1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ระบบไคติโนไลติก (chitinolytic system) เป็นระบบเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) และไคโตไบเอส (chitobiase) หรือเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส (N-acetyl-glocosaminidase, NAGase) ระบบไคติโนไลติกมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไคติน (chitin) ในธรรมชาติ ไคตินเป็นสารอินทรีย์ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส (cellulose) ของพืช เป็นโพลีเมอร์ (polymer) ที่ประกอบขึ้นจากน้ำตาลหน่วยย่อย N-acetyl glucosamine เรียงต่อกันเป็นสายเส้นตรงเช่นเดียวกับเซลลูโลส พบไคตินในโครงสร้างซึ่งให้ความแข็งแกร่งในสัตว์จำพวกครัสเตเชียน (crustacean) เช่นพบใน เปลือกกุ้ง เปลือกปู เปลือกหอยมุก แกนปลาหมึก ตัวไหม และปีกแมลง รวมทั้งพบในผนังเซลล์ของเชื้อรา จุลินทรีย์ ยีสต์ และสาหร่ายบางชนิด ไคตินในธรรมชาติมีปริมาณมากเป็นที่สองรองจากเซลลูโลส ไคตินถูกย่อยสลายได้ด้วยระบบไคติโนไลติก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกำจัดสิ่งเหลือทิ้งไคตินที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ มีผลช่วยในการรักษาสิ่งแวดล้อม และก่อให้เกิดการหมุนเวียนสารในระบบนิเวศให้อยู่ในภาวะที่สมดุล จึงได้มีการนำไคตินไปใช้ประโยชน์หลากหลาย ทั้งด้านวัสดุทางการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อม ด้านการเกษตร และด้านอุตสาหกรรม เนื่องจากมีสมบัติเด่นคือ ไม่มีปฏิกิริยาต่อต้านจากร่างกายและไม่ก่อมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม จากบทบาทที่สำคัญของระบบไคติโนไลติกดังกล่าว จึงมีการศึกษาและนำเอนไซม์ในระบบไคติโนไลติกไปประยุกต์ใช้งานอย่างหลากหลายในปัจจุบัน

เอนไซม์ไคติเนสเป็นเอนไซม์ในระบบไคติโนไลติกมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสายโพลีเมอร์ของไคตินไปเป็นไคโตไบโอส (chitobiose) และเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส (NAGase) หรือไคโตไบเอส เร่งปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายของการสลายไคติน โดยสลายไคโตไบโอสไปเป็น N-acetyl glucosamine เอนไซม์ไคติเนสและ

NAGase ในระบบไคติโนไลติกมีบทบาททางชีวภาพที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่นมีการพบเอนไซม์ไคติเนสในอินทีกูเมนท์ (integument) และในตับของกุ้งลายเสือ (kuruma prawn, *Penaeus japonicus*) มีบทบาทเกี่ยวกับการเจริญเติบโตหรือการลอกคราบเช่นเดียวกัน เอนไซม์ไคติเนสที่พบในราซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดและการงอกของ spore และการยืดยาวของ hyphae มีรายงานบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเอนไซม์ NAGase โดยพบเอนไซม์นี้ในตับของกุ้ง ในกระเพาะอาหารของปลาไหลและทางเดินอาหารของแมงกะพรุน นอกจากนี้เอนไซม์เหล่านี้ยังมีบทบาทเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองจากศัตรูหรือเชื้อก่อโรค โดยพบเอนไซม์ไคติเนสในพืชหรือในเลือดของคนที่ติดเชื้อรา ขณะที่พบเอนไซม์ NAGase ในเลือดของปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) ปลาเทอร์บอท (turbot) และในไข่ของหอยเม่น (sea urchin) เอนไซม์ NAGase ยังมีบทบาทเกี่ยวกับการช่วยผสมพันธุ์ของตัวอสุจิ (sperm) กับไข่ของเพรียง (ascidian) คางคกและหนู

กุ้งแชบ๊วย (banana prawn, *Penaeus merguiensis*) เป็นกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทยเนื่องจากมีรสชาติดี เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศเป็นปริมาณมาก ในช่วงต้นของการเลี้ยง ลูกกุ้งแชบ๊วยมีความต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ดูแลอนุบาลง่ายและโตเร็วกว่าลูกกุ้งกุลาดำ (black tiger prawn, *Penaeus monodon*) (ศรีรัตน์ สอดสุข และพนม กระจ่างพจน์, 2541) แต่หลังจากเลี้ยงนาน 2 เดือนไปแล้ว กุ้งแชบ๊วยมีอัตราการเจริญช้า และมีอัตราการรอดตายต่ำกว่ากุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วยจึงเป็นที่นิยมในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่ากุ้งกุลาดำ (ธวัช ศรีวีระชัย และฐานันดร์ ทัตตานนท์, 2538) ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเชิงอุตสาหกรรมได้ประสบปัญหาการขยายพื้นที่เลี้ยงได้น้อยลงและปัญหาการเกิดโรคระบาดที่ยังไม่สามารถควบคุมได้ ส่งผลให้ผลผลิตกุ้งกุลาดำของประเทศไทยลดน้อยลง และการผลิตกุ้งกุลาดำต้องอาศัยแม่พันธุ์จากธรรมชาติซึ่งมีราคาสูงทำให้ต้นทุนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำเพิ่มสูงตามไปด้วย กุ้งแชบ๊วยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเรื่องต้นทุนการผลิตลูกกุ้ง เพราะกุ้งแชบ๊วยสามารถเจริญพันธุ์ได้รวดเร็วและสามารถใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดินในการผลิตลูกกุ้งได้ (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) ถ้าสามารถเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ได้ขนาดที่ต้องการ พบว่า

กุ้งแชบ๊วยมีราคาสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่มีขนาดเท่ากัน (เมธี วัฒนสิงห์, 2543) แต่การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยมีพฤติกรรมการกินอาหารและนิสัยการว่ายน้ำของกุ้งแชบ๊วยต่างจากกุ้งกุลาดำ ปัจจุบันนักวิจัยจึงให้ความสนใจศึกษาเพื่อพัฒนาการเพาะฟักและการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ดียิ่งขึ้น

การศึกษาเอนไซม์ NAGase และไคติเนสซึ่งอาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรคของกุ้ง จะเป็นการเตรียมความพร้อมด้านข้อมูลเพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยต่อไปในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1.1 กุ้งแชบ๊วย

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 ชีววิทยาและลักษณะทั่วไป

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดปานกลาง ตัวโตเต็มวัยมีขนาดลำตัวยาว 10-25 เซนติเมตร น้ำหนักตัวประมาณ 50-400 กรัม ลำตัวมีสีขาวครีมปนเหลืองมีจุดสีน้ำตาล เขียวแก่และเขียวอ่อนกระจายอยู่ เปลือกหุ้มลำตัวเรียบเป็นมันลักษณะเปลือกบาง เนื้อมาก มีเปลือกหัวหรือกรีส่วนบนเป็นรูปสามเหลี่ยม มีฟันทั้งด้านบนและด้านล่าง โดยฟันกรีด้านบนมีประมาณ 7-8 ซี่ ด้านล่าง มี 5-6 ซี่ เปลือกคลุมหัวมีร่องตามยาวและร่องตามขวาง มีแพนหาง ด้านข้างของหางไม่มีหนาม ลักษณะทั่วไปที่ต่างจากกุ้งกุลาดำ กุ้งกุลาลาย (green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus*) คือไม่มีแถบสีน้ำตาลเข้มพาดขวาง ลำตัวและเปลือกหัว หนวดคู่ที่หนึ่งมีแถบสีน้ำตาล หนวดคู่ที่สองสี

น้ำตาลไม่มีแถบขวาง ขาเดินและขาว่ายน้ำมีสีเหลืองบางครั้งมีสีน้ำตาลหรือ สีชมพู (Grey *et al*., 1983) โดยมีลักษณะเด่นที่เป็นข้อบ่งชี้ทางอนุกรมวิธาน (บุญศรี จารุธรรมโสภณ, 2537) คือ สันข้างกรี (androstral carina) ยาวไม่ถึงฟันกรีซี่สุดท้าย สันหน้าหนามข้างแก้ม (gastro orbital carina) ยาวประมาณ 1/3 ระหว่างหนามข้างแก้ม (hepatic spine) กับขอบหลังตา (orbital margin) maxilliped คู่ที่ 3 ของกุ้งเพศผู้ ปล้องสุดท้าย (dactylus) ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของปล้องถัดมา (propodus)กลุ่มขนตรงปลายปล้อง propodus ยาวประมาณครึ่งหนึ่งของปล้องสุดท้าย แผ่นบนของอวัยวะเพศเมีย (anterior plate of thelycum) เป็นรูปครึ่งวงกลม มีติ่งเนื้อ (fleshy) เห็นชัดเจน และขอบด้านข้างของแผ่นล่าง (margin of lateral plates or seminal receptacle) โค้ง

1.1.2 การแพร่กระจายและพฤติกรรมการกินอาหาร

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

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

1.1.3การสืบพันธุ์และการวางไข่

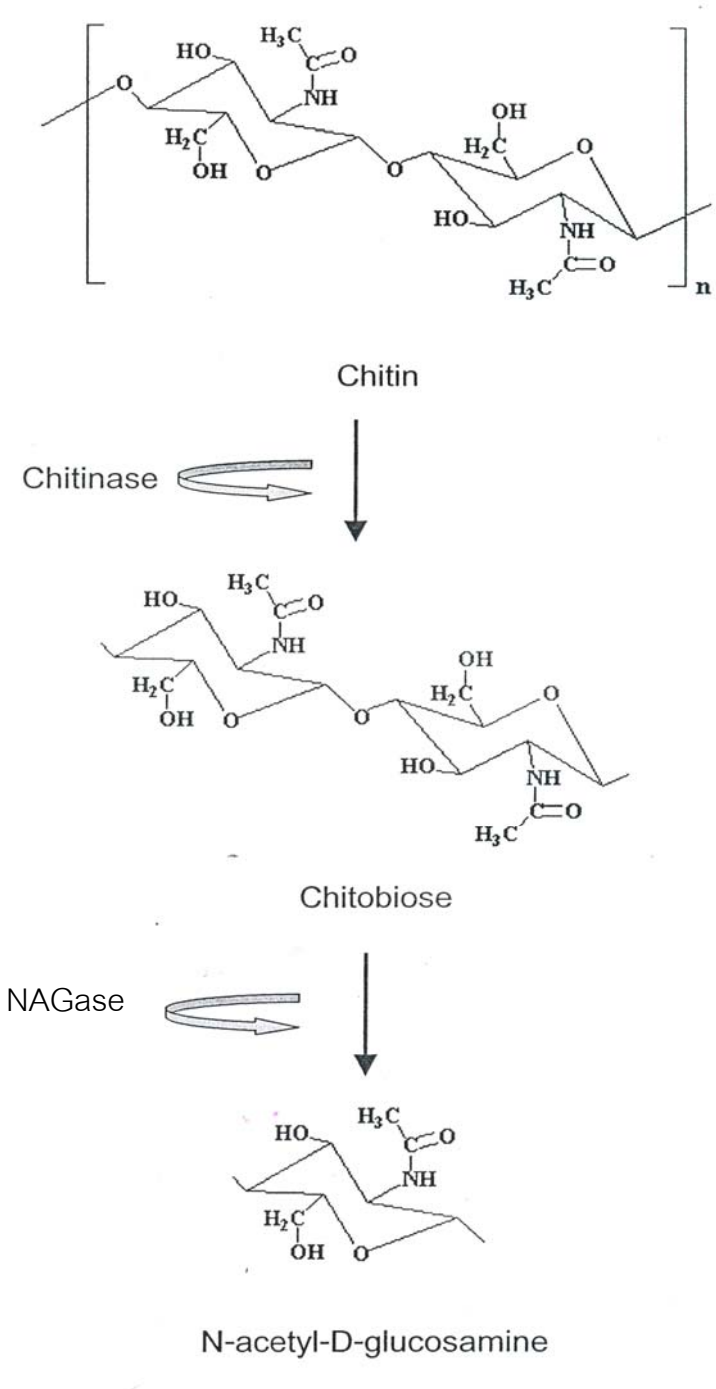
จากการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในบ่อดินพบกุ้งเพศผู้สร้างน้ำเชื้อ (milt) ได้เมื่อมีอายุ 136 วันขึ้นไป และปล่อยน้ำเชื้อเข้าเก็บที่บริเวณหน้าอกในส่วนของธีไลกัม (thelycum) ของกุ้งเพศเมีย เมื่อกุ้งเพศเมียมีไข่แก่จะปล่อยไข่ออกมาผสมกับน้ำเชื้อเพศผู้และฟักเป็นตัว เจริญเติบโตภายนอกตัวกุ้ง กุ้งแชบ๊วยเจริญพันธุ์จะมีขนาดความยาวตั้งแต่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

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

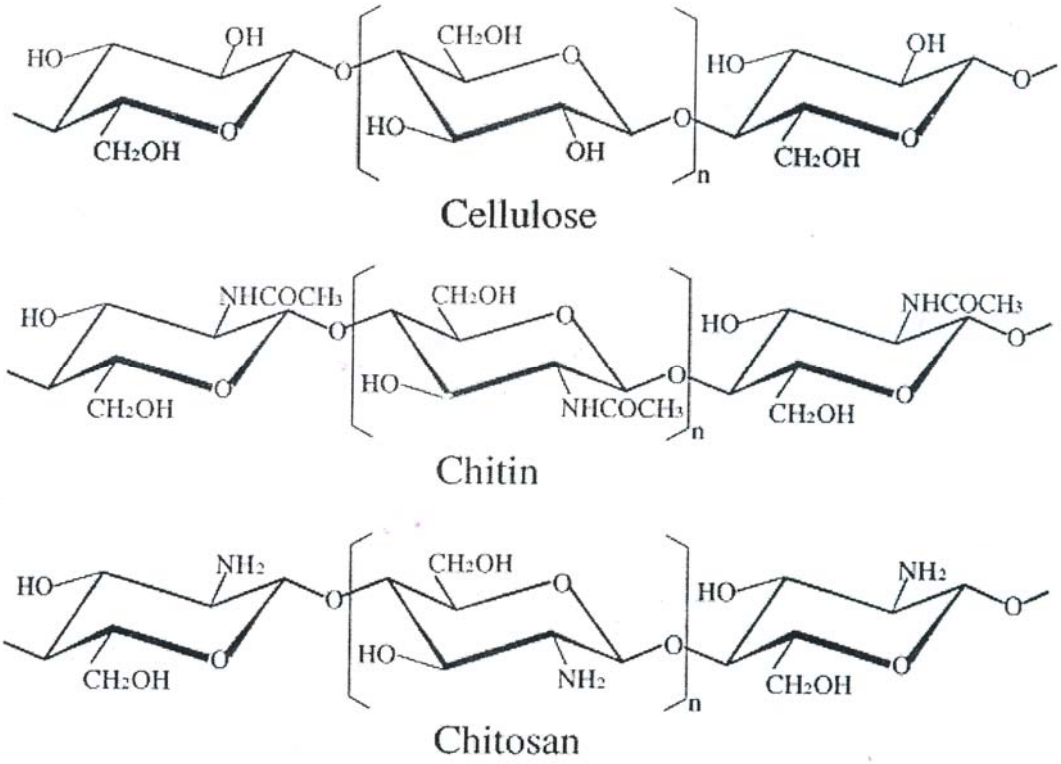
1.2 **ระบบไคติโนไลติก** (Chitinolytic system)

ระบบเอนไซม์ไคติโนไลติกเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายไคตินในธรรมชาติให้เป็นหน่วยย่อย N-acetyl glucosamine (NAG) ซึ่งมีลักษณะการทำงานร่วมกันอย่างต่อเนื่องเป็นระบบ โดยทั่วไปเอนไซม์ย่อยไคตินจะถูกเหนี่ยวนำให้หลั่งออกมาเป็นกลุ่มรวมกันในลักษณะ multienzyme complex ซึ่งส่วนมากประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไคติเนสและไคโตไบเอส หรือ เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส (NAGase) (Lindsay, 1986) โดยไคติเนสจะทำหน้าที่ย่อยไคตินที่เป็นโพลิเมอร์ของ NAG จนกระทั่งเป็นไคโตไบโอสซึ่งเป็นผลผลิตหลัก จากนั้นเอนไซม์ NAGase จะทำงานต่อโดยย่อยไคโตไบโอสให้เป็นโมโนเมอร์ (monomer) NAG (Shaikh and Deshpende, 1993) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2

ไคตินเป็นสารอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของหน่วยย่อยของ NAG ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบตา-1,4 ไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic bond) เป็นสายตรงคล้ายกับเซลลูโลส แต่ต่างจากเซลลูโลสที่หมู่ hydroxyl ตำแหน่งที่ 2 ของคาร์บอนในกลูโคส (glucose) จะถูกแทนที่ด้วยหมู่อะซิตามิโด (acetamido group, $NHCOCH_3$) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3 ไคตินพบได้หลากหลายในธรรมชาติ เป็นองค์ประกอบที่ให้ความแข็งแรงแก่เปลือกของสัตว์ที่โครงสร้างแข็งภายนอกโดยร่วมกับสารอื่นๆ เช่น โปรตีน แคลเซียมคาร์บอเนต เป็นต้น เช่นในสัตว์พวกครัสเตเชียนพวก กุ้ง ปู หอย แมงดาทะเล เพรียง และพบได้ทั้งในรา เห็ด ยีสต์ แบคทีเรีย และพืชชั้นต่ำ ไคตินจะถูกปลดปล่อยออกมาในธรรมชาติเมื่อสัตว์ลอกคราบหรือตาย หลังจากนั้นจะถูกย่อยสลายไปเป็นปุ๋ยหรือสารเคมีอินทรีย์โดยกระบวนการทางธรรมชาติ ไคตินเป็นสารที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต จึงไม่ก่อให้เกิดมลภาวะ เนื่องจากในธรรมชาติพบไคตินปริมาณมากเป็นอันดับ 2 รองจากเซลลูโลส จึงมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเพื่อหาวิธีการเปลี่ยนแปลงสารดังกล่าวจากสิ่งเหลือทิ้งให้อยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น ไคติน อนุพันธ์ของไคติน ไคโตซาน (chitosan) และหน่วยย่อย NAG ตามความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ ไคตินประกอบด้วย ไฮโดรเจน 6.5% คาร์บอน 47.3% ไนโตรเจน 6.9% และออกซิเจน 39.4% โดยประมาณ ไคตินเป็นสารที่ไม่ละลายในน้ำและในตัวทำละลายอินทรีย์ทั่วไป แต่ถูกย่อยสลายได้ด้วยกรดบางชนิด เช่น HCl, H_2SO_4, H_3PO_4 เป็นต้น



รูปที่ 2 ขั้นตอนการย่อยสลายไคตินโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ NAGase (Brine, 1984)



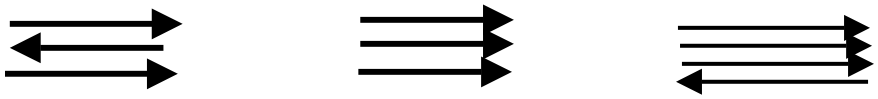
รูปที่ 3 โครงสร้างของเซลลูโลส ไคติน และไคโตซาน

ไคตินที่ได้จากแต่ละแหล่งมีโครงสร้างและสมบัติแตกต่างกัน โดยแบ่งตามลักษณะการเรียงตัวของเส้นโพลีเมอร์ได้ 3 กลุ่ม (รูปที่ 4) คือ

ก. แบบอัลฟา (alfa) มีการเรียงตัวของสายโพลีเมอร์ในลักษณะสวนทางกัน มีความแข็งแรงสูง ได้แก่ ไคตินจากเปลือกกุ้ง และกระดองปู

ข. แบบเบตา (beta) มีการเรียงตัวของสายโพลีเมอร์ในทิศทางเดียวกัน จึงจับกันได้ไม่ค่อยแข็งแรง มีความไวต่อปฏิกิริยาเคมีมากกว่าแบบอัลฟา ได้แก่ ไคตินจากแกนปลาหมึก

ค. แบบแกมมา (gamma) มีการเรียงตัวของสายโพลีเมอร์ในลักษณะที่ไม่แน่นอน (สวนทางกันสลับทิศทางเดียวกัน) มีความแข็งแรงรองจากแบบอัลฟา ได้แก่ ไคตินจากเห็ด รา และพืชชั้นต่ำ



แบบอัลฟา แบบเบตา แบบแกมมา

รูปที่ 4 โครงสร้างของไคตินแบบต่าง ๆ

ที่มา http:// www.gpo.or.th

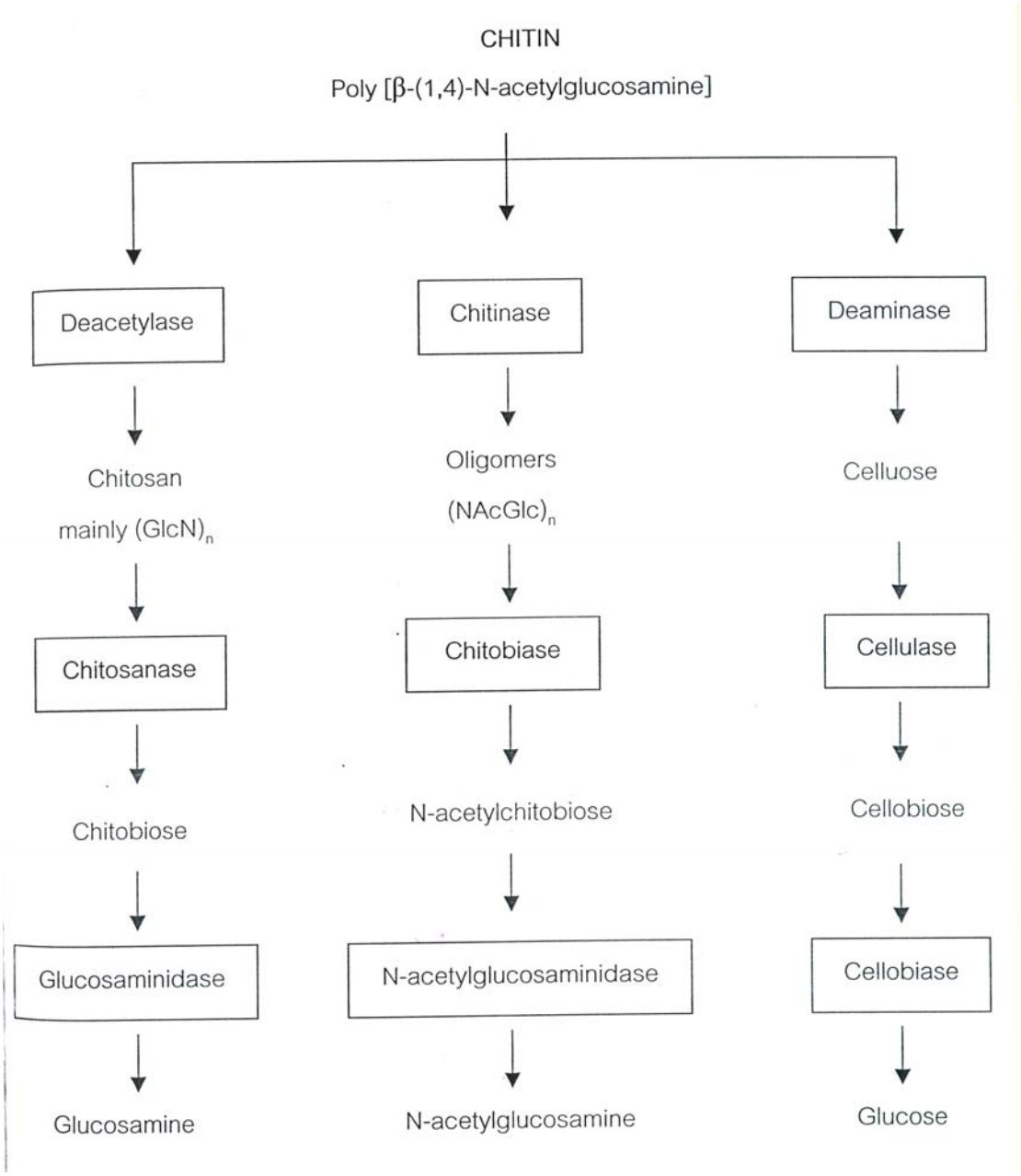
การย่อยสลายไคตินในธรรมชาติอาจเกิดขึ้นได้ 3 วิธี คือ

1. การย่อยสลายไคตินให้เป็นหน่วยย่อยของ NAG โดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไคติเนสและ NAGase

2. เกิดโดยการใช้เอนไซม์ deacetylase โดยดึงหมู่เอ็น-อะซิติล (N-acetyl) ออกจากไคตินเพื่อให้ได้เป็นไคโตซาน ซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อโดยเอนไซม์ไคโตซาเนส (chitosanase) และ glucosaminidase ให้ผลผลิตเป็นไคโตไบโอสและ glucosamine ตามลำดับ ไคโตซานคืออนุพันธ์ของไคตินที่ตัดเอาหมู่เอ็น-อะซิทิลออกของหน่วยย่อย NAG บางส่วนออกกลายไปเป็น glucosamine ซึ่งมีสมบัติละลายได้ในกรดอ่อนได้ดีกว่าไคติน

3. เกิดขึ้นโดยการใช้เอนไซม์ deamindase ดึงหมู่เอ็น-อะซิตามิโด ออกจากโมเลกุลของไคตินให้เป็นเซลลูโลส ซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นไคโตไบโอสได้ด้วยเอนไซม์ cellulase จากนั้นเอนไซม์ cellobiase จะทำการย่อยต่อจนเป็นกลูโคสในที่สุด

การย่อยสลายไคตินในธรรมชาติทั้ง 3 วิธีล้วนมีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลไคตินกลับมาเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนหมุนเวียนในระบบนิเวศน์อีกครั้ง ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 รูปแบบการย่อยสลายไคตินให้เป็นสารอื่น

ดัดแปลงมาจาก Cabib (1987)

1.3 เอนไซม์ไคติเนส

เอนไซม์ไคติเนสที่พบโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ endo-chitinase และ exo-chitinase ซึ่งทำงานแตกต่างกันคือ exo-chitinase จะทำการย่อยสลายไคตินจากปลายไมรีดิวซ์ (non-reducing end) และให้หน่วย diacetylchitobiose เป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ endo-chitinase จะย่อยสลายพันธะเบตา-1,4 ไกลโคซิดิกภายในโมเลกุลของไคตินแบบสุ่ม (Overdijk and Vansteijn, 1995)

การจำแนกชนิดของเอนไซม์ไคติเนสว่าเป็น exo- หรือ endo-chitinase ขึ้นอยู่กับการกระทำต่อสับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์เป็นหลัก (Linsay and Gooday, 1985) เนื่องจากไคตินในธรรมชาติแตกต่างกันไปตามชนิดของสิ่งมีชีวิต เช่น องค์ประกอบส่วนใหญ่ในแมลงจะเป็นไคตินที่อยู่ร่วมกับโปรตีน หรือผนังเซลล์ของเชื้อราก็จะมีไคตินที่อยู่ร่วมกับของโปรตีนและกลูแคน (glucan) แต่การทำงานของเอนไซม์ไคติเนสทั้ง 2 ชนิด มีความจำเพาะต่อพันธะระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ NAG สองหน่วยที่ติดกันในสายไคตินเท่านั้น (Jolles, 1984)

1.3.1 แหล่งที่พบเอนไซม์ไคติเนส

เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งโปรคาริโอท (prokaryote) และยูคาริโอท (eukaryote) ได้แก่

1.3.1.1 ในสัตว์

พบเอนไซม์ไคติเนสได้ในสัตว์ทั่วๆ ไป ได้แก่ สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน เช่น ไคติเนสในตับ (hepatopancreas) ของกุ้งลายเสือ (Kono *et al*., 1990) และกุ้งมังกร (lobster, *Homarus americanus*) (Lynn ,1990) ในแมงมุม (spider, *Cupinnius salei*) (Momsen, 1980 อ้างโดย Cabib,1987) ในหนอนใบยาสูบ (*Meduca sexta*) (Koga *et al*., 1983) นอกจากนี้ยังพบได้ในซีรัม (serum) ของลูกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Lundblan *et al*.,1979 อ้างโดย Cabib,1987) และยังพบได้ใน lysozyme ของคน (Escott and Adams, 1995)

1.3.1.2 ในพืช

พบเอนไซม์ไคติเนสได้ในน้ำยางของต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis* latex) (Rozeboom *et al*., 1990) ต้นฝ้าย (cotton, *Gossypium hisutum*) (Hadspeth *et al*., 1996) นอกจากนี้ยังพบได้ในใบและฝักของ chickpea, *Cicer aretinum*) (Nehra *et al*., 1994) หรือในเมล็ดของธัญพืช (Huynh *et al*., 1992)

1.3.1.3 ในจุลินทรีย์

พบเอนไซม์ไคติเนสในแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. 10s-24 (Ueda and Arai, 1992) และ *Bacillus stearothermophilus* CH-34 (Sakai *et al*., 1994) ส่วนในเชื้อราก็พบเอนไซม์ไคติเนสเช่นกัน เช่น *Trichoderma harzianum* (Ulhoa and Peberdy, 1992) *Aspergillus cameus* (Abdel-Naby *et al*., 1992) เป็นต้น

1.3.2 สมบัติของเอนไซม์ไคติเนส

1.3.2.1 น้ำหนักโมเลกุล

เอนไซม์ไคติเนสที่แยกบริสุทธิ์จากสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ แหล่ง มีน้ำหนักโมเลกุลหลากหลาย เอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 5,200-115,000 ดัลตัน (Dalton, Da) แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ ไคติเนสได้หลายไอโซไซม์ (isozyme) ตัวอย่างเช่น *Bacillus circulans* WL-12 มี 5 ไอโซไซม์ที่มีขนาดโมเลกุล 38,000, 39,000, 52,000, 69,000 และ 74,000 ดัลตัน (Watanabe *et al*., 1990) *Streptomyces olivasioviridis* ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ 5 ไอโซไซม์ที่มีขนาดโมเลกุล 25,000, 30,000, 47,000, 70,000 และ 92,000 ดัลตัน (Romaguera *et al*., 1992) และ *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ 4 ไอโซไซม์ (Tsujibo *et al*., 1993) เป็นต้น

ส่วนเอนไซม์ไคติเนสที่ทำบริสุทธิ์ได้จากพืชและสัตว์มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไม่มากนัก พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไคติเนสจากสัตว์จะอยู่ในช่วง 14,000 – 75,000 ดัลตัน เช่น ในกุ้งมังกร *H. americaus* 66,000 ดัลตัน (Lynn ,1990) กุ้งลายเสือ 37,000 ดัลตัน (Kono *et al*., 1990) ปลา red sea bream 46,000 ดัลตัน เอนไซม์ไคติเนสในเลือดคนมีน้ำหนักโมเลกุล 48,000 และ 14,000

ดัลตัน ในเม็ดเลือดขาวและใน lysosome ตามลำดับ (Escott and Adams, 1995) ส่วนเอนไซม์ไคติเนสในพืชมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 30,000 – 66,000 ดัลตัน เช่น ในน้ำยางพาราเป็น 29,000 ดัลตัน (Rozeboom *et al*., 1990) *Arabidopsis thaliana* 32,000 ดัลตัน (Verburg and Huynh, 1991) maize seed 28,000 ดัลตัน (Huynh *et al*., 1992) chickpea (*C. aretinum*) 27,000 และ 30,000 ดัลตัน ในฝักและในส่วนใบตามลำดับ (Nehra *et al*., 1994) และในฝ้าย *G. hisutum* 28,000 ดัลตัน (Hadspeth *et al*., 1996) เป็นต้น

1.3.2.2 การหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนส

สับสเตรทของเอนไซม์ไคติเนสคือไคติน ซึ่งในธรรมชาติไม่ละลายน้ำหรือในตัวทำละลายทั่วไป จึงมีความยุ่งยากในการหาแอคทิวิที (activity) เนื่องจากโครงสร้างจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ทั้งภายในและภายนอกโมเลกุล ทำให้ไคตินจับกันแน่น จนไม่สามารถละลายน้ำได้ มีผลทำให้การย่อยไคตินเกิดได้ช้ามาก ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุล เช่น colloidal chitin หรือ regenerated chitin นำมาใช้เป็นสับสเตรททำให้เอนไซม์ไคติเนสทำงานได้ดีกว่าไคตินในรูปธรรมชาติ (Malano *et al*., 1979) สับสเตรทอีกชนิดหนึ่งที่นำมาใช้คือ glycol chitin เป็นไคตินที่มีหมู่ hydroxyl จับอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของ NAG แทน การที่มีสับสเตรทหลากหลายถูกใช้ในการหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนส จึงเป็นการยากที่จะเปรียบเทียบค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ในแต่ละการทดลอง (Aribisala and Gooday, 1978 อ้างโดย Cabib, 1987) มีรายงานการใช้ 3,4-dinitrophenyl-tetraacetyl glucosamine เป็นสับสเสตรทด้วย ข้อเสียของสับสเตรทนี้คือ ความยาวของ tetramer สั้นเกินไปที่จะทำให้ endo-chitinase ย่อยได้ และยังเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไคโตไบเอสด้วย (Stirling *et al*., 1979 อ้างโดย Cabib, 1987) หลักในการหาแอคทิวิทีของไคติเนสโดยทั่วไปมี 2 แบบ คือ แบบที่ 1 วัดอัตราการลดลงของสารตั้งต้น เช่น วัดการเปลี่ยนแปลงความหนืดของ glycol chitin หลังจากถูกย่อยด้วยไคติเนส วิธีนี้มีข้อเสียคือ ถ้าไคติเนสย่อย glycol chitin ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่ละลายได้จนถึงบริเวณที่อยู่ใกล้กับส่วนกลางของสายโพลีเมอร์ ความไวของปฏิกิริยาจะลดลง เพราะ glycol chitin จะมีขนาดเล็กลงทำให้มีอัตราการไหลและความหนืดของสับสเตรทและผลผลิตมีค่าใกล้

เคียงกัน สำหรับการวัดแอคทิวิทีแบบที่ 2 คือ การวัดอัตราการเพิ่มของผลผลิตจากการทำงานของไคติเนส นิยมวัดด้วยวิธีนี้คือวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคตินด้วยวิธีการเทียบสี (colorimetric method) แต่มีข้อเสียคือเป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) ต่ำ ถ้าโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) นั้นมีขนาดใหญ่ ผลผลิตอีกชนิดหนึ่งที่สามารถวัดได้โดยการเทียบสี คือการวัดปริมาณของ NAG ที่เกิดขึ้น ทำปฏิกิริยากับ *p*-dimethylaminobenzaldehyde เกิดเป็นสารประกอบที่มีสีซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร ข้อเสียของวิธีนี้คือ ถ้าคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 ของ NAG มี side chain จะไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาให้สีได้ นอกจากนี้เอนไซม์ไคติเนสเองก็ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทให้เป็น NAG อิสระได้ ถ้าไม่มีเอนไซม์ NAGase ร่วมด้วย (Cabib, 1987)

จากการใช้ไคตินจากธรรมชาติที่เตรียมจากแกนปลาหมึก นำมาใช้เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ไคติเนส พบว่าจะมีแอคทิวิทีของปฏิกิริยาสูงกว่าการใช้ไคตินจากธรรมชาติจากแหล่งอื่น ๆ (ประสาท ศรประสิทธิ์, 2540) นอกจากวิธีข้างต้นแล้วยังมีรายงานการตรวจหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนสโดยใช้ tritiated chitosan ที่เตรียมจากไคโตซานซึ่งติดฉลากด้วย ^{3}H-acetic anhydride ทำการวัด radioactivity ที่เกิดขึ้นของผลผลิตหรือที่หายไปของสับสเตรท วิธีการนี้ถือว่าให้ผลดีที่สุด ทั้งในแง่ความไวและความจำเพาะของวิธีการหาค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนส (Malano *et al*., 1979)

1.4 บทบาททางชีวภาพของเอนไซม์ไคติเนส

1.4.1 เพื่อการเจริญเติบโตและ/หรือการลอกคราบ

มีรายงานว่าเอนไซม์ไคติเนสมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและ/หรือการลอกคราบ (molting) อาทิเช่น เอนไซม์ไคติเนสที่พบในอินทีกูเมนท์ของกุ้งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไคตินในเปลือกของกุ้งเพื่อการลอกคราบและการเจริญเติบโต ขณะที่เอนไซม์ไคติเนสที่พบในตับหรือที่เรียกว่า midgut gland เกี่ยวข้องกับการย่อยไคตินที่มาจากอาหาร (Kono *et al*., 1995; Spindler-Barth *et al*., 1990) ทำนองเดียวกัน เอนไซม์ไคติเนสที่พบในราในระยะที่มีพัฒนาการช่วงต่าง ๆ มีบทบาทเกี่ยวกับ

การเกิดและการงอกของสปอร์ (spore) และการยืดยาวของ hyphae (Gooday *et al*., 1992)

1.4.2 เพื่อการป้องกันตนเองจากศัตรูหรือเชื้อก่อโรค

เอนไซม์ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นเพื่อป้องกันตนเองต่อต้านการบุกรุกจากศัตรูหรือเชื้อก่อโรค เช่นการพบเอนไซม์ไคติเนสในซีรัมของคน ซึ่งคาดว่ามีบทบาทต่อต้านการติดเชื้อรา (Patil *et al*., 2000) ในพืชมีการสร้างเอนไซม์ไคติเนส ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค เนื่องจากไคตินเป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญของผนังเซลล์เชื้อราและเปลือกนอกของแมลงศัตรูพืช เช่นเอนไซม์ไคติเนส จาก *A. thaliana* สามารถป้องกันการติดเชื้อของ *Botrytis cinereanapus* ได้ (Sumae and Shan, 1994) เอนไซม์ไคติเนสที่ได้จากใบมันเทศ (*Solanum tuberosum*) เมื่อทำงานร่วมกับเอนไซม์เบตา-1,3 กลูคาเนส (β-1,3 glucanase) สามารถยับยั้งการติดเชื้อรา *Phytophthora infestans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Beerhuse and Kombrink, 1994)

1.5 ประโยชน์ของเอนไซม์ไคติเนส

1.5.1 ใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ

จากแนวคิดที่ได้จากการค้นพบว่าสิ่งมีชีวิตสร้างเอนไซม์ไคติเนสเพื่อป้องกันตนเองเพื่อต่อต้านการบุกรุกจากเชื้อก่อโรคหรือจากศัตรู เช่นพบเอนไซม์ไคติเนสในซีรัมของคน ซึ่งคาดว่ามีบทบาทต่อต้านการติดเชื้อรา หรือในพืชมีการสร้างเอนไซม์ไคติเนสเมื่อมีการบุกรุกของเชื้อโรค ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค โดยมีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อราที่มีไคตินอยู่ ดังเช่นเอนไซม์ไคติเนสจาก *A. thaliana* สามารถป้องกันการติดเชื้อของ *B. cinereanapus* ได้ (Sumae and Shan, 1994) และเอนไซม์ไคติเนสที่ได้จากใบมันเทศเมื่อทำงานร่วมกับเอนไซม์เบตา-1,3 กลูคาเนส สามารถยับยั้งการติดเชื้อรา *P. infestans* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Beerhuse and Kombrink, 1994) เนื่องจากไคตินเป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญของเปลือกนอกของแมลงศัตรูพืชหรือผนังเซลล์เชื้อรา เช่นเชื้อราสายพันธุ์ *Rhizoctonia solani* Kuhi ที่ทำให้เกิดโรคใบไหม้ (sheath blight) ในพืชหลายชนิด รวมทั้งก่อให้เกิดความเสียหายในหลายประเทศ

การใช้สารเคมีเพื่อควบคุมการระบาดของโรค ทำให้เสียเงินอย่างมากและยังทำลายสิ่งแวดล้อมด้วย (Thara and Nganamanickam, 1994) ปัจจุบันเอนไซม์ไคติเนสจึงเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ควบคุมศัตรูพืชที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ เช่น แมลง หรือเชื้อก่อโรคด้วยชีววิธี (biological control) ทั้งนี้เพราะประหยัด ปลอดภัยแก่ผู้บริโภคและไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม

จากการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียที่ต้านเชื้อราก่อโรคพืช เช่น เอนไซม์ไคติเนสจาก *Serratia mercescens* เมื่อนำไปใช้ร่วมกับเอนไซม์เบตา-1,3 กลูคาเนส หรือสารเคมีเช่น propan-2-ol และ polyoxyethylene lauryl ether และนำไปฉีดพ่นบริเวณทุ่งข้าวจะสามารถควบคุมอาการของโรคใบไหม้ (rice-blight) อันเนื่องมาจากเชื้อ *Piricularia oryzae* ได้ (Tanaka *et al*., 1970) การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ไคติเนส จาก *S. mercescens* ในการทดลองภายในเรือนกระจก (green house) พบว่าสามารถควบคุมเชื้อรา *Soleytium rolfsii* ที่ก่อให้เกิดโรคในถั่วและ *R. solani* ที่ก่อโรคในฝ้ายได้ (Ordentlich *et al*., 1988) นอกเหนือไปจากการนำเอนไซม์ไคติเนส จากแบคทีเรียไปควบคุมเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืชแล้ว เอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อรา *T. harzianum* ก็สามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคในพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ด้วย จึงนำมาใช้เป็นสารควบคุมชีวภาพที่สำคัญทางการเกษตรกรรมในปัจจุบัน (Ridout *et al.,* 1988) หรือการศึกษาเอนไซม์ไคติเนสในเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งเป็นเชื้อราก่อโรคใน passion fruit รวมทั้ง strawberry (King *et al*., 1997) เพื่อจะนำไปสู่การเป็นสารควบคุมชีวภาพต่อไป (Souza *et al*., 2003) การพัฒนาเทคนิค protoplast fusion สามารถปรับปรุงสายพันธ์ของ *T. harzianum* ให้สามารถต้านเชื้อราก่อโรคพืชได้โดยตรง เช่น *R. solani*, *S. rolfsii* และ *Phythium ultimum* การกำจัดแมลงศัตรูพืชมีการทดลองใช้เอนไซม์ไคติเนสไปย่อยสลายคิวติน (cutin) ของแมลง และพบว่าเมื่อมีเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ทำงานร่วมด้วยจะทำให้ผลของการย่อยสลายคิวตินของแมลงเกิดได้เร็วขึ้น (St. Leger *et al*., 1986)

จากการตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* จากแบคทีเรียที่เรืองแสง 1757 ชนิด พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถผลิตไคติเนสได้ 31% และสามารถยับยั้งเชื้อราได้ 12% เมื่อนำมาตรวจสอบ

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* จากนาข้าวในธรรมชาติ เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมี validamycin พบว่าแบคทีเรียชนิด *Pseudomanas putida* และ *Pseudomanas fiuorescens* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งได้ 68% ในขณะที่การใช้สารเคมีสามารถยับยั้งได้เพียง 17% แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด จึงเป็นเป้าหมายสำคัญต่อการควบคุมทางชีวภาพ (Thara and Nganamanickam, 1994)

จากบทบาทการป้องกันตนเองของเอนไซม์ไคติเนสต่อเชื้อโรคที่บุกรุก จึงมีการศึกษาการถ่ายโอนยีนจากสิ่งมีชีวิตที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา เข้าสู่พืชเศรษฐกิจเพื่อให้พืชนั้นมีความต้านทานต่อโรคและแมลงที่เป็นศัตรูพืช เช่น การศึกษาการความต้านทานต่อโรคในพืชที่มีการถ่ายโอนยีน (transgenic plant) Panja และ Raharjo (1996) โดยนำยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไคติเนสที่มีสมบัติเป็น acidic protein จาก pitunia และยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไคติเนสที่มีสมบัติเป็น basic protein จากมะเขือเทศโดยใช้ *Agrobacterium tumefaceins* เป็นพาหะในการถ่ายโอนยีนเข้าสู่แคร์รอท (carrot) แล้วเปรียบเทียบความสามารถต้านทานเชื้อรา 5 ชนิด คือ *Alternaria radicini*, *Botrylis cineria*, *Sclemaria rolfsii*, *R. solani* และ *Thelaviopsis basicola* เปรียบเทียบกับพืชที่ไม่มีการถ่ายโอนยีน (nontransgenic plant) พบว่าแคร์รอทที่มีการถ่ายโอนยีนไคติเนสจากมะเขือเทศสามารถต้านทานเชื้อราได้ 3 ชนิด คือ *B. cineria, S. rolfsii*, และ *R. solani* ขณะที่แคร์รอทที่รับการถ่ายโอนยีนไคติเนสจาก pitunia ไม่สามารถต้านทานเชื้อราได้ อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของพืชที่มีการถ่ายโอนยีน เพื่อให้ต้านทานเชื้อราที่เป็นศัตรูนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น ชนิดของพืช ชนิดของยีน และคุณลักษณะของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรค

1.5.2 ใช้ในการย่อยสลายไคติน

เนื่องจากเอนไซม์ไคติเนสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไคตินในสิ่งมีชีวิต เอนไซม์นี้จึงเป็นที่สนใจในการใช้ย่อยสลายของเหลือไคติน (chitin waste) ที่มาจากเปลือกกุ้งและกระดองปูที่มีจำนวนมากจากอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำ นอกเหนือจากการกำจัดสิ่งเหลือทิ้งไคตินที่มีมากมายแล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าสิ่งเหลือทิ้งไคตินเหล่านี้ ทั้งนี้เพราะไคติน-ไคโตซานมีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังเช่น ได้มีการนำไคติน

หรือไคโตซานไปใช้ในโครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography) สำหรับการแยกสารมีสีออกจากชา กาแฟ น้ำผลไม้ สารสกัดจากเห็ดแห้ง คาราเมล น้ำตาลและ อื่น ๆ (Ivata และ Nakabayashi, 1974 อ้างโดย Muzzarelli, 1977) จากการเติมไคตินเพียง 1% โดยน้ำหนักลงในเยื่อกระดาษจะเพิ่มความทนทานของกระดาษ เร่งอัตราเร็วในการแยกน้ำออกจากเยื่อกระดาษ ลดปริมาณเส้นใยกระดาษและลดราคาต้นทุน รวมทั้งไคตินยังช่วยให้การพิมพ์ลวดลายลงบนกระดาษได้ง่ายขึ้น กระดาษที่ผสมไคตินจะมีความแข็งแรงขณะเปียกดีมากขึ้น ซึ่งเป็นข้อดีสำหรับนำมาทำผ้าอ้อมแบบใช้แล้วทิ้ง ถุงช็อปปิ้ง และกระดาษเช็ดมือ (Nicol, 1991) นอกจากนี้ ได้มีการพัฒนาไคโตซานให้เป็นอนุพันธ์ที่สามารถละลายน้ำได้ และใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางสำหรับบำรุงผมและผิวพรรณ เช่น โลชัน ครีมนวดผม แชมพู โฟมอาบน้ำ สบู่เหลว ยาสีฟัน และครีมแต่งหน้า เป็นต้น (Nicol, 1991)

ไคโตซานมีสมบัติเป็นสารช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลและไขมันได้เนื่องจากสามารถจับกับ micelle และ bile salts ได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงมีผลต่อกระบวนการย่อยและการดูดซึมไขมันโดยรวม จากการทดลองพบว่าไคโตซานสามารถจับกับ bile salts ได้ 4-12 เท่าของน้ำหนัก โดยขึ้นอยู่กับ pH และการจับอาจเป็นไปได้ทั้งแรงยึดเหนี่ยวระหว่างประจุและ hydrophobic interaction (Muzzarelli ,1985)

นอกจากนี้เอนไซม์ไคติเนสอาจเป็นเป้าหมายสำคัญในการใช้เตรียม NAG เพื่อที่จะนำ NAG ไปใช้ประโยชน์ในการสร้างสารประกอบต่างๆที่มี NAG เป็นองค์ประกอบต่อไป

1.6 **เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส** (N-Acetylglucosaminidase,NAGase)

เอนไซม์ NAGase หรือไคโตไบเอส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนสุดท้ายของการสลายไคตินโดยสลายไคโตไบโอสไปเป็น NAG 2 โมเลกุล (Shaikh and Desh-pande, 1993) เอนไซม์ NAGase ที่ไม่อยู่ในระบบไคติโนไลติกแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามรูปแบบการเร่งปฏิกิริยา คือเป็นชนิด endo-NAGase และ exo-NAGase โดยendo-NAGase ตัดสายโอลิโกแซคคาไรด์ ที่พันธะไกลโคซิดิกระหว่างโมเลกุลแบบสุ่ม ส่วน

exo-NAGase ตัดสายโอลิโกแซคคาไรด์ที่พันธะไกลโคซิดิกจากปลายน้ำตาลที่ไม่รีดิวซ์เข้ามาทีละหน่วยจนได้ผลผลิต เป็น NAG

1.6.1 แหล่งที่พบเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งโปรคาริโอท (prokaryote) และยูคาริโอท (eukaryote) ได้แก่

1.6.1.1 ในสัตว์

พบเอนไซม์ NAGase ได้ในสัตว์ทั่ว ๆ ไป ได้แก่ สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนพบเอนไซม์ NAGase ในอิพิเดอร์มิส (epidermis) และตับของปูฟิดเดลอร์ (fiddler crab, *Uca pugilator*) แมงดาทะเล (horseshoe crab) (Zou and Fingerman, 1999; Jain *et al*., 1977) และ กุ้งนอร์ทเทิร์น (Northern shrimp, *Pandalus borealis*) (Esaiassen *et al*., 1992) พบเอนไซม์ในทางเดินอาหารของกุ้งมังกร (Lynn, 1990) และกุ้งขาว (white shrimp, *Penaeus vannamei*) (Le Chevalier and Van Wormhoudt, 1998) และยังพบเอนไซม์นี้ในคิวติเคิล (cuticle) ของกุ้งลายเสือ (Watanabe and Kono, 1997)

ในสัตว์กลุ่มแมลง พบเอนไซม์ NAGase ที่เมมเบรน (membrane) ของตัวอสุจิแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) และเพรียง (*Phallusia mammillata*) (Cattaneo *et al*., 2002; Godknecht and Honegger, 1991) ในฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) ของหอยทากน้ำจืด (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)

ในสัตว์กลุ่มหนอน (worm) เช่นหนอนไหม (silk worm, *Bombyx mori*) พบเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์ อินทีกูเมนท์ ต่อมสร้างใยไหม (silk gland) (Kimura, 1977)และในลำไส้ของหนอนใบยาสูบ (*M. sexta*) (Zhu *et al*., 2001)

พบเอนไซม์นี้ในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ได้แก่ พบเอนไซม์ NAGase ในเลือดของปลาเรนโบว์เทราท์ (*Salmo gairdneri*) (Lindsay, 1986) ปลาเทอร์บอท (*Scophthalmus maximus*) (Manson *et al*., 1992) และ

กระเพาะอาหารของปลาไหล (eel, *Anguilla anguilla*) (Deelder, 1978) ม้ามและตับของหนู (Dennis and Hart, 1994; Aronson *et al*., 1989) เป็นต้น จากการทดลองของ Hultberg และ Isaksson (1983) และการทดลองของ Antoniello และคณะ (1989) ยังพบเอนไซม์นี้ในผู้ป่วยโรคตับ ตับอักเสบเฉียบพลันเนื่องจากแอลกอฮอล์ (alcohol) ผู้หญิงที่กำลังตั้งครรภ์ ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน ผู้ป่วยที่มีทางเดินน้ำดีอุดตัน

1.6.1.2 ในจุลินทรีย์

เอนไซม์ NAGase พบในเชื้อรา *Phycomyces blakeslecanus* โดยพบอยู่ในไซโตพลาซึม (cytoplasm) ของ sporangiophore มากกว่าในไมซีเลียม (Cohon, 1986) นอกจากนี้เอนไซม์ NAGase ยังพบใน filament ของเชื้อรา *T. harzianum* (Omero *et al*., 2001) และในอาหารเหลวจากการเลี้ยงเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Havukkala *et al*., 1993)

1.6.1.2 ในพืช

ในพืชส่วนใหญ่เน้นศึกษาเฉพาะเอนไซม์ไคติเนส 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)

1.6.2 สมบัติของเอนไซม์ NAGase

1.6.2.1 น้ำหนักโมเลกุล

เอนไซม์ NAGase มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันในช่วง 43,000-300,000 ดัลตัน เช่นเอนไซม์จากเชื้อรา *P. blakeslecanus* และ *B. bassiana* มีน้ำหนักโมเลกุล 72,000 และ 45,000 ดัลตัน ตามลำดับ (Cohon, 1986; Havukkala *et al*., 1993) โดยในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่าง ๆ พบเอนไซม์ NAGase มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันได้แก่ เอนไซม์จากสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน เช่นจากกุ้งมังกร พบเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 116,000 ดัลตัน (Lynn, 1990) Zou และ Fingerman (1999) ศึกษาเอนไซม์ NAGase จากปูฟิดเดอร์ซึ่งในอิพิเดอร์มิสพบเอนไซม์เพียง 1 isoform ขนาด 89,000 ดัลตัน ส่วนในตับพบเอนไซม์ 2 isoform ขนาด 89,000 และ 45,000 ดัลตัน

เอนไซม์ NAGase จากอินทีกูเมนท์ของแมลงหวี่ *Drosophila 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)

1.6.2.2 จลนศาสตร์ (Kinetic) ของเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase จากแต่ละแหล่งมีความจำเพาะกับสับสเตรทต่างกัน เอนไซม์ NAGase จากตับและอิพิเดอร์มิสของปูฟิดเดอร์มีความจำเพาะต่อ 4-methylum-belliferyl-N-acetyl-β-d-glucosaminide (MUFNAG) โดยมีค่า 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 จากเชื้อรา *P. blakeslecanus* มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl-β-N-acetyl galactosaminide มีค่า K_m เท่ากับ 2.3 mM (Cohon, 1986) จากอินทีกูเมนท์ของตั๊กแตน *Locusta migratoria* และแมลงหวี่ *D. hydei* มีค่า K_m เท่ากับ 0.9 และ 3.6 mM ตามลำดับ (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976)

1.6.3 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase

1.6.3.1 ผลของ pH

เอนไซม์ NAGase จากแหล่งต่าง ๆ ทำงานได้ดีและมีความเสถียรที่ pH เป็นกรดและเป็นกลาง เช่น เอนไซม์ NAGase จากอินทีกูเมนท์ของตั๊กแตน *L. migratoria* มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 4-5 ฮีโมลิมฟ์ของหอยทากน้ำจืด ตับและอิพิเดอร์มิสของปูฟิดเดลอร์ มีแอคทิวิทีสูงที่ pH 5.0-6.5 (Zielkowski and Spindler, 1978; Spindler, 1976; Zelck *et al*., 1996; Zou and Fingerman ,1999) จากพิษงูอัฟริกันพัฟฟ์พบว่ามีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 5.5 (Nok *et al*., 2001) ส่วนเอนไซม์จากตับของกุ้ง

นอร์ทเทิร์นพบมีแอคทิวิทีสูงที่ pH 4-6 (Esaiassen *et al*., 1992) และเอนไซม์ NAGase นอกจากนี้ในสมองของวัวพบเอนไซม์มีแอคทิวิทีสูงที่ pH 6-7

1.6.3.2 ผลของอุณหภูมิ

เอนไซม์ NAGase ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 40-70 °ซ เช่น ในตับคนพบเอนไซม์มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ 50 °ซ (Sasaki *et al*., 1991) จากอินทีกูเมนท์ของตั๊กแตน *L. migratoria* พบเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70 °ซ (Zielkowski and Spindler, 1978) เอนไซม์จากพิษของงูอัฟริกันพัฟพ์ พบเอนไซม์มีแอคทิวิทีสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 °ซ (Nok *et al*., 2001) ส่วนในตับ อิพิเดอร์มิสของปูฟิดเดลอร์และในกุ้งนอร์ทเทิร์นมีแอคทิวิทีสูงที่อุณหภูมิในช่วง 50-60 °ซ (Zou and Fingerman, 1999; Esaiassen *et al*., 1992)

1.7 บทบาททางชีวภาพของเอนไซม์ NAGase

เอนไซม์ NAGase ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ มีบทบาททางชีวภาพที่หลากหลาย ได้แก่

1.7.1 บทบาทเกี่ยวกับการเจริญเติบโต

พบเอนไซม์ในตับของกุ้งขาวและกุ้งลายเสือ (Le Chevalier and Van Wormhoudt, 1998; Koga *et al*., 1996) และในทางเดินอาหารของกุ้งนอร์ทเทิร์น (Esaiassen *et al*., 1992) ทำหน้าที่ย่อยสลายอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตของกุ้งเหล่านี้ ส่วนในปลาไหล พบเอนไซม์ไคติเนส และ NAGase ในกระเพาะอาหารเพื่อย่อยสลายอาหารที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ (Deelder, 1978)

1.7.2 บทบาทเกี่ยวกับการลอกคราบ

เอนไซม์ NAGase ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการหมุนเวียนสารพวกไคตินที่เป็นส่วนประกอบของเปลือกนอกที่แข็ง โดยย่อยสลายไคตินจากเปลือกนอกที่แข็งก่อนการลอกคราบให้อยู่ในรูป NAG แล้วมีการดูดกลับไปเก็บไว้ใน molting fluid สำหรับนำมาสร้างเปลือกใหม่ในครั้งต่อไปซึ่งการทำงานของเอนไซม์ถูกควบคุมโดยฮอร์โมน ecdysteroid (Flach *et al*., 1992) มีการพบแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ในอินทีกูเมนท์สูงในช่วงสุดท้ายของการลอกคราบเพื่อเพิ่มขนาดของของตั๊กแตน *L. migratoria*

และแมลงหวี่ *D. hydei* (Spindler, 1976; Zielkowski and Spindler, 1978) ทำนองเดียวกับการลอกคราบของปูฟิดเดลอร์และกุ้งลายเสือที่พบว่าเอนไซม์มีแอคทิวิทีสูงเพื่อช่วยในการลอกคราบ (Zou and Fingerman, 1999; Peters *et al*., 1998; Watanabe and Kono, 1997)

1.7.3 บทบาทเกี่ยวกับการผสมพันธุ์

พบเอนไซม์ NAGase มากสุดในกลุ่มเอนไซม์กลูโคซิเดส (glucosidase) บริเวณส่วนหัวตัวอสุจิของสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยจำเพาะกับน้ำตาลที่อยู่บนผิวของไข่ เช่นผิวด้านนอกของไข่แมลงหวี่ *D. melanogaster* ที่โตเต็มที่จะพบน้ำตาล β-NAG และ α-mannose เป็นตำแหน่งที่ตัวอสุจิเข้าผสมกับไข่ (Cattaneo *et al*., 2002) ในขณะที่ยังพบเอนไซม์นี้ในคอร์ทิคอลกรานูลของไข่หอยเม่นโดยเมื่อเกิดการผสมพันธุ์เอนไซม์จะถูกหลั่งออกมาจากกรานูล เพื่อไปจับกับ hyaline layer ของไข่ซึ่งอาจทำหน้าที่เกี่ยวกับการป้องกันไข่ (Wessel *et al*., 1987)

1.7.4 บทบาทเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองจากศัตรูหรือเชื้อก่อโรค

เอนไซม์ไกลโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลายและควบคุม glycoconjugate เกี่ยวข้องกับการอักเสบและการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค โดยเอนไซม์สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียไม่สามารถทำงานได้ (Zelck *et al*., 1996) เช่นเดียวกับที่พบเอนไซม์ไคติเนสและ NAGase ปริมาณสูงในเลือดของปลาเรนโบว์เทราท์และปลาเทอร์บอทที่มีการติดเชื้อ โดยเอนไซม์ NAGase ทำหน้าที่สลายไคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (Lindsay, 1986; Manson *et al*., 1992)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบเอนไซม์ NAGase มีแอคทิวิทีสูงเมื่อต่อมน้ำนมของแกะมีการติดเชื้อ ซึ่งในน้ำนมปกติมีระดับของเอนไซม์ในปริมาณต่ำแต่เมื่อมีการติดเชื้อระดับของเอนไซม์มีปริมาณสูงขึ้น (Moroni and Cuccuru, 2001; Leitner *et al*., 2001)

1.8 ประโยชน์ของเอนไซม์ NAGase

1.8.1 ประโยชน์ในงานวิจัย

ได้มีการนำเอนไซม์ NAGase ไปใช้ศึกษาชนิดและลำดับของน้ำตาลที่จับกับโปรตีนในไกลโคโปรตีน รวมทั้งการกำจัดสายโซ่น้ำตาลเพื่อให้เอนไซม์เปปทิเดส (peptidase) เข้าย่อยสายโปรตีนหลัก ซึ่งการศึกษาเหล่านี้ในห้องปฏิบัติการนิยมใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดสหลายชนิดรวมทั้ง NAGase เข้าย่อยสลายสายโซ่น้ำตาลบนโปรตีนหลัก อาทิเช่น ผลงานวิจัยของ Tarentino และคณะ (1972) ศึกษาลำดับโครงสร้างน้ำตาลของโอวัลบูมิน (ovalbumin) โดยใช้เอนไซม์ endo-NAGase เป็นตัวตัดน้ำตาล การทำงานของเอนไซม์ NAGase ในการสลายไคตินขึ้นอยู่กับฮอร์โมนการลอกคราบ (molting hormone) ในขณะที่มีการลอกคราบจะพบฮอร์โมนปริมาณมาก โดยฮอร์โมนจะไปกระตุ้นให้เอนไซม์ที่ใช้ในการลอกคราบทำงาน (Spindler, 1976) และจากการศึกษาของ Dennis และคณะ (1994) พบว่าเอนไซม์ NAGase เป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการดึง NAG ออกจาก O-NAG ที่เชื่อมติดกับ serine หรือ threonine ของไกลโคโปรตีนที่อยู่ในนิวเคลียสและไซโตพลาซึม เมื่อเกิดกระบวนการการเติมน้ำตาล

1.8.2 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) นอกจากนี้ยังพบปริมาณของเอนไซม์ NAGase มากในปัสสาวะของผู้ป่วยที่ท่อไตถูกทำลายโดยปริมาณของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับท่อไตที่ถูกทำลาย จึงใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้โรคของผู้ป่วยที่ไตถูกทำลาย (Kang *et al*., 2001) เอนไซม์ NAGase ยังเป็นตัวบ่งชี้โรคของผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัสในซีรัมได้ เนื่องจากพบเอนไซม์ในซีรัมสูงในผู้ป่วยที่ติดเชื้อไวรัส (Costanzi *et al*., 1996) ส่วนในผู้ป่วยที่เป็นโรคตับแข็ง ทางเดินน้ำดีอุดตัน ตับอักเสบเฉียบพลันจากแอลกอฮอล์ ผู้หญิงที่ตั้งครรภ์ และผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน พบมีปริมาณของเอนไซม์ NAGase เพิ่มสูงขึ้นในซีรัมเช่นเดียวกับหนูทดลองที่เป็นโรคตับแข็งเนื่องจาก CCl_4

(Antoniello *et al*., 1989; Hultberg and Isaksson, 1983) ในทำนองเดียวกันยังใช้เอนไซม์ NAGase เป็นตัวบ่งชี้โรคมะเร็งเต้านม โดยพบเอนไซม์ NAGase มีแอคทิวิทีสูงในเนื้อเยื่อของผู้หญิงที่เริ่มเป็นมะเร็ง (Slawson *et al*., 2001)

1.9 *Vibrio harveyi*

เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ที่พบในประเทศไทยเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคเรืองแสงในกุ้งกุลาดำ (มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2533) และในลูกกุ้งแชบ๊วย (ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ, 2530) เชื้อชนิดนี้ยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อกุ้งกุลาดำในโรงเพาะฟักในประเทศฟิลิปปินส์ (Lavilla-Pitogo *et al*., 1990) และไต้หวัน (Chen *et al*., 1992) โดยเชื้อ *V. harveyi* ก่อให้เกิดความเสียหายต่อลูกกุ้ง penaeid ในโรงเพาะฟักในระยะตัวอ่อน (larvae) หลังตัวอ่อน (postlarvae) (Lightner, 1988) และในกุ้งขนาดใหญ่ที่เลี้ยงอยู่ในบ่อเลี้ยง (Nash *et al*., 1992 อ้างโดย Jiravanichpaisal *et al*., 1994) จากการทดลองของ Le Groumellec และคณะ (1995) ซึ่งทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากลูกกุ้ง penaeid ในโรงเพาะฟักที่เลี้ยงในประเทศไทยและประเทศเอควาดอร์ พบว่าเป็นเชื้อ *V. harveyi* ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการตายจำนวนมากของลูกกุ้งในโรงเพาะฟัก โดยพบว่าเชื้อ *V. harveyi* ที่พบในประเทศไทยเป็นชนิดที่มีความรุนแรงมากกว่าที่พบในประเทศเอควาดอร์ และยังตรวจพบเชื้อ *V. harveyi* ในน้ำที่เลี้ยงกุ้งกุลาดำอย่างหนาแน่น (Ruangpan *et al*., 1995)

แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของกุ้งในระดับตั้งแต่ค่อนข้างมากจนถึงระดับตาย 100 เปอร์เซ็นต์ (Lightner, 1993) เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่แยกมาจากกุ้งที่เป็นโรคมักจะพบเชื้อสกุล *Vibrio* หลายชนิดเช่น *Vibrio alginolyticus, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio splendidus, Vibrio vulnificus, Vibrio damsela* และ *V. harveyi* (Lavilla-Pitogo, 1995) จากการศึกษาของ ดารุณี แซ่อุ่ย และคณะ (2530) ถึงสาเหตุการตายของลูกกุ้งแชบ๊วยในโรงเพาะฟัก พบว่าการตายของลูกกุ้งมักจะเกิดขึ้นทุกครั้งเมื่อสังเกตเห็นการเรืองแสงช่วงกลางคืนในน้ำทะเลและพบอยู่ตามซากลูกกุ้งและลูกกุ้งที่มีชีวิต หลังจากทำการแยกเชื้อจากลูกกุ้งแชบ๊วยที่ตายพบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อ *V. harveyi* โดย มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ (2533) พบว่าอาการที่เกิดจากการ

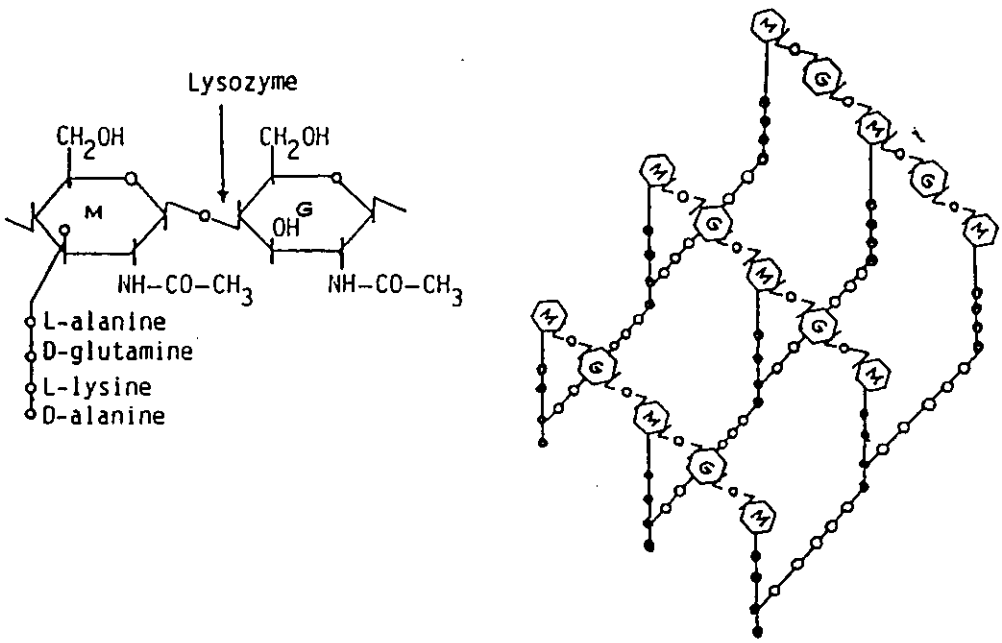
ติดเชื้อ *V. harveyi* คือ ในระยะแรก ๆ ลูกกุ้งจะมีการเคลื่อนไหวช้าลงลำตัวสีขาวขุ่น ต่อมากุ้งจะเบื่ออาหารและตาย

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) โพลีแซ็กคาไรด์และลิพิด (lipid) ซึ่งมีองค์ประกอบย่อยแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด ผนังเซลล์เป็นส่วนที่มีความแข็งแกร่งเนื่องจากมีโครงสร้างซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยโพลีแซ็กคาไรด์หรือไกลแคน (glycan) และเปปไทด์ ต่อกันด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) ซึ่งมีชื่อเรียกว่า เปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ดังแสดงในรูปที่ 6

เปปทิโดไกลแคนเป็นโพลิเมอร์ขนาดใหญ่ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนแรกเป็นแกนกลาง (back bone) หรือสายไกลแคน (glycan strand) เป็นโพลีแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์สองชนิดคือ NAG (G) และ N-acetylmuramic acid (NAM, M) ต่อกันด้วยพันธะ β(1 - 4) ไกลโคซิดิกสลับกันตลอดสาย ส่วนที่สองเป็นเททระเปปไทด์ (tetrapeptide) ซึ่งจะต่ออยู่กับ NAM และส่วนที่สามเป็นเปปไทด์อีกชุดหนึ่ง ซึ่งจะเชื่อมสายของโพลีแซ็กคาไรด์ที่ทอดขนานกัน (รูปที่ 6) โดยที่ส่วนที่เป็นแกนกลางจะเหมือนกันหมดในแบคทีเรียทุกชนิด ส่วนที่เป็นเททระเปปไทด์และเปปไทด์ที่เชื่อมระหว่างโพลีแซ็กคาไรด์จะแตกต่างกันในแต่ละชนิด เนื่องจากเปปทิโดไกลแคนทุกสายจะถูกเชื่อมกันทางขวาง ทำให้เปปทิโดไกลแคนชั้นต่างๆ ของแบคทีเรียเชื่อมต่อกันเป็นโมเลกุลใหญ่โมเลกุลเดียว สำหรับในผนังเซลล์ของเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างประกอบด้วยเยื่อบุชั้นนอกซึ่งมีโครงสร้างเช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์ แต่มีฟอสโฟลิพิด (phospholipid) และโปรตีนน้อยกว่า นอกจากนี้ยังพบว่ามีลิโพโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) อีกด้วย ส่วนที่ถัดเข้ามาจากเยื่อบุชั้นนอก คือ ชั้นเปปทิโดไกลแคน ซึ่งอยู่ในช่องว่างระหว่างเยื่อบุชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่ง

ซึ่งเรียกว่าเพอริพลาสมิคสเปซ (periplasmic space) ส่วนสุดท้ายที่ถัดเข้ามาจากชั้นเพอริพลาสมิคสเปซ คือ เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งประกอบไปด้วยไขมันและโปรตีน (รูปที่ 7)

เนื่องจากเชื้อ *V. harveyi* เป็นสาเหตุให้เกิดโรคเรืองแสงและทำความเสียหายให้แก่การเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจที่สำคัญ การศึกษาผลของเชื้อ *V. harveyi* ต่อเอนไซม์ NAGase และไคติเนส จึงมีความสำคัญในการเข้าใจการตอบสนองของกุ้งแชบ๊วยต่อเชื้อก่อโรคกุ้งได้ต่อไป

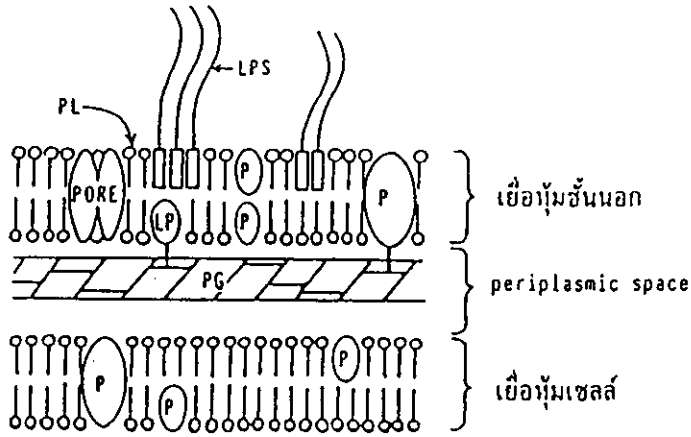


รูปที่ 6 โครงสร้างของเปปทิโดไกลแคน

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

A แสดงหน่วยซ้ำๆของ NAM, NAG และเททระเปปไทด์

B แสดงการเชื่อมต่อทางขวางระหว่างเปปทิโดไกลแคนสายที่อยู่ใกล้เคียงกัน (สุวณี สุภเวชย์, 2536)



รูปที่ 7 ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ

LPS = lipopolysaccharide, PL = phospholipid,
PG = peptidoglycan, LP = lipoprotein, P = protein
(สุวณี สุภเวชย์, 2536)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนสในตับของกุ้งแชบ๊วย
2. เพื่อทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากตับของกุ้งแชบ๊วย
3. เพื่อศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์
4. เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียก่อโรค *Vibrio harveyi* ที่มีต่อระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase และเอนไซม์ ไคติเนสในกุ้งแชบ๊วย