีพ (microorganism) หรือ parasite ผ่านโปรตีนในพลาสมา (plasma protein) ในครัสเตเชียนมีโปรตีน 2 กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองนี้ กลุ่มแรกได้แก่ agglutinin หรือ เลคติน (lectin) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรต เช่น เบตา-1,3-กลูแคน (β -1,3-glucan) หรือ lipopolysaccharide (LPS) บนผนังเซลล์ของจุลชีพเพื่อกำจัดการบุกรุกของจุลชีพ โปรตีนอีกกลุ่มได้แก่ ระบบโปรฟีนอลออกซิเดส [prophenoloxidase (proPO) system] หรือระบบ proPO ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตนเองที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase, PO) นำไปสู่การสังเคราะห์เมลานิน เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคผ่าน phagocytosis ได้ สำหรับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส (β -1,3-glucanase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายเบตา-ดี-กลูแคน ในขณะที่เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส (N-acetyl glucosaminidase, NAGase) พบในระบบไคติโนไลติกซึ่งใช้ในการเจริญเติบโต เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้พบได้ทั่วไป ในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในพืชและสัตว์มีบทบาทในการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมและเชื้อก่อโรค โดยทำหน้าที่ย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ราหรือจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่บุกรุกและมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Truschel *et al.*, 1987)

กุ้งแชบ๊วยมีชื่อสามัญว่า banana shrimp มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus merguensis* และมีชื่อที่ใช้เรียกทั่วไปว่า กุ้งขาว กุ้งหางแดงหรือกุ้งหางดอก แชบ๊วยเป็นกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยเนื่องจากมีรสชาติดี เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ โดยเฉพาะญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกามีความต้องการกุ้งทะเลเพื่อการบริโภคในปริมาณมาก ลูกกุ้งแชบ๊วยมีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ดูแลอนุบาลง่ายและโตเร็วกว่าลูกกุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp, *Penaeus monodon*) ในช่วงต้นของการเลี้ยง (ศรีรัตน์ สอดสุขและพนม กระจ่างพนัน,

2541) แต่ลูกกุ้งแชบ๊วยที่เลี้ยงนานกว่า 2 เดือน จะมีอัตราการเจริญช้ำและมีอัตราการรอดตายต่ำกว่า กุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วยจึงเป็นที่นิยมในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่ากุ้งกุลาดำ (ชวัช ศรีวิระชัย และฐานันดร ทัดตานนท์, 2538) ปัจจุบันกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมได้ประสบปัญหาการขยายพื้นที่เลี้ยงได้น้อยลง พื้นที่เลี้ยงเดิมมีสภาพเสื่อมโทรมและมีปัญหาสำคัญจากการเกิดโรคระบาดที่ไม่สามารถควบคุมได้ เป็นเหตุให้ผลผลิตกุ้งกุลาดำได้ไม่ต่อเนื่องและส่งผลให้ผลผลิตกุ้งกุลาดำของประเทศไทยลดน้อยลงมาก รวมทั้งต้นทุนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำค่อนข้างสูงเพราะการผลิตกุ้งกุลาดำต้องอาศัยแม่พันธุ์จากธรรมชาติที่มีราคาสูงทำให้ลูกกุ้งมีราคาสูงตามไปด้วย กุ้งแชบ๊วยจึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเรื่องต้นทุนการผลิตลูกกุ้ง เพราะกุ้งแชบ๊วยสามารถเจริญพันธุ์ได้รวดเร็วและสามารถใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดินในการผลิตลูกกุ้งได้ (สุพจน์ จึงแยมปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) หากสามารถเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ได้ขนาดที่ต้องการแล้วจะพบว่ากุ้งแชบ๊วยมีราคาสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่มีขนาดเท่ากัน (เมธิ วัฒนสิงห์, 2543) อย่างไรก็ตามการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยยังต้องการหลักวิชาการที่ต่างจากกุ้งกุลาดำหลายประการ เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยมีพฤติกรรมการกินอาหารและนิสัยการว่ายน้ำต่างจากกุ้งกุลาดำ ปัจจุบันนักวิชาการและนักวิจัยจึงให้ความสนใจศึกษาและหาทางที่จะพัฒนาการเพาะฟักและพัฒนาการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ดียิ่งขึ้น

การศึกษาเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังยังมีการศึกษาน้อยมากโดยเฉพาะในครัสเตเชียนเช่น กุ้ง และบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งกลุ่มพีเนียด ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงสนใจศึกษาเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* เพื่อที่จะได้ทราบบทบาททางชีวภาพในกุ้งอันเป็นการเตรียมความพร้อมด้านข้อมูลและเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงต่อไปในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งแชบ๊วย

กุ้งแชบ๊วยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus merguensis* de Man มีชื่อสามัญว่า banana shrimp โดยมีลำดับอนุกรมวิธานรายงานไว้ดังนี้ (Grey *et al.*, 1983) และแสดงไว้ในรูปที่ 1

Phylum Arthropoda

Superclass Crustacea

Order Decapoda

Family Penaeidae

Genus Penaeus

1.1 ชีวิตวิทยาและลักษณะทั่วไป

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดปานกลาง ตัวโตเต็มวัยมีขนาดลำตัวยาว 10-25 เซนติเมตร น้ำหนักตัวประมาณ 50-400 กรัม ลำตัวมีสีขาวยอมปนเหลืองมีจุดสีน้ำตาล เขียวแก่ และเขียวอ่อนกระจายอยู่ เปลือกหุ้มลำตัวเรียบเป็นมันลักษณะเปลือกบาง เนื้อนุ่ม มีเปลือกหัวหรือกริส่วนบนเป็นรูปสามเหลี่ยม มีฟันทั้งด้านบนและด้านล่าง โดยฟันกริด้านบนมีประมาณ 7-8 ซี่ ด้านล่าง มี 5-6 ซี่ เปลือกคลุมหัวมีร่องตามยาวและร่องตามขวาง มีแพนหาง ด้านข้างของหางไม่มีหนาม ลักษณะทั่วไปที่ต่างจากกุ้งกุลาดำหรือกุ้งกุลาลาย (*green tiger prawn, Penaeus semisulcatus*) คือไม่มีแถบสีน้ำตาลเข้มพาดขวางลำตัวและเปลือกหัว หนวดคู่ที่หนึ่งมีแถบสีน้ำตาล หนวดคู่ที่สองสีน้ำตาลไม่มีแถบขวาง ขาเดินและขาว่ายน้ำมีสีเหลืองบางครั้งมีสีน้ำตาลหรือสีชมพู (Grey *et al.*, 1983) โดยมีลักษณะเด่นที่เป็นข้อบ่งชี้ทางอนุกรมวิธาน (บุญศรี จารุธรรม โสภณ, 2537) คือ สันข้างกริ (androstral carina) ยาวไม่ถึงฟันกริที่สุดท้าย สันหน้าหนามข้างแก้ม (gastro orbital carina) ยาวประมาณ 1/3 ระหว่างหนามข้างแก้ม (hepatic spine) กับขอบหลังตา (orbital margin) maxilliped คู่ที่ 3 ของกุ้งเพศผู้ปล้องสุดท้าย (dactylus) ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของปล้องถัดมา (propodus) กลุ่มขนตรงปลายปล้อง propodus ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของปล้องสุดท้าย แผ่นบนของอวัยวะเพศเมีย (anterior plate of thelycum) เป็นรูปครึ่งวงกลม มีติ่งเนื้อ (fleshy) เห็นชัดเจน และขอบด้านข้างของแผ่นล่าง (margin of lateral plates or seminal receptacle) โค้ง

1.2 การแพร่กระจายและพฤติกรรมการกินอาหาร

พบกุ้งแชบ๊วยมากบริเวณน้ำตื้น ปากอ่าวหรือปากแม่น้ำที่น้ำค่อนข้างขุ่นบางครั้งจะพบอยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก พบลูกกุ้งระยะ post larva และ juvenile ได้ทั่วไปตามชายฝั่งทะเลตรงที่มีพื้นดินเลนหรือพื้นดินโคลนปนทราย โดยอาศัยอยู่ตั้งแต่ชายฝั่งจนถึงทะเลลึก พบทั้งในทะเลและเขตน้ำกร่อยที่มีความเค็มระหว่าง 10-36 ppt ส่วน pH ที่เหมาะสมประมาณ 7.8-8.5 อุณหภูมิ 25-32 °C ตัวเต็มวัยจะวางไข่ในทะเลที่มีความลึกประมาณ 10 เมตรขึ้นไป การกระจายของกุ้งชนิดนี้อยู่ในเขตอินโดแปซิฟิกฝั่งตะวันตก (West-Indopacific coast) ตั้งแต่อ่าวเปอร์เซีย ชายฝั่งทะเลปากีสถาน อินเดีย มาเลเซีย ไทย ตอนใต้ของจีน อินโดนีเซีย ปาปัวนิวกินี ฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย (วิวัฒน์ชัย พรหมสาขา ณ สกลนคร และสมพร โล่สวัสดิ์กุล, 2532)

กุ้งแชบ๊วยมีนิสัยการกินอาหารแบบกัณฑ์โดยจับชิ้นอาหารแล้วว่ายน้ำ กัดกินไปเรื่อย ๆ ซึ่งเป็นพฤติกรรมที่ต่างจากกุ้งกุลาดำที่จับอาหารแล้วหยุดกัดกินอาหารนิ่งอยู่กับที่ กุ้งแชบ๊วยปราดเปรียวและว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลาแม้แต่เวลาที่กินอาหาร อาหารธรรมชาติของกุ้งแชบ๊วย ได้แก่ ตัวอ่อนสัตว์น้ำ แมลงน้ำ ซากพืช ซากสัตว์ สาหร่ายชนิดต่าง ๆ หอย ปลา ลูกกุ้ง ฟีชีน้ำ (เมธีวิวัฒน์สิงห์, 2543)

1.3 การสืบพันธุ์และการวางไข่

จากการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในบ่อดินพบกุ้งเพศผู้สร้างน้ำเชื้อ (milt) ได้เมื่อมีอายุ 136 วันขึ้นไป และปล่อยน้ำเชื้อเข้าเก็บที่บริเวณหน้าอกในส่วนของซีโลกัม (thelycum) ของกุ้งเพศเมีย เมื่อกุ้งเพศเมียมีไข่แก่จะปล่อยไข่ออกมาผสมกับน้ำเชื้อเพศผู้และฟักเป็นตัว เจริญเติบโตภายนอกตัว กุ้ง แชบ๊วยเจริญพันธุ์จะมีขนาดความยาวตั้งแต่ 14.5 เซนติเมตรขึ้นไป (สุพจน์ จิงเยี่ยมปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) กุ้งสามารถวางไข่ผสมพันธุ์ได้ทั้งปี เดือนที่พบกุ้งระยะที่มีไข่แก่ตามธรรมชาติมากที่สุดได้แก่ เดือนมกราคม มิถุนายน กันยายน และธันวาคม (เมธี วัฒนสิงห์, 2543)



รูปที่ 1 กุ้งแชบ๊วย (banana shrimp, *Penaeus merguensis*)

1.4 ระบบภูมิคุ้มกัน

ระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity system) และระบบภูมิคุ้มกันโดยสารน้ำ (humoral immunity system) ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์มักจะใช้เม็ดเลือดเป็นหลักในการต่อสู้สิ่งแปลกปลอมซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ การกลืนกิน (phagocytosis) การเกิดโนดูล (nodule formation) การห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) ระบบกระตุ้น proPO (proPO activating system) และการแข็งตัวของเลือด (จิริพร เรื่องศรี, 2546) ถ้าสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กและจำนวนน้อยจะถูกกำจัดโดยการกลืนกินซึ่งเป็นด่านแรกในการป้องกันเมื่อมีพาราไซต์หรือสิ่งแปลกปลอมบุกรุกผ่านชั้นผิวหนังเข้ามาสู่ร่างกาย วิธีในการกลืนกินเซลล์สิ่งแปลกปลอมจะมีการยื่นไซโทพลาซึม (cytoplasm) ไปล้อมสิ่งแปลกปลอมแล้ว lysosome จะหลั่งสารช่วยย่อยซึ่งมีทั้งสารต่อต้านแบคทีเรีย และ hydrolytic enzyme หลังการย่อยสลายแล้วก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายออกมาจากเซลล์ สำหรับการเกิดโนดูล จะเกิดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมจะเกิดกับสิ่งแปลกปลอมขนาดใหญ่ (เอ็ดมอนด์ อินทรพาด, 2545) เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากระบบ proPO ของครัสเตเชียน โดยถูกกระตุ้นโดย LPS, เปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) และเบตา-1,3-กลูแคนซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสจะออกซิไดซ์สารกลุ่มฟีนอลให้เป็นควิโนน (quinone) แล้วเปลี่ยนไปเป็นเมลานิน (melanin) โดยหน้าที่ของเมลานินจะช่วยยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของพวกเชื้อแบคทีเรียได้ (Knaap, 1993) การแข็งตัวของเลือดเกิดเมื่อเกิดบาดแผลเนื่องจากการถูกโจมตีจากศัตรูหรือเชื้อก่อโรคในขณะที่ลอกคราบ ดังนั้นเพื่อป้องกันการเสียเลือดสัตว์กลุ่มนี้จึงต้องมีกลไกที่มีประสิทธิภาพ

ส่วนระบบภูมิคุ้มกันโดยสารน้ำซึ่งมีกลไกต่าง ๆ ได้แก่ เลคติน สารประกอบต้านจุลชีพ (antimicrobial compound) และ reactive oxygen intermediates (ROIs)

เลคตินหรือ agglutinins เป็นโปรตีนหรือโกลโคโปรตีน ที่มีสมบัติในการจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะ หน้าที่สำคัญของเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันคือการกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการในระหว่างกระบวนการเจริญเติบโต (metamorphosis) และทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อต่าง ๆ (Takahashi *et al.*, 1996) จากการศึกษาของ Marcia และคณะ (2002) ถึงกลไกการเกาะกลุ่มของเซลล์ในฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) ของ *Litopenaeus schmitti* พบว่าเลคตินในฮีโมลิมฟ์มีความจำเพาะและสามารถจับกับ LPS บนเมมเบรนของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งได้ สารประกอบต้านจุลชีพเป็นโปรตีนที่ออกฤทธิ์ยับยั้งและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยเฉพาะพวกจุลินทรีย์ ส่วน ROIs ได้แก่อนุมูลของซูเปอร์ออกไซด์แอน

ไฮดรอกซิลไอออน (O_2^-) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลของไฮดรอกซิลไอออน (OH) ซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษกับเซลล์โดยไปยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคและทำลายโครงสร้างเซลล์ของสิ่งแปลกปลอมจากการทดลองในหอยสองฝา (molluscan) พบว่าปริมาณของ ROIs ที่ปล่อยจากเม็ดเลือดจะสัมพันธ์กับความเครียด การเกิดบาดแผลและการติดเชื้อซึ่งเป็นกลไกที่ป้องกันการฉวยโอกาสและลดการติดเชื้อโรค (Adema *et al.*, 1991)

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส (NAGase) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) โดยเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเบตา-1,3-กลูแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของจุลชีพ ส่วนเอนไซม์ NAGase พบในระบบไคตินไคติคเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนสุดท้ายของการสลายไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของจุลชีพเช่นกัน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองนี้น่าจะตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งเมื่อถูกรุกรานจากจุลชีพเพื่อเป็นการกำจัดจุลชีพโดยการไปย่อยสลายในส่วนของผนังเซลล์ที่เป็นส่วนเบตา-1,3- กลูแคนและส่วนของไคติน

2. เอนไซม์เบตา-1,3- กลูคาเนส

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส[(1->3)- β -D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.39) หรือ endo-(1->3)- β -D-glucanase หรือ 1,3- β -D-glucan-3-glucanohydrolase (EC 3.2.1.6)] จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลส มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก (β -1,3-glycosidic bond) แบบเบตา-1,3 ของสับสเตรท (substrate) ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ลามินาริน (laminarin จาก *Laminaria digitata*) พาโคแมน (pachyman จาก *Poria cocos*) กลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่พันธะไม่เป็นแบบเบตา-1,3 ได้ เช่น พัสทิวแลน (pustulan จาก *Umbilicaria pustulan*) ซึ่งมีพันธะไกลโคซิดิกเป็นแบบเบตา-1,6 หรือไลซินิน (licinin จาก *Cetraria islandica*) ที่มีพันธะเป็นแบบเบตา-1,4 เป็นต้น เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มด้วยกัน คือ เอนโดเบตา-1,3-กลูคาเนส (endo-1,3-glucanase) เอกโซเบตา-1,3-กลูคาเนส (exo-1,3-glucanase) และเบตา-กลูโคซิเดส (β -glucosidases) บางชนิด (Young and Pegg, 1981)

2.1 แหล่งที่พบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งโปรคาริโอต (prokaryote) และยูคาริโอต (eukaryote) ได้แก่

2.1.1 ในสัตว์

พบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสได้ในสัตว์ทะเล จำพวก หอย ฟองน้ำ ปลาฉลาม

(Zvyagintseva *et al.*, 1975) ในไข่หอยเม่นที่ยังไม่ผสมพันธุ์ (sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*) (Talbot and Vacquier, 1982) ในหนอนไม้สน (pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*) (Kikuchi *et al.*, 2005) ในหอยทะเลและหอยทาก (marine mollusk and terrestrial snail) (Sova *et al.*, 2003) และยังพบในหอยแครง (scallop, *Mizuhopecten yessoensis*)

2.1.2 ในพืช

พบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในน้ำยางพารา (*Hevea brasiliensis* latex) ในส่วน บี-ซีรัม (B-serum) (อากรณี สันตะโร, 2538) ใบอ่อนของข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) (Hrmova and Fincher, 1993) ในใบยาสูบ (*Nicotiana glutinosa*) (Brimacombe *et al.*, 1975) ใบอ่อนของถั่วเหลือง (soy bean) (Keen and Yoshikawa, 1983) รากของ *Picea abies* (Borja *et al.*, 1994) และใบถั่ว *Phaseolus vulgaris* (Mauch *et al.*, 1988)

2.1.3 ในยีสต์

พบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในเชื้อ *Candida albicans* 1001 (Molina *et al.*, 1989) ในเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (Mrsa *et al.*, 1993)

2.1.4 ในเชื้อรา

พบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *Trichoderma longibrachiatum* (Tangarone *et al.*, 1989) ในเชื้อรา *T. harzianum* (Lorito *et al.*, 1994) ในเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Brimacombe *et al.*, 1975)

2.1.5 ในแบคทีเรีย

พบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ได้ทำให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 (ปรานอม ศิวนันท์สกุล, 2541) จาก *B. circulans* IAM1165 (Aono *et al.*, 1992) จาก *Alkalophilic B. spp.* AG-430 ที่แยกได้จากดิน (Nogi and Horikoshi, 1990) จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* (Lioberas *et al.*, 1988) และจาก *Flavobacterium dormitator var. glucanolyticae* (Nagata *et al.*, 1990)

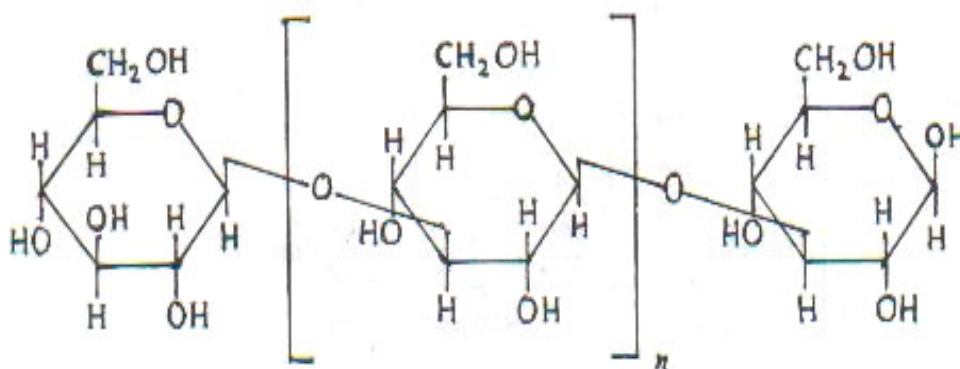
2.2 สมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

2.2.1 ลักษณะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

ลักษณะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส คือ เบตา-ดี-กลูแคนซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลเบตา-ดี-กลูโคส (D-glucose) ซึ่งมีพันธะไกลโคซิดิกเป็นแบบเบตา-1,3 และแบบเบตา-1,6 (Fleet and Phaff, 1974) เป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตั้งแต่ 2-6 โมเลกุล จัดเป็นน้ำตาลเชิงซ้อนหรือเรียกว่าโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) แต่ถ้าเกิน 25

โมเลกุลขึ้นไปจัดเป็นโพลีแซคคาไรด์ กลูแคนอาจเป็นพันธะแบบเดียวตลอดหรือต่างแบบกัน โครงสร้างและพันธะของโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นเบตา-1,3-ไกลโคซิดิก ได้แสดงในรูปที่ 2

เบตา-1,3-กลูแคนเป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ซึ่งพบในผนังเซลล์แบคทีเรีย รา (Rosenberger, 1976) สาหร่าย (Hamuro *et al.*, 1981; Reid and Porter, 1981) ส่วนผนังเซลล์ยีสต์มีส่วนประกอบหลักของโครงสร้างที่สำคัญคือเบตา-1,3- กลูแคนและมีบางส่วนเป็นเบตา-1,6- กลูแคนที่เชื่อมต่อกันไป (Manners *et al.*, 1973b)



รูป 2 โครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์ที่มีพันธะไกลโคซิดิกเป็นแบบเบตา-1,3
(Goodwin and Mercer, 1983)

2.2.2 ความจำเพาะต่อสับสเตรท

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายสับสเตรทที่เป็นเบตา-1,3-กลูแคน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบเบตา-1,3 ตัวอย่างการศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ได้แก่ พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ทำบริสุทธิ์จากใบอ่อนของข้าวบาเลย์ 3 ไอโซไซม์ คือ GI, GII และ GIII มีความจำเพาะในการย่อยสับสเตรทลามินาริน ซึ่งเป็นกลูแคนที่มีพันธะไกลโคซิดิกแบบเบตา-1,3 ต่อกันเป็นสายยาวและมีแขนงที่ต่อกันด้วยพันธะแบบเบตา-1,6 จำนวนน้อย ๆ แต่เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่มีหมู่แทนที่หรือแขนงจำนวนมาก ๆ ได้ เช่น กลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* (Hrmova and Fincher, 1993) เป็นต้น ทำนองเดียวกับการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เอนโดเบตา-1,3-กลูคาเนส จากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *F. glucanolytica* สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่เป็นเบตา-ดี-กลูแคน ตัวอย่างเช่น ลามินาริน กลูแคนจากยีสต์และพาโคแมนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็น

น้ำตาลกลูโคส ลามินาไรโบส (laminaribiose) และลามินาไรโตรอส (laminaritriose) (Nagata *et al.*, 1990) เอนไซม์เอนโดเบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ของใบและต้นมะเขือเทศ พบ 3 ไอโซไซม์ คือ GI, GII และ GIII มีความจำเพาะในการย่อยสลายสับสเตรทที่เป็นเบตา-1,3-กลูแคน ได้แก่ ลามินาริน พาไคแมนและซีเอ็ม-พาไคแมน แต่ไม่สามารถย่อยสลายลามินาไรแซคคาไรด์ที่เป็นเบตา-กลูแคนซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสต่อกัน 2-5 หน่วยหรือมีองศาของการเกิดโพลีเมอร์ (degree of polymerization, DP) 2-5 ได้ (Young and Pegg, 1981) ซึ่งต่างจากเอนโดเบตา-1,3-กลูคาเนสในพืชชนิดอื่น ๆ ที่สามารถย่อยสลายเบตา-กลูแคนที่มีน้ำตาลกลูโคสต่อกัน 3-4 หน่วยหรือมี DP 3-4 ได้ (Manners *et al.*, 1973a; Young and Pegg, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์เอกโซเบตา-1,3-กลูคาเนสที่ทำบริสุทธิ์จากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Verticillium albo-atrum* มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นเบตา-1,3-กลูแคนเท่านั้น ได้แก่ ลามินาริน พาไคแมน ซีเอ็ม-พาไคแมนและลามินาไรแซคคาไรด์ที่มี DP 3-5 (Young and Pegg, 1981)

2.2.3 สมบัติความเป็นไกลโคโปรตีน

จากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส 3 ไอโซไซม์ คือ GI, GII และ GIII จากใบอ่อนของข้าวบาร์เลย์พบว่าไอโซไซม์ GIII มีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน โดยที่มีปริมาณน้ำตาลอยู่ประมาณ 12-17 % (w/v) โดยวิธี phenol/H₂SO₄ assay คิดเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลประมาณ 20-30 โมล ต่อเอนไซม์ 1 โมล ส่วนเอนไซม์ GI และ GII ไม่มีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน (Hrmova and Fincher., 1993) ในขณะที่เอนไซม์เอกโซเบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ที่แยกได้จากยีสต์ *Candida utilis* พบว่ามีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนชนิดกรด มีค่า pI เท่ากับ 4.1 โดยที่มีส่วนประกอบเป็นน้ำตาลแมนโนสถึง 68 % จึงทำให้เอนไซม์สามารถจับแบบจำเพาะเจาะจงกับ Concanavalin A-Sepharose 4B ซึ่งเป็นเลคตินที่มีความจำเพาะเจาะจงกับน้ำตาลแมนโนสได้ (Notario *et al.*, 1986) และเช่นเดียวกับการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เอนโดเบตา-1,3-กลูคาเนส (EC 3.2.1.58) ที่ทำบริสุทธิ์จากเชื้อชนิดเดียวกันคือ *C. utilis* ก็มีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนชนิดกรดมีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบ (Notario *et al.*, 1986)

2.2.4 การจำแนกชนิดของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

รูปแบบการย่อยสับสเตรทโดยเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส สามารถนำมาใช้ในการจำแนกเอนไซม์ออกเป็น 2 ชนิด คือเอกโซเบตา-1,3-กลูคาเนส และเอนโดเบตา-1,3-กลูคาเนส ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะมีลักษณะการทำงานที่แตกต่างกัน ดังนี้

2.2.4.1 เอกโซเบตา-1,3-กลูคาเนส

เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะของ เบตา-1,3-กลูแคน โดยจะเริ่มย่อยสลาย

พันธะของหน่วยน้ำตาลที่อยู่นอกสุดในสายโพลีเมอร์ของกลูแคน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส และโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่าง ๆ สับสเตรทที่ตรวจสอบความเป็นเอกโซเบตา-1,3-กลูแคนเนส ได้แก่ *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside ซึ่งหลังจากเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์เอกโซเบตา-1,3-กลูแคนเนสจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสและสารประกอบ *p*-nitrophenol ซึ่งมีสีเมื่ออยู่ในสารละลายเบส เช่น ใน 0.3 M NaOH หรือ 0.3 M Na₂CO₃ และดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร

2.2.4.2 เอนโดเบตา-1,3-กลูแคนเนส

เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะของเบตา-1,3-กลูแคนแบบสุมภายในสายโพลีเมอร์ได้ผลิตภัณฑ์เป็น (1->3)- β -D-oligosaccharides ที่มี DP ต่าง ๆ กัน สับสเตรทที่ใช้ในการตรวจสอบความเป็นเอนโดเบตา-1,3-กลูแคนเนส ได้แก่ ลามินารินซึ่งเป็นกลูแคนที่มีพันธะแบบเบตา-1,3 ต่อแบบเบตา-1,6 ในอัตราส่วน 7:1 หรือพาไคแมนซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีพันธะเป็นเบตา-1,3 เพียงอย่างเดียว ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสและโอลิโกแซคคาไรด์อื่น ๆ เป็นต้น

การศึกษารูปแบบการย่อยของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูแคนเนส ทำได้โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยชนิดนี้กับสับสเตรทที่เป็นเบตา-1,3-กลูแคนซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ไปทำโครมาโทกราฟีแบบชั้นบาง (thin layer chromatography) โดยใช้แผ่นซิลิกาเจล (silica gel) หรือกระดาษ จากนั้นตรวจสอบชนิดของน้ำตาลโดยใช้สารละลายที่สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับน้ำตาลชนิดนั้น ๆ ได้ เช่น สารละลาย orcinol ใช้ในการตรวจสอบน้ำตาลรีดิวซ์ (reduce) หรือสารละลาย diphenylamine/aniline/phosphoric acid ซึ่งจะให้สีกับน้ำตาลแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยที่จะให้สีเทาอมฟ้า (blue gray) กับน้ำตาลอัลโดส (aldose) และจะให้สีแดง (light red) กับน้ำตาลคีโตส (ketose) เป็นต้น จากนั้นนำรูปแบบของน้ำตาลบนแผ่นซิลิกาเจลที่ได้มาตรวจสอบเพื่อจำแนกชนิดของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูแคนเนส ว่าเป็นแบบเอกโซหรือเอนโดเบตา-1,3-กลูแคนเนส หากเป็นเอกโซเบตา-1,3-กลูแคนเนส ผลิตภัณฑ์เริ่มต้น (initial product) ที่ได้จากปฏิกิริยาจะเป็นน้ำตาลกลูโคส แต่หากเป็นเอนโดเบตา-1,3-กลูแคนเนสจะได้น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มี DP ชนิดต่าง ๆ เป็นผลิตภัณฑ์เริ่มต้น (চারতিথ্য সক্রিয়, 2539)

2.2.5 น้ำหนักโมเลกุล

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูแคนเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จากสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ แหล่ง มีน้ำหนักโมเลกุลหลากหลาย เอนไซม์เบตา-1,3-กลูแคนเนสจากจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย ยีสต์ และรา มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 27 – 87 กิโลดัลตัน (kilodalton, kDa) เช่น เอนไซม์จากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่ามีขนาดเท่ากับ 29 kDa (Mrsa *et al.*, 1993) ในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *T. longibrachiatum* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70 kDa (Tangarone *et al.*, 1989) เอนไซม์เบตา-1,3-

กลูคาเนสบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *B. circulans* IAM1165 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเสริมด้วยพอลิแมน พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 87 kDa (Aono *et al.*, 1992)

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จากพืชพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไม่แตกต่างกันมากนักและในพืชส่วนใหญ่จะสามารถผลิตเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสได้หลายไอโซไซม์ (isozyme) เช่น จากใบอ่อนของถั่วเหลือง พบว่ามี 2 ไอโซไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 33 kDa (Keen and Yoshikawa, 1983) ในบี-ซีรัมของยางพารามี 2 ไอโซไซม์ คือ GI และ GII มีน้ำหนักโมเลกุล 31.6 และ 34.7 kDa ตามลำดับ (อาภรณ์ สันตะโร, 2538) เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในข้าวบาร์เลย์มีลักษณะเป็นโปรตีนสายเดี่ยวมี 3 ไอโซไซม์ มีน้ำหนักโมเลกุล 32 kDa (Hrmova and Fincher, 1993)

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จากสัตว์พบว่าน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 20- 70 kDa เช่น ในหอยสองฝา (marine bivalve, *Chlamys abbidus*) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 20 kDa ในหอยแครง (*M. yessoensis*) 36 kDa ในไข่หอยเม่น *S. purpuratus* เป็น 68 kDa (Talbot and Vacquier., 1982) และในไข่หอยเม่นชนิด *Lytechinus variegates* เป็น 70 kDa (Truschel Peeler, M. *et al.*, 1987) เป็นต้น

2.2.6 จลนศาสตร์ (Kinetic) ของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากแหล่งต่าง ๆ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกันและมีค่า K_m ที่แตกต่างกันไป เช่น ในยีสต์ (*Arthrobacter* spp.) เมื่อใช้สับสเตรท laminaritetraose, laminaripentaose, laminarihexaose, laminariheptaose และลามินาริน มีค่า K_m ดังนี้ 0.12, 0.11, 0.067, 0.066 mM และ 0.16 mg/ml ตามลำดับ (Pang *et al.*, 2004) ในเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* มีค่า K_m ต่อลามินารินเท่ากับ 0.3 mg/ml และเมื่อใช้ สับสเตรท curdlan 1.18 mg/ml (Fontaine *et al.*, 1997) ในแบคทีเรีย *B. subtilis* มีค่า K_m เท่ากับ 0.9 mg/ml ต่อลามินาริน (Leelasuphakul *et al.*, 2006) ในไข่หอยเม่นเมื่อใช้สับสเตรทลามินารินมีค่า K_m เท่ากับ 0.67 mg/ml (Talbot and Vacquier, 1982) ในหอย *M. yessoensis* เมื่อใช้สับสเตรทลามินารินมีค่า K_m เป็น 0.6 mg/ml (Kovalchuk *et al.*, 2006)

3. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

สามารถทำให้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์จากเชื้อรา *T. viride* ได้โดยการกรอง (Ultrafiltration) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography) DEAE-Sephadex, TSK- NH₂-60 (DEAE-5PW) และ Mono Q และตามด้วยคอลัมน์ Phenyl Superose (Kulminskaya *et al.*, 2001) จากยีสต์ *Arthrobacter* spp. สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยวิธี

การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) ตามด้วยคอลัมน์ DEAE Toyopearl 650M และ คอลัมน์ Sephacryl S-200 HR (Pang *et al.*, 2004) ซึ่งมีขั้นตอนคล้ายคลึงกับการทำบริสุทธิ์ในแบคทีเรีย *B. subtilis* คือเริ่มจากตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-200 (Leelasuphakul *et al.*, 2006) เพียงแค่ต่างกันที่ชนิดของคอลัมน์ที่ใช้แยก

ในการแยกเอนไซม์จากไขหอยเม่นใช้คอลัมน์ DEAE-Cellulose ตามด้วยโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography, Glucanolactone-Sepharose) และการแยกจากหอยแครง *M. yessoensis* โดยคอลัมน์ CM-Sephadex C-50, Phenyl-Sepharose ตามด้วย Sephadex G-75 และ CM-cellulose CM-52 (Kovalchuk *et al.*, 2006)

จากผลงานเหล่านี้จะเห็นได้ว่าการแยกเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสให้บริสุทธิ์จากแหล่งต่าง ๆ ทำได้ค่อนข้างยากและต้องใช้คอลัมน์หลายขั้นตอน

4. ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

4.1 ผลของ pH

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากแหล่งต่าง ๆ ทำงานได้ดีและมีความเสถียรที่ pH เป็นกรดและเป็นกลาง เช่น จากไขหอยเม่นมีแอกทิวิตีสูงสุดที่ pH 5.4 (Talbot and Vacquier, 1982) ในหอยแครง *M. yessoensis* มีแอกทิวิตีสูงสุดที่ pH 4.5 (Kovalchuk *et al.*, 2006) ในหนอนไม้สน *B. xylophilus* มีแอกทิวิตีสูงสุดที่ pH 4.9 (Kikuchi *et al.*, 2005) ในแบคทีเรีย *F. glucanolyticae* มีแอกทิวิตีสูงสุดที่ pH 5.5 (Nagata *et al.*, 1990) ในขณะที่แบคทีเรีย *B. circulans* IAM1165 มีแอกทิวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6.5 (Aono *et al.*, 1992) ในเชื้อรา *A. fumigatus* มีแอกทิวิตีสูงสุดที่ pH 7.0 (Fontaine *et al.*, 1997) และในบางแหล่งมีแอกทิวิตีสูงและเสถียรในช่วง pH กว้าง เช่น เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากแบคทีเรีย *B. subtilis* มีแอกทิวิตีสูงสุดในช่วง 6.5-9.5 (Leelasuphakul *et al.*, 2006) และในยีสต์ (*Arthrobaacter* spp.) มีแอกทิวิตีในช่วง 5-8 และแอกทิวิตีสูงสุดที่ 6.5 (Pang *et al.*, 2004)

4.2 ผลของอุณหภูมิ

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 45–70 °C เช่นจากหอยแครง *M. yessoensis* มีแอกทิวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 °C (Kovalchuk *et al.*, 2006) ในยีสต์ *Arthrobaacter* spp. มีแอกทิวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 °C (Pang *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *F. glucanolyticae* (Nagata *et al.*, 1990) เอนไซม์นี้ของหอยเม่นมีแอกทิวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 °C (Talbot and Vacquier, 1982) เช่นเดียวกับในเชื้อรา *A. fumigatus* (Fontaine *et al.*, 1997) ในหนอน

ไม้สนมีแอกทิวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 °ซ (Kikuchi *et al.*, 2005) และแบคทีเรีย *B. circulans* IAM1165 พบว่ามีแอกทิวิตีที่อุณหภูมิ 70 °ซ (Aono *et al.*, 1992)

5. บทบาททางชีวภาพของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

5.1 บทบาทเกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์

ในพืช เช่น ยาสูบพบการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่มีความเป็นเบสจำนวนมากในส่วนรากของต้นยาสูบที่มีความสมบูรณ์ (Memelink *et al.*, 1990) เช่นเดียวกับพบการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสขณะที่กำลังออกดอก (Neale *et al.*, 1990) และพบเอนไซม์เอนโดเบตา-1,3-กลูคาเนสในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของ *Nicotiana tabacum* L.cv Havana 425 ถูกควบคุมการสร้างด้วยฮอร์โมน (hormonal regulation) ส่วนเอนไซม์เอนโดเบตา-1,3-กลูคาเนสในลำต้นจะถูกควบคุมการสร้างเมื่อมีการเจริญเติบโตของพืช (Felix and Meins, 1986)

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการสร้างผนังเซลล์ในส่วนของเบตา-1,3-กลูแคนระหว่างที่เชื้อรากำลังเจริญเติบโต (Cabib *et al.*, 1988; Wessels, 1988) เอนไซม์เอนโดเบตา-1,3-กลูคาเนสมีบทบาทสำคัญในการยึดยาวออกของเส้นใยในส่วนฟิลาเมนต์ (filament) ของเชื้อรา *Coprinus cinereus* (Kamada *et al.*, 1985) ในยีสต์ *S. cerevisiae* การสร้างเอนไซม์เอนโดเบตา-1,3-กลูคาเนสมีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและควบคุมวงจรการสร้างเซลล์ (del Ray *et al.*, 1979; Jiang *et al.*, 1995) และยังพบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมีระดับแอกทิวิตีสูงขึ้นเมื่อมีการแตกหน่อ การขยายออกของเซลล์ การเข้าคู่กันและการสร้างสปอร์ ซึ่งสรุปได้ว่าระดับแอกทิวิตีของเอนไซม์นี้มีความจำเพาะในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของยีสต์ (del Ray *et al.*, 1979; Cenamor *et al.*, 1987)

ในสัตว์พบการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในส่วนของคอร์ทิคัลกรานูล (cortical granule) ของไข่มเยนระหว่างการพัฒนาพันธุ์ โดยมีการหลั่งเอนไซม์ออกมาโอบล้อมในส่วนช่องว่างระหว่างไข่และน้ำทะเล (Epel *et al.*, 1969) ซึ่งเป็นไปได้ว่ามีการหลั่งเอนไซม์ออกมาเพื่อทำลายส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อให้เกิดการเจริญเติบโตซึ่งคล้ายกับที่เกิดในผนังเซลล์ของเชื้อรา ในหอยเม่นบางสายพันธุ์พบการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสสูงในช่วงเริ่มเข้าสู่ตัวอ่อนและช่วงการเจริญของตัวอ่อนเพื่อทำหน้าที่ในการย่อยอาหารเพื่อใช้เป็นแหล่งของกลูโคส (Truschel *et al.*, 1986)

5.2 บทบาทเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองจากศัตรูหรือเชื้อก่อโรค

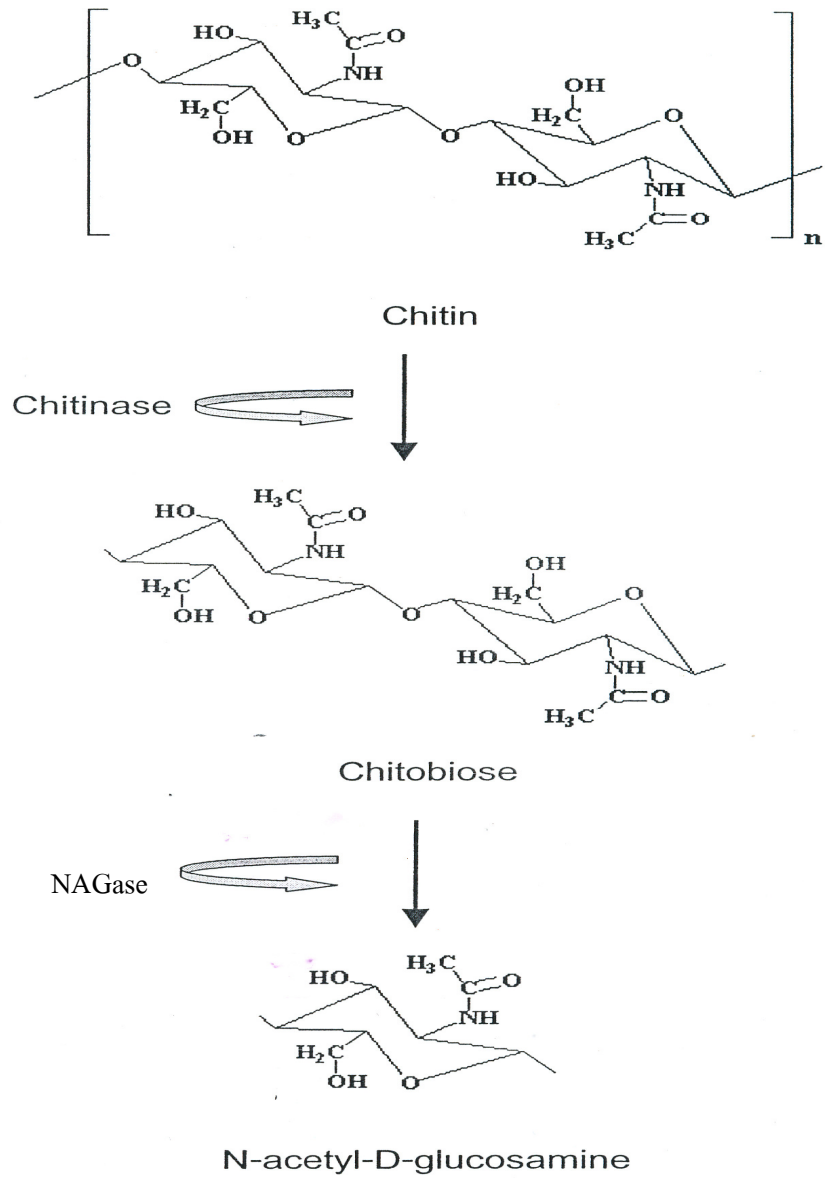
เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในพืชมีการศึกษาอย่างกว้างขวางเนื่องจากเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส จัดเป็น pathogenesis related protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเพื่อการป้องกัน

กันอันตรายให้แก่ต้นพืชและตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อก่อโรค สภาวะกดดันต่าง ๆ สารเคมี และฮอร์โมน โดยเอนไซม์สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย รา และจุลินทรีย์ในส่วนของเบตา-ดี-กลูแคน ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ (Kombrink, 1988) เอนไซม์เบตา-1,3-กลูแคนเนสที่แยกได้จากข้าวบาเลย์ที่เพิ่งงอกใหม่ มี 3 ไอโซไซม์ พบว่ามีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นขณะที่มีการติดเชื้อ การที่ดินข้าวบาร์เลย์เพิ่งงอกใหม่ ๆ มีการสร้างน้ำตาล กรดอะมิโน และสารชีวโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กชนิดต่าง ๆ สะสมไว้ในเอนโดสเปิร์ม (endospERM) ทำให้ง่ายต่อการถูกบุกรุกจากเชื้อก่อโรคมักทำให้ต้นข้าวอาจถูกทำลายได้ ดังนั้นการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูแคนเนสจึงเป็นหนทางหนึ่งในการป้องกันตัวเองจากการบุกรุกจากเชื้อก่อโรคต่าง ๆ และการที่พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูแคนเนสหลายไอโซไซม์ทำให้เอนไซม์มีความแตกต่างกันในด้านความจำเพาะต่อสับสเตรท รูปแบบการทำงาน และความสามารถในการย่อยสลายพันธะแบบเบตา-1,3 ต่อกับเบตา-1,6 ของกลูแคนชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นข้อดีของการมีหลายไอโซไซม์ที่จะช่วยยับยั้งการบุกรุกของเชื้อก่อโรคที่มีเบตา-1,3-กลูแคนชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ได้ (Wessels and Sietsma, 1987; Hrmova and Fincher, 1993) และจากการศึกษาในมะเขือเทศพบว่าเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) และเอนไซม์เบตา-1,3-กลูแคนเนสถูกกระตุ้นให้สร้างมากขึ้นหลังจากได้รับเชื้อ *Cladosporium fulvum* และเชื้อ *Fusarium oxysporum* ในมะเขือเทศพันธุ์ที่ต้านทานโรคมามากกว่าพันธุ์ที่ไม่ต้านทานโรค (Hrmova and Fincher, 1993)

ในสัตว์กลุ่มอาร์โทรพอด (arthropod) ที่ถูกกรุกรานจาก *Rhagium inquisito* พบว่าเอนไซม์เอนโดเบตา-1,3-กลูแคนเนสมีการทำงานร่วมกับเอนไซม์ลามินาริเนส (laminarinase) เพื่อยับยั้งการรุกราน (Brimacombe, 1975) และในไข่ม้วนเมื่อเกิดการผสมพันธุ์เอนไซม์เบตา-1,3-กลูแคนเนสจะหลั่งออกมาโอบล้อมผิววนอกไข่เพื่อเป็นการปกป้องไข่ไม่ให้ถูกทำลายจากจุลินทรีย์ (Epel *et al.*, 1969)

6. เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส (N-Acetyl glucosaminidase, NAGase)

เอนไซม์ NAGase หรือไคโตไบเอส (chitobiase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนสุดท้ายของการสลายไคติน (chitin) โดยสลายไคโตไบโอส (chitobiose) ไปเป็น N-Acetyl glucosamine (NAG) 2 โมเลกุล (Shaikh and Deshpande, 1993) ดังรูปที่ 3 เอนไซม์ NAGase แบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามรูปแบบการเร่งปฏิกิริยา คือเป็นชนิด endo-NAGase และ exo-NAGase โดย endo-NAGase ตัดสายโพลิไกลิโคแซคคาไรด์ที่พันธะไกลโคซิดิกระหว่างโมเลกุลแบบสุ่ม ส่วน exo-NAGase ตัดสายโพลิไกลิโคแซคคาไรด์ที่พันธะไกลโคซิดิกจากปลายน้ำตาลที่ไม่รีดิวิซ์ เข้ามาทีละหน่วยจนได้ผลผลิตเป็น NAG



รูปที่ 3 ขั้นตอนการย่อยสลายไคตินโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์
ไคตินเนสและเอนไซม์ NAGase
(Brine, 1984)

6.1 แหล่งที่พบเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต ได้แก่

6.1.1 ในสัตว์

พบเอนไซม์ NAGase ได้ในสัตว์ทั่ว ๆ ไป ได้แก่ สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียพบเอนไซม์ NAGase ในอีพิดERMมิส (epidermis) และตัวของปูฟิดเดิลอร์ (fiddler crab, *Uca pugilator*) แมงดาทะเล (horseshoe crab) (Zou and Fingerman, 1999; Jain *et al.*, 1977) และกุ้งนอร์เทิร์น (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) และยังพบเอนไซม์นี้ในคิวติเคิล (cuticle) ของกุ้งลายเสือ (kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*) (Watanabe and Kono, 1997)

ในสัตว์มีกระดูกสันพบเอนไซม์ NAGase ในเลือดของปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout, *Salmo gairdneri*) (Lindsay, 1986) ปลาเทอร์บอท (turbot, *Scophthalmus maximus*) (Manson *et al.*, 1992) และกระเพาะอาหารของปลาไหล (eel, *Anguilla anguilla*) (Deelder, 1978) ม้ามและตับของหนู (Dennis and Hart, 1994; Aronson *et al.*, 1989) และจากการทดลองของ Hultberg และ Isaksson (1983) และการทดลองของ Antoniello และคณะ (1989) ยังพบเอนไซม์นี้ในผู้ป่วยโรคตับ ตับอักเสบเฉียบพลันเนื่องจากแอลกอฮอล์ (alcohol) ผู้หญิงที่กำลังตั้งครรภ์ ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ผู้ป่วยที่มีทางเดินน้ำดีอุดตัน

6.1.2 ในพืช

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

6.1.3 ในจุลินทรีย์

พบเอนไซม์ NAGase ในเชื้อรา *Phycomyces blakeslecanus* โดยพบอยู่ในไซโตพลาซึม (cytoplasm) ของ sporangiophore มากกว่าในไมซีเลียม (Cohon, 1986) นอกจากนี้เอนไซม์ NAGase ยังพบในฟิลาเมนต์ของเชื้อรา *T. harzianum* (Omero *et al.*, 2001) และในอาหารเห็ดจากการเลี้ยงเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Havukkala *et al.*, 1993)

6.2 สมบัติของเอนไซม์ NAGase

6.2.1 น้ำหนักโมเลกุล

เอนไซม์ NAGase มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันในช่วง 43-300 kDa เช่นเอนไซม์จากเชื้อรา *Phycomyces blakeslecanus* และ *B. bassiana* มีน้ำหนักโมเลกุล 72 และ 45 kDa ตามลำดับ (Cohon, 1986; Havukkala *et al.*, 1993) โดยในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ พบเอนไซม์ NAGase มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ได้แก่ เอนไซม์จากสัตว์ในกลุ่มครึ่งเตี๊ยน เช่นจากกุ้งมังกร พบเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 116 kDa (Lynn, 1990) Zou และ Fingerman (1999) ศึกษาเอนไซม์ NAGase ในอพิเตอร์มิสของปูฟัดเดอร์พบเอนไซม์เพียง 1 ไอโซฟอร์ม (isoform) ขนาด 89 kDa ส่วนในตับพบเอนไซม์ 2 ไอโซฟอร์มขนาด 89 และ 45 kDa เอนไซม์ NAGase จากอินทีกูเมนต์ (integument) ของแมลงหวี *Drosophila hydei* มีน้ำหนักโมเลกุล 100 kDa (Spindler, 1976)

6.2.2 จลนศาสตร์ของเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase จากแต่ละแหล่งมีความจำเพาะกับสับสเตรตต่างกัน เอนไซม์ NAGase จากตับและอพิเตอร์มิสของปูฟัดเดอร์มีความจำเพาะต่อ 4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -d-glucosaminide (MUFNAG) โดยมีค่า K_m ต่อ MUFNAG เท่ากับ 0.19 ± 0.027 mM และ 0.203 ± 0.16 mM ตามลำดับ (Zou and Fingerman, 1999) และเอนไซม์ NAGase จากเซลล์ไขของคนมีค่า K_m เท่ากับ 0.22 mM (Zhao and Neufeld, 2000)

เอนไซม์ NAGase จากเชื้อรา *P. blakeslecanus* มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl- β -N-acetyl galactosaminide มีค่า K_m เท่ากับ 2.3 mM (Cohon, 1986) จากอินทีกูเมนต์ของตั๊กแตน *Locusta migratoria* และแมลงหวี *D. hydei* มีค่า K_m เท่ากับ 0.9 และ 3.6 mM ตามลำดับ (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976)

6.2.3 ผลของ pH ต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase จากแหล่งต่าง ๆ ทำงานได้ดีและมีความเสถียรที่ pH เป็นกรดและเป็นกลาง เช่น เอนไซม์ NAGase จากอินทีกูเมนต์ของตั๊กแตน *L. migratoria* มีแอกทิวิตีสูงสุดที่ pH 4-5 เอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟของหอยทากน้ำจืด ในตับและอพิเตอร์มิสของปูฟัดเดอร์มีแอกทิวิตีสูงที่ pH 5.0-6.5 (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976; Zelck, 1999; Zou and Fingerman, 1999) เอนไซม์จากพืชมูอัฟริกัณฑ์พบว่ามีแอกทิวิตีสูงสุดที่ pH 5.5 (Nok *et al.*, 2001) ส่วนเอนไซม์ NAGase จากตับของกุ้งนอร์เทิร์นพบมีแอกทิวิตีสูงที่ pH 4-6 (Esaiassen *et al.*, 1992) นอกจากนี้ในสมองของวัวพบเอนไซม์นี้มีแอกทิวิตีสูงที่ pH 6-7

6.2.4 ผลของอุณหภูมิต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 40-70 °C เช่น ในตับคนพบ

เอนไซม์มีแอกทิวิตีที่สูงสุดที่ 50 °C (Sasaki *et al.*, 1991) จากอินทิมูเมนท์ของตั๊กแตน *L. migratoria* พบเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70 °C (Zielkowski and Spindler, 1978) เอนไซม์จากพืชของงูอัฟริกันพัพพ์ พบเอนไซม์มีแอกทิวิตีที่สูงสุดที่อุณหภูมิ 40 °C (Nok *et al.*, 2001) ส่วนในคืบและอิพิเดอร์มิสของปูฟีดเดลเลอร์และในกิ้งก่าเทอร์เรียมมีแอกทิวิตีสูงที่อุณหภูมิในช่วง 50-60 °C (Zou and Fingerman, 1999; Esaiassen *et al.*, 1992)

7. บทบาททางชีวภาพของเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ มีบทบาททางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่

7.1 บทบาทเกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการผสมพันธุ์

พบเอนไซม์ในคืบของกิ้งก่าและกิ้งก่าลายเสื้อ (Le Chevalier and Van Wormhoudt, 1998; Koga *et al.*, 1996) และในทางเดินอาหารของกิ้งก่าเทอร์เรียม (Esaiassen *et al.*, 1992) ทำหน้าที่ย่อยสลายอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของกิ้งก่าเหล่านี้ ส่วนในปลาไหล พบเอนไซม์ไคตินเนสและ NAGase ในกระเพาะอาหารเพื่อย่อยสลายอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ (Deelder, 1978)

พบเอนไซม์ NAGase มากสุดในกลุ่มเอนไซม์กลูโคซิเดส (glucosidase) บริเวณส่วนหัวตัวต่อสุจิของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยจำเพาะกับน้ำตาลที่อยู่บนผิวของไข่ เช่นผิวด้านนอกของไข่แมลงหวี่ *D. melanogaster* ที่โตเต็มที่จะพบน้ำตาล β -NAG และ α -mannose เป็นตำแหน่งที่ตัวต่อสุจิเข้าผสมกับไข่ (Cattaneo *et al.*, 2002) ในขณะที่ยังพบเอนไซม์นี้ในคอร์ทิกอลกรานูลของไข่ออยเม่นโดยเมื่อเกิดการผสมพันธุ์ เอนไซม์จะถูกหลั่งออกมาจากกรานูลเพื่อไปจับกับ hyaline layer ของไข่ซึ่งอาจทำหน้าที่เกี่ยวกับการป้องกันไข่ (Wessel *et al.*, 1987)

7.2 บทบาทเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองจากศัตรูหรือเชื้อก่อโรค

เอนไซม์ไกลโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลายและควบคุม glycoconjugate เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค โดยเอนไซม์สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียไม่สามารถทำงานได้ (Zelck, 1999) เช่นเดียวกับที่พบเอนไซม์ไคตินเนสและ NAGase ปริมาณสูงในเลือดของปลาเรนโบว์เทราท์และปลาเทอร์บอทที่มีการติดเชื้อ โดยเอนไซม์ NAGase ทำหน้าที่สลายไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Lindsay, 1986; Manson *et al.*, 1992)

8. ประโยชน์ของเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase ถูกนำไปใช้ศึกษาชนิดและลำดับของน้ำตาลที่จับกับโปรตีนในไกลโคโปรตีน รวมทั้งการกำจัดสายโซ่น้ำตาลเพื่อให้เอนไซม์เปปติเดส (peptidase) เข้าย่อยสายโปรตีนหลัก ซึ่งการศึกษาเหล่านี้ในห้องปฏิบัติการนิยมใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดสหลายชนิดรวมทั้ง NAGase เข้าย่อยสายสายโซ่น้ำตาลบนโปรตีนหลัก อาทิเช่น ผลงานวิจัยของ Tarentino และคณะ (1972) ศึกษาลำดับโครงสร้างน้ำตาลของโอวัลบูมิน (ovalbumin) โดยใช้เอนไซม์ endo-NAGase เป็นตัวตัดน้ำตาล การทำงานของเอนไซม์ NAGase ในการสลายโคตินขึ้นอยู่กับฮอร์โมนลอกคราบ (molting hormone) ในขณะที่มีการลอกคราบจะพบฮอร์โมนปริมาณมาก โดยฮอร์โมนจะไปกระตุ้นให้เอนไซม์ที่ใช้ในการลอกคราบทำงาน (Spindler, 1976) และจากการศึกษาของ Dennis และ Hart (1994) พบว่าเอนไซม์ NAGase เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการดึง NAG ออกจาก O-NAG ที่เชื่อมติดกับ serine หรือ threonine ของไกลโคโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียสและไซโตพลาซึม เมื่อเกิดกระบวนการการเติมน้ำตาล

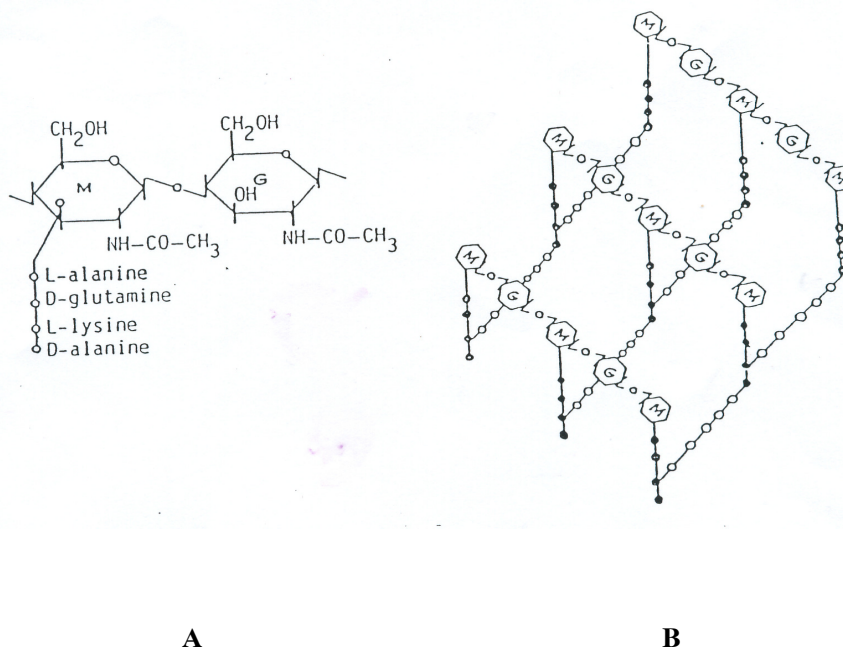
ในทางการแพทย์ระดับของเอนไซม์ NAGase ที่เพิ่มสูงขึ้นในเลือดหรือในปัสสาวะสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคได้ เช่นใช้เอนไซม์ NAGase ในการตรวจสอบสัตว์ที่ติดเชื้อจากการศึกษาของ Moroni และ Cuccuru (2001) พบเอนไซม์ NAGase มีแอกทิวิตีสูงเมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรียที่ต่อมน้ำนมของแกะสายพันธุ์ Sardinia (Sardinian breed ewe) เช่นเดียวกับของแกะ Israeli Assaf (Leitner *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบปริมาณของเอนไซม์ NAGase มากในปัสสาวะของผู้ป่วยที่ท่อไตถูกทำลายโดยปริมาณของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับท่อไตที่ถูกทำลาย จึงใช้เอนไซม์ NAGase เป็นตัวบ่งชี้โรคของผู้ป่วยที่ไตถูกทำลาย (Kang *et al.*, 2001) เอนไซม์ NAGase ยังเป็นตัวบ่งชี้โรคของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสในซีรัม (serum) ได้ เนื่องจากพบเอนไซม์ในซีรัมสูงในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส (Costanzi *et al.*, 1996) ส่วนในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับแข็ง ทางเดินน้ำดีอุดตัน ตับอักเสบเฉียบพลันจากแอลกอฮอล์ ผู้หญิงที่ตั้งครรภ์ และผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน พบมีปริมาณของเอนไซม์ NAGase เพิ่มขึ้นในซีรัมเช่นเดียวกับหนูทดลองที่เป็นโรคตับแข็งเนื่องจาก CCl_4 (Antoniello *et al.*, 1989; Hultberg and Isaksson, 1983) ในทำนองเดียวกันยังใช้เอนไซม์ NAGase เป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็งเต้านม โดยพบเอนไซม์ NAGase มีแอกทิวิตีสูงในเนื้อเยื่อของผู้หญิงที่เริ่มเป็นมะเร็ง (Slawson *et al.*, 2001)

9. แบคทีเรีย *Vibrio harveyi*

แบคทีเรีย *V. harveyi* ที่พบในประเทศไทยเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (มณฑลเชียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) และในลูกกุ้งแชบ๊วย (คารุณี แซ่ฮ่วย และคณะ, 2530) เชื้อชนิดนี้ยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งกุลาดำในโรงเพาะฟักในประเทศฟิลิปปินส์ (Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990) และได้หวัน (Chen *et al.*, 1992) โดยเชื้อ *V. harveyi* ก่อให้เกิดความเสียหายต่อลูกกุ้ง penaeid ในโรงเพาะฟักในระยะตัวอ่อน (larvae) หลังตัวอ่อน (postlarvae) (Lightner, 1988) และในกุ้งขนาดใหญ่ที่เลี้ยงอยู่ในบ่อเลี้ยง (Nash *et al.*, 1992; Jiravanichpaisal and Miyazaki, 1994) จากการทดลองของ Le Groumellec และคณะ (1995) ซึ่งทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากลูกกุ้ง penaeid ในโรงเพาะฟักที่เลี้ยงในประเทศไทยและประเทศเอกวาดอร์ พบว่าเป็นเชื้อ *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการตายจำนวนมากของลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก โดยพบว่าเชื้อ *V. harveyi* ที่พบในประเทศไทยเป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงมากกว่าที่พบในประเทศเอกวาดอร์ และยังตรวจพบเชื้อ *V. harveyi* ในน้ำที่ใช้เลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างหนาแน่น (Ruangpan *et al.*, 1995)

แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของกุ้งในระดับตั้งแต่ก่อนข้างมากจนถึงระดับตาย 100 เปอร์เซ็นต์ (Lightner, 1988) เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกมาจากกุ้งที่เป็นโรคมักจะพบเชื้อสกุล *Vibrio* หลายชนิดเช่น *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus*, *V. vulnificus*, *V. damsela* และ *V. harveyi* (Lavilla-Pitogo, 1990) จากการศึกษาของ คารุณี แซ่ฮ่วย และคณะ (2530) ถึงสาเหตุการตายของลูกกุ้งแชบ๊วยในโรงเพาะฟัก พบว่าการตายของลูกกุ้งมักจะเกิดขึ้นทุกครั้งเมื่อสังเกตเห็นการเรืองแสงช่วงกลางคืนในน้ำทะเลและพบอยู่ตามซากลูกกุ้งและลูกกุ้งที่มีชีวิต หลังจากทำการแยกเชื้อจากลูกกุ้งแชบ๊วยที่ตายพบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อ *V. harveyi* โดย มณฑลเชียร ส่งเสริม และคณะ (2533) พบว่าอาการที่เกิดจากการติดเชื้อ *V. harveyi* คือในระยะแรก ๆ ลูกกุ้งจะมีการเคลื่อนไหวช้าลงลำตัวสีขาวขุ่น ต่อมากุ้งจะเบื่ออาหารและตาย

เชื้อ *V. harveyi* เป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* โดยอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน เติบโตได้ทั้งในสภาพที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน บางพวกต้องการเกลือหรือเกลือมีส่วนช่วยกระตุ้นการเติบโต ผนังเซลล์ (cell wall) ของแบคทีเรียโดยทั่วไป เป็นโครงสร้างส่วนที่อยู่ใต้แคปซูล (capsule) หรือชั้นเมือก และอยู่นอกเยื่อหุ้มเซลล์ (cell plasma membrane) ผนังเซลล์เป็นส่วนประกอบ 20 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ ประกอบด้วยเปปไทด์ (peptide) โพลีแซคคาไรด์ และลิพิด (lipid) ซึ่งมีองค์ประกอบย่อยแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ผนังเซลล์เป็นส่วนที่มีความแข็งแรงเนื่องจากมีโครงสร้างซึ่งเป็นโพลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หรือไกลแคน (glycan) และเปปไทด์ต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ซึ่งมีชื่อเรียกว่าเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 โครงสร้างของเปปทิโดไกลแคน

M = N-Acetyl muramic acid (NAM, M), G = NAG

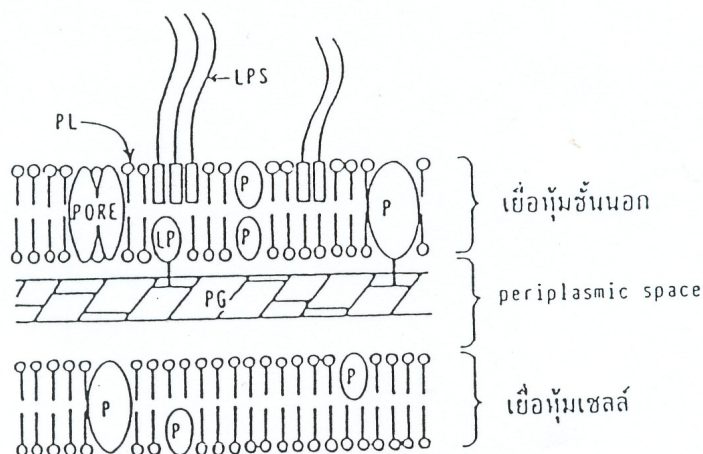
A = แสดงหน่วยซ้ำๆของ NAM, NAG และเทตระเปปไทด์

B = แสดงการเชื่อมต่อทางขวางระหว่างเปปทิโดไกลแคนสายที่อยู่ใกล้เคียงกัน
(สุวณี สุภเวชย์, 2536)

เปปทิโดไกลแคนเป็นโพลิเมอร์ขนาดใหญ่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นแกนกลาง (back bone) หรือสายไกลแคน (glycan strand) เป็นโพลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์สองชนิดคือ NAG (G) และ N-acetylmuramic acid (NAM, M) ต่อกันด้วยพันธะ β (1-4) ไกลโคซิดิกสลับกันตลอดสาย ส่วนที่สองเป็นเทตระเปปไทด์ (tetrapeptide) ซึ่งจะต่ออยู่กับ NAM และส่วนที่สามเป็นเปปไทด์อีกชุดหนึ่ง ซึ่งจะเชื่อมสายของโพลิแซคคาไรด์ที่ทอดขนานกัน (รูปที่ 4) โดยที่ส่วนที่เป็นแกนกลางจะเหมือนกันหมดในแบคทีเรียทุกชนิด ส่วนที่เป็นเทตระเปปไทด์และเปปไทด์ที่เชื่อมระหว่างโพลิแซคคาไรด์จะแตกต่างกันในแต่ละชนิด เนื่องจากเปปทิโดไกลแคนทุกสายจะถูกเชื่อมกันทางขวาง ทำให้เปปทิโดไกลแคนชั้นต่างๆ ของแบคทีเรียเชื่อมต่อกันเป็นโมเลกุลใหญ่โมเลกุลเดียว สำหรับในผนังเซลล์ของเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างประกอบด้วยเยื่อชั้นนอกซึ่งมีโครงสร้างเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ แต่มีฟอสโฟลิพิด (phospholipid) และโปรตีนน้อยกว่า นอกจากนี้ยังพบว่ามี ลิโปโพลิแซคคาไรด์

(lipopolysaccharide, LPS) อีกด้วย ส่วนที่ลัดเข้ามาจากเยื่อชั้นนอก คือ ชั้นเปปทิโดไกลแคน ซึ่งอยู่ในช่องว่างระหว่างเยื่อชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเรียกว่า เพอริพลาสมิกสเปซ (periplasmic space) ส่วนสุดท้ายที่ลัดเข้ามาจากชั้นเพอริพลาสมิกสเปซ คือ เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วยไขมันและโปรตีน (รูปที่ 5)

เนื่องจากเชื้อ *V. harveyi* เป็นสาเหตุให้เกิดโรคเรื้อรังและทำความเสียหายให้แก่การเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญ การศึกษาผลของเชื้อ *V. harveyi* ต่อเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและ เอนไซม์ NAGase จึงมีความสำคัญในการเข้าใจการตอบสนองของกุ้งแชบ๊วยต่อเชื้อก่อโรคกุ้งได้ต่อไป



รูปที่ 5 ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

LPS = lipopolysaccharide, PL = phospholipid,

PG = peptidoglycan, LP = lipoprotein, P = protein

(สุวณี สุภเวชย์, 2536)

10. แบคทีเรีย *Vibrio cholerae*

V. cholerae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งสั้น ปลายโค้งเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์ (spore) เจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 16-42 °ซ แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ 37 °ซ และที่ pH 6.4-9.6 (Wolin, 1973) พบ *V. cholerae* แพร่กระจายทั่วไปในแหล่งน้ำทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย บริเวณปากแม่น้ำหรือแถบชายฝั่งทะเล (Colwell *et al.*, 1977) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบในอาหารทะเลหรือสัตว์ทะเลที่มีเปลือกหุ้ม (Dalsgaard *et al.*, 1995) จากการศึกษาใน copepod ซึ่งเป็นแพลงก์ตอนสัตว์พบว่า เป็นแหล่งที่พบเชื้อ *V. cholerae* ได้มากที่สุดโดยจะสะสมอยู่ที่บริเวณปากและรังไข่ (Huq *et al.*, 1983) นอกจากนี้อาจพบได้ในส่วนของทางเดินอาหาร เชื้อสามารถแทรกเข้าไปอยู่ได้ไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสัตว์ทะเล ไคตินยังช่วยป้องกันเชื้อในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด เช่นในระบบทางเดินอาหารของคน และ *V. cholerae* สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินสว่าชช่วยย่อยสลายไคตินเพื่อเกาะติดกับระบบทางเดินอาหารของคน (Nalin *et al.*, 1979)

V. cholerae เป็นสาเหตุให้เกิดโรคอหิวาตกโรคในคน การติดเชื้อเกิดจากการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อทำให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง ถ้าร่างกายสูญเสียน้ำและเกลือแร่มากผู้ป่วยอาจเสียชีวิตได้

11. แบคทีเรีย *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในลำไส้ใหญ่หรืออุจจาระของคนและสัตว์หลายชนิด *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา ปกติเป็น normal flora อยู่ในลำไส้ หากเชื้ออยู่ในลำไส้จะไม่ก่อให้เกิดโรคแต่เมื่อเข้าไปอยู่ในอวัยวะส่วนอื่นที่ไม่ใช่ลำไส้เชื้อจะก่อให้เกิดโรคได้ เช่น ในปอด ในช่องท้อง ในเยื่อหุ้มสมอง โดยเชื้อจะก่อให้เกิดการอักเสบกับอวัยวะดังกล่าว *E. coli* บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคท้องร่วงได้ เนื่องจาก *E. coli* อยู่ในลำไส้และออกมากับอุจจาระ ดังนั้นในการตรวจคุณภาพของอาหาร น้ำและเครื่องดื่ม จึงใช้ *E. coli* เป็นตัวกำหนดมาตรฐาน (บุญทา วรินทร์รัช, 2524)

12. ไวรัสตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV)

WSSV เป็นโรคติดเชื้อในกุ้งที่มีความรุนแรงมากและสามารถแพร่กระจายได้ในบริเวณกว้าง ลักษณะอาการภายนอกของกุ้งที่ติดโรคคือสีตัวซีดในช่วงแรก ๆ แล้วเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือแดงเรื่อ ๆ พบจุดขาวบริเวณด้านล่างของเปลือกทั้งส่วนหัวและลำตัว กุ้งจะกินอาหารลดลงและทยอยตายเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อาจตายมากถึง 100% ภายใน 3-10 วัน รายงานโรคนี้นี้ครั้งแรกพบในกุ้งลายเสือที่เลี้ยงในประเทศญี่ปุ่น โดยพบว่าเกิดขึ้นในฟาร์มที่นำลูกกุ้งมาจากประเทศจีน (Nakano, *et al.*, 1994; Takahashi, *et al.*, 1994) หลังจากนั้นก็มีรายงานการระบาดของโรคดังกล่าว

อีกหลายภูมิภาคโดยมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไป ในประเทศไทยพบการระบาดในกุ้งกุลาดำเมื่อปลายปี พ.ศ.2537 (Wongteerasupaya, *et al.*, 1995) นอกจากนี้ในกุ้งที่กล่าวมายังพบการระบาดในกุ้ง greasyback (*Metapeneaus ensis*) และในคริสต์เข็ญหลายชนิด ทั้งในธรรมชาติ บ่อเลี้ยงและห้องปฏิบัติการ แต่ระดับความรุนแรงอาจไม่สูงมาก (Momoyama, *et al.*, 1997) และนอกจากประเทศในแถบเอเชียแล้วการระบาดของโรครังกล่าวยังพบได้ในบางประเทศของทวีปอเมริกาใต้ เช่น ปานามา เอกวาดอร์ ชิลี และในทวีปอเมริกาเหนือ (Pantoja and Lightner, 2003)

จากการศึกษาวิจัยทางชีวโมเลกุลและเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าเชื้อ WSSV เป็นไวรัสชนิดดีเอ็นเอ (DNA) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Baculovirus โดยมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ กรดนิวคลีอิก และโปรตีน อวัยวะเป้าหมายของเชื้อนี้คือเนื้อเยื่อได้เปลือก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อเยื่อบุผิวเหงือก กระเพาะอาหาร ต่อมน้ำเหลือง แอ่งเลือด และหัวใจ (Takahashi, *et al.*, 1994)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับและในซีรัมของกิ้งชง
2. เพื่อให้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์จากตับของกิ้งชง
3. เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์
4. เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรีย *V. harveyi* แบบ active และแบบ inactive, *V. cholerae*, *E. coli* และไวรัส WSSV ที่มีต่อระดับแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในกิ้งชง