3. ผลการทดลองและวิจารณ์

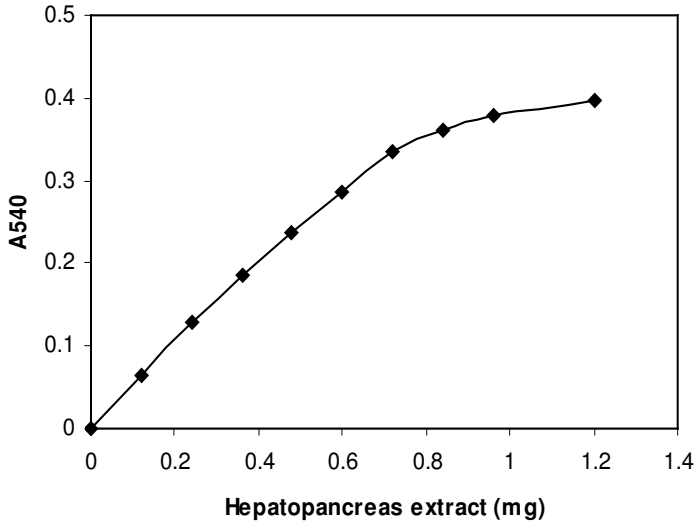
1. การหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทีวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เป็นสารประกอบพวกโปรตีนโดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ การทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง เช่น ความเข้มข้นของสับสเตรท, ความเข้มข้นของเอนไซม์, ความเป็นกรด-เบสของสารละลาย, อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา การใส่เอนไซม์หรือสับสเตรทในปริมาณที่พอเหมาะจะทำให้มีสารเริ่มต้นเพียงพอในการเกิดปฏิกิริยา pH ของสารละลายจะมีผลต่อโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์โดยส่งผลต่อประจุและกระทบต่อการจับกับสับสเตรท อุณหภูมิจะช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้เร็วขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไปก็ทำให้เอนไซม์แปลงสภาพได้ ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์จะทำปฏิกิริยาได้เต็มที่ถ้าเอนไซม์ได้ทำงานในภาวะที่เหมาะสม

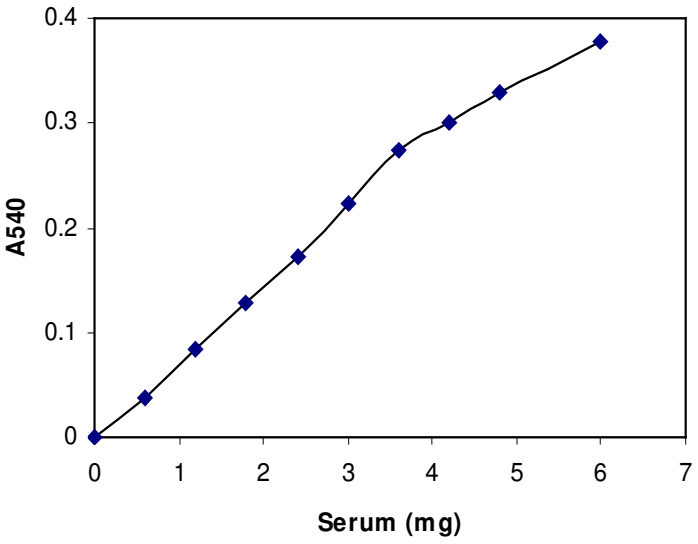
1.1 ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ในสารสกัดตับและซีรัมที่เหมาะสม

ในการหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส โดยใช้ปริมาณของสับสเตรทคงที่ต้องใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อปริมาณสับสเตรทที่ใช้ เมื่อนำสารสกัดตับที่เจือจางด้วยอัตรา 1: 10 โดยบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะคือใช้ปริมาณโปรตีนในช่วง 0-1.2 มิลลิกรัม ไปหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส พบว่าค่า A540 แปรผันเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงสัมพันธ์กับปริมาณสารสกัดตับในช่วง 0-0.72 มิลลิกรัม และเพิ่มสูงสุดและเริ่มคงที่ที่ปริมาณมากกว่า 0.72 มิลลิกรัม ดังแสดงผลในรูปที่ 6A เช่นเดียวกับในซีรัมที่ความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะคือใช้ปริมาณโปรตีนในช่วง 0-6 มิลลิกรัม ในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส พบว่าค่า A540 แปรผันเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงสัมพันธ์กับปริมาณซีรัมในช่วง 0-3.6 มิลลิกรัม และเพิ่มสูงสุดและเริ่มคงที่ที่ปริมาณมากกว่า 3.6 มิลลิกรัม ดังแสดงผลในรูปที่ 6B ดังนั้นจึงเลือกใช้สารสกัดตับเจือจาง 1:10 ปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.72 มิลลิกรัม และใช้ซีรัมปริมาณที่เหมาะสมคือ 3.6 มิลลิกรัม ในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในการทดลองต่อ ๆ ไป

A



B

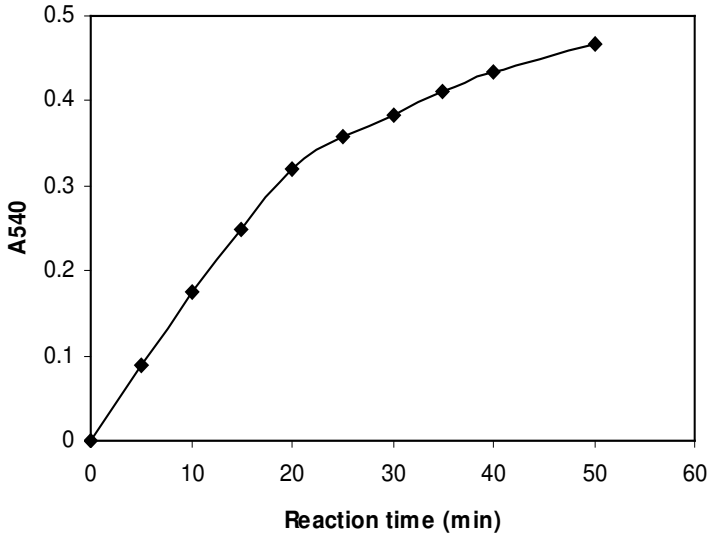


รูปที่ 6 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับ (A) และในซีรัม (B)

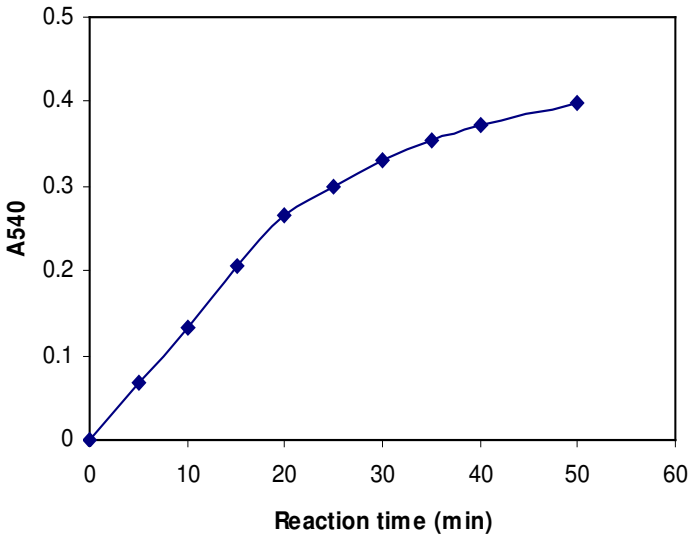
1.2 เวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ในการทำงานของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ปริมาณผลผลิตน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของสับสเตรทลามินารินจะแปรผันโดยตรงกับเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งในการหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับและซีรัมที่ pH 6 ณ อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลาต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-50 นาที พบว่าเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นจาก 0-20 นาที ค่า A540 เพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับเวลา แต่ค่า A540 จะเพิ่มขึ้นสูงสุดและเริ่มคงที่ที่เวลา 25 นาทีขึ้นไป ทั้งในสารสกัดตับและซีรัมดังรูปที่ 7A และรูปที่ 7B ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองต่อ ๆ ไปจึงเลือกใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาที่ยังอยู่ในช่วงเส้นตรงคือที่ 20 นาที

A



B

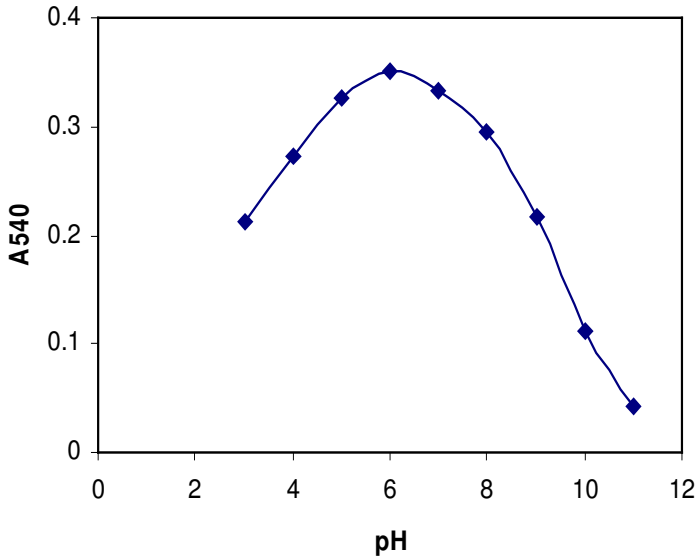


รูปที่ 7 เวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับ (A) และในซีรัม (B)

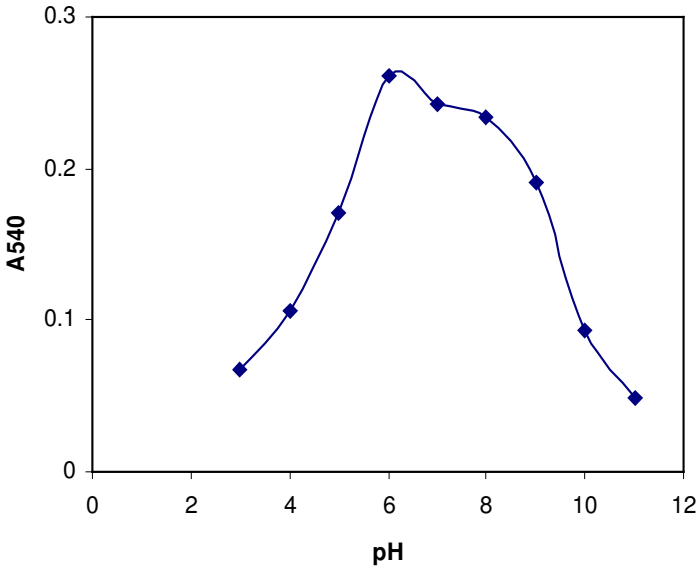
1.3 pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

ความเป็นกรด-เบสเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่มีผลต่อโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ ซึ่งมีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ จากการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและซีรัม ทำในสารผสมปฏิกิริยาในช่วง pH 3-11 พบว่าแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส (A540) มีค่าต่ำที่ pH 3 และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH ในช่วง 4-5 โดยมีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 6 จากนั้นเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสทำงานลดลงตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้นจนมีแอคทิวิทีน้อยที่สุดที่ pH 11 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับกุ้งแชบ๊วยจะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6 (รูปที่ 8A) เช่นเดียวกับในซีรัมพบว่าแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส (A540) มีค่าต่ำที่ pH 3 และมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH ในช่วง 4-5 โดยมีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 6 จากนั้นเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ทำงานลดลงตามค่า pH ที่เพิ่มขึ้นจนมีแอคทิวิทีน้อยที่สุดที่ pH 11 (รูปที่ 8B) ในการทดลองนี้จึงวัดแอคทิวิทีเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่ pH 6.0 ในการทดลองต่อ ๆ ไป ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากไข่หอยแม่นที่ทำงานได้ดีที่ pH 5.4 (Talbot and Vacquier, 1982) และใกล้เคียงกับเอนไซม์จากจากจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำงานได้ดีในช่วง pH ค่อนไปทางกรด เช่น ในแบคทีเรีย *F. glucanolyticae* มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 5.5 (Nagata *et al*., 1990) ในแบคทีเรีย *B. circulans* IAM1165 มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 6.5 (Aono *et al*., 1992)

A



B

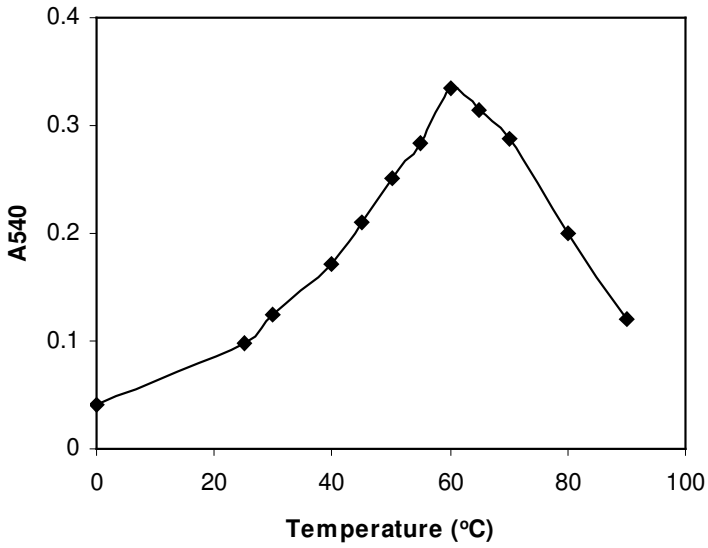


รูปที่ 8 pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับ (A) และในซีรัม (B)

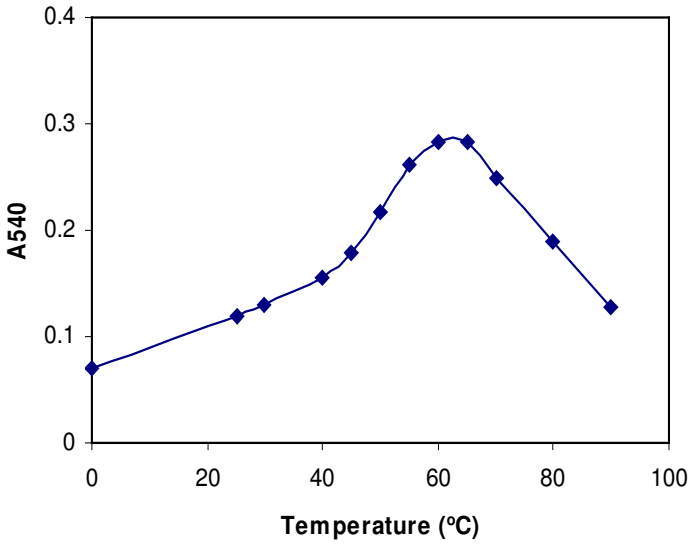
1.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ช่วยให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ โดยเพิ่มพลังงานจลน์ช่วยทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้เร็วขึ้น แต่อุณหภูมิที่สูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์แปลงสภาพ (denature) ได้ และทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง ซึ่งจากการหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและซีรัมที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันในช่วง 0-80 °ซ (รูปที่ 9) พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมีแอคทิวิที (A540) เพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ จนมีแอคทิวิทีสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 °ซ จากนั้นแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจะลดลงตามลำดับจนมีค่าน้อยที่สุดเมื่อทำปฏิกิริยาที่ 80 °ซ บ่งชี้ให้เห็นว่าการทำปฏิกิริยาที่ 60 °ซ เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดทั้งในสารสกัดตับ (รูปที่ 9A) และในซีรัม (รูปที่ 9B) ในงานวิทยานิพนธ์นี้จึงทำการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่อุณหภูมิ 60 °ซ ซึ่งเหมือนกับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่พบในไข่หอยแม่น จากเชื้อรา *A. fumigatus* และจาก *Bacillus* halodurans ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 °ซ (Talbot and Vacquier, 1982; Fontaine *et al*., 1997; Akita *et al*., 2005) และใกล้เคียงกับเอนไซม์จากยีสต์ *Arthrobacter* sp. และแบคทีเรีย *F. glucanolyticae* มีแอคทิวิทีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 °ซ (Pang *et al*., 2004; Nagata *et al*., 1990) และเอนไซม์จากหนอนไม้สนมีแอคทิวิทีสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 °ซ (Kikuchi *et al*., 2005)

A



B

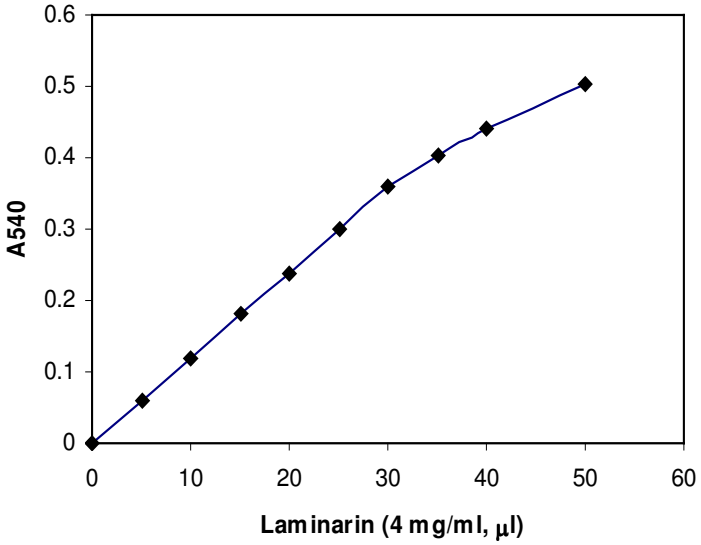


รูปที่ 9 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับ (A) และในซีรัม (B)

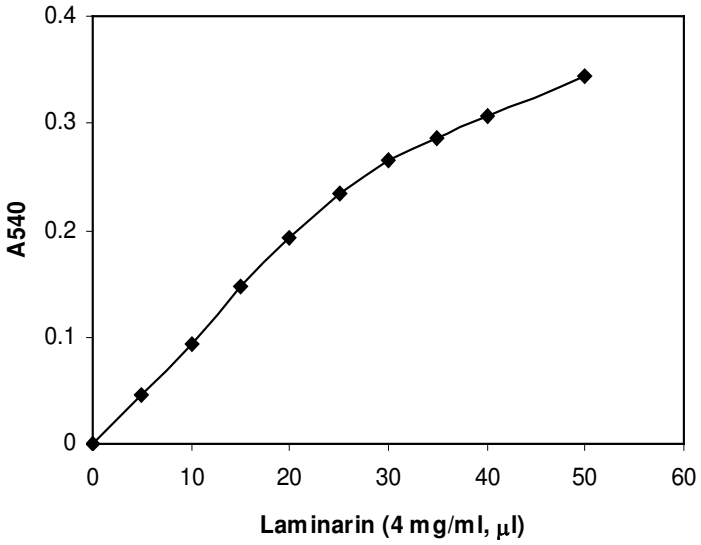
1.5 ปริมาตรของสับสเตรทลามินาริน (laminarin) ที่เหมาะสม

ในการหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและในซีรัม โดยกำหนดให้ปริมาณสารสกัดตับและซีรัมที่ใช้คงที่ แต่ใช้ปริมาณสับสเตรทต่าง ๆ กัน พบว่าในช่วงแรกค่า A540 แปรผันเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงสัมพันธ์กับปริมาณ 4 mg/ml laminarin ที่ใช้ในช่วง 0-30 ไมโครลิตร และค่า A540 เริ่มเพิ่มขึ้นสูงสุดและเริ่มคงที่เมื่อใช้ 4 mg/ml laminarin ปริมาตร 40-50 ไมโครลิตร (รูปที่ 10) ในงานนี้จึงเลือกใช้ 4 mg/ml laminarin ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ซึ่งให้ค่า A540 อยู่ในช่วงที่เป็นเส้นตรงเพื่อใช้วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับ(รูปที่ 10A) และในซีรัม (รูปที่ 10B)

A



B

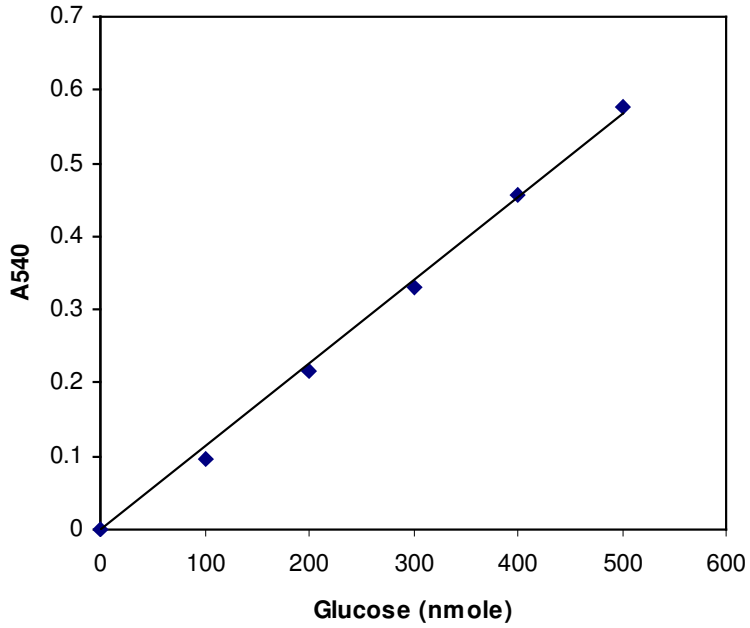


รูปที่ 10 ปริมาณสับสเตรทลามินารินที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับ (A) และในซีรัม (B)

2. แอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

2.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ในการหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจะต้องเตรียมกราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเทียบกับค่า A540 โดยที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะต้องแปรผันโดยตรงกับค่า A540 ซึ่งในการใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณต่าง ๆ ในสารผสมปฏิกิริยาเพื่อเตรียมกราฟมาตรฐาน แล้ววัดค่า A540 พบว่าค่า A540 แปรผันเป็นเส้นตรงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ในช่วง 0-500 nmole และมีค่าคงที่ จากการทดลอง 5 ครั้งจึงใช้กราฟมาตรฐานนี้ในการวัดค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสตลอดงานวิทยานิพนธ์ซึ่งมีความสัมพันธ์ของกราฟมาตรฐานคือ ค่า A540 1 หน่วย มีค่าเท่ากับปริมาณน้ำตาลกลูโคส 800 nmole (รูปที่ 11)



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

2.2 ระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับและซีรัม

จากผลการทดลองทั้งหมดในข้อ 1 พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสคือใช้สารสกัดตับที่มีปริมาณโปรตีนไม่เกิน 0.72 มิลลิกรัม ทำการวัดแอคทิวิทีใน 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 โดยใช้ 4 mg/ml laminarin ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เป็นสับสเตรท บ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ นาน 20 นาที วัดปริมาณผลผลิตน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับ 4 mM DNS โดยทำควบคู่กับการใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณในช่วง 0-500 nmole เป็น

กราฟมาตรฐาน (รูปที่ 11) จากการหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส โดยกำหนดให้แอคทิวิทีของเอนไซม์ 1 หน่วย เท่ากับปริมาตรน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้น 1 nmole ที่อุณหภูมิ 60 °ซ ในเวลา 1 นาที พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับมีแอคทิวิทีจำเพาะ (specific activity) อยู่ในช่วง 40-80 nmol/min/mg protein และการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในซีรัม ใช้ปริมาณโปรตีน 3.6 มิลลิกรัม ทำการวัดแอคทิวิทีในภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกับของสารสกัดตับ พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในซีรัมมีแอคทิวิทีจำเพาะอยู่ในช่วง 0.8-1.2 nmol/min/mg protein ผลการทดลองเหล่านี้ได้หักลบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในซีรัมหรือสารสกัดตับออกแล้วโดยทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในตัวอย่างเหล่านี้เช่นเดียวกับการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสโดยไม่ใส่สับสเตรท

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าปริมาณเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในสารสกัดตับมีแอคทิวิทีจำเพาะสูงกว่าในซีรัมหรือฮีโมลิมฟ์มาก ๆ แต่เป็นการยากที่จะทำให้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์จากแหล่งซึ่งมีระดับแอคทิวิทีต่ำ เช่น ในซีรัม ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้จึงเลือกที่จะทำให้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์จากสารสกัดตับ ทั้งนี้เพราะเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากทั้ง 2 แหล่งมีภาวะที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาเหมือนกันซึ่งอาจจะเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกัน

3. การทำให้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์จากสารสกัดตับ

งานวิทยานิพนธ์นี้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

3.1 โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

เมื่อนำสารสกัดตับที่ผ่านการไดแอไลซ์ใน TB-PMSF ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (โปรตีน 284.4 มิลลิกรัม) มีแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส เท่ากับ 107.59 nmol/min/mg protein ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 70 % พบว่าสารละลายเอนไซม์เข้มข้นมีปริมาณโปรตีน 94.62 มิลลิกรัม คิดเป็น 33.27 % ของสารสกัดตับเริ่มต้น และมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส เป็น 2.29 เท่าของสารสกัดตับเริ่มต้น (ตารางที่ 1) เมื่อนำไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel จากนั้นชะคอลัมน์ด้วย TB-PMSF จนค่า A280 เข้าใกล้ศูนย์พบว่ามีโปรตีนหลุดออกจากคอลัมน์ในช่วงหลอดที่ 15-28 ซึ่งเป็นพีค (peak) D1 เล็กน้อย จากนั้นเมื่อชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมที่มี NaCl ซึ่งเพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 0-0.5 M พบว่าโปรตีนพีคใหญ่ (พีค D2) ถูกชะออกมาจากคอลัมน์แต่ไม่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ในช่วงหลอดที่ 100-140 เมื่อชะคอลัมน์ต่อด้วย 0.5-1.0 M NaCl ที่เตรียมในบัฟเฟอร์ชนิด

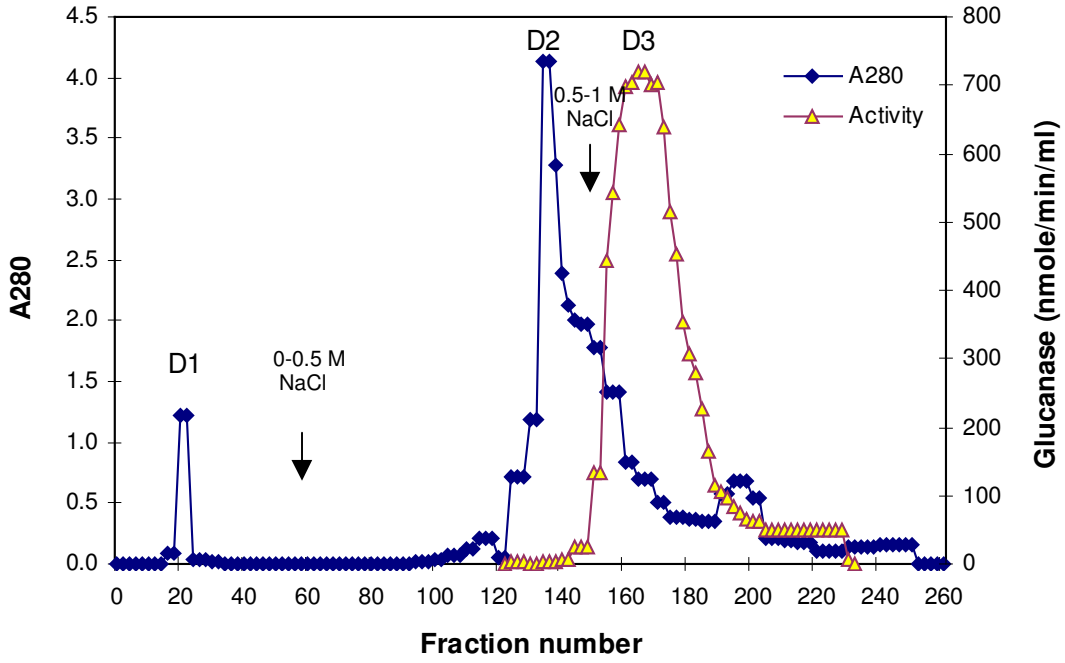
เดิม พบว่ายังมีโปรตีนที่เป็นหางพีคแรกถูกชะออกมาและมีโปรตีนพีคเล็กคือพีค D3 ถูกชะออกมาอีกพีคหนึ่ง โดยเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสถูกชะออกมาในบัฟเฟอร์ที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.60 M (รูปที่ 12) เมื่อรวมหลอดที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์สูง (พีค D3) เข้าด้วยกัน ทำให้เข้มข้นและไดแอไลซ์พบว่าสารละลายเอนไซม์เข้มข้นมีปริมาณโปรตีน 13.97 มิลลิกรัม คิดเป็น 4.91 % ของสารสกัดตับเริ่มต้น และมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเป็น 10.97 เท่าของสารสกัดตับเริ่มต้น (ตารางที่ 1) แต่เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ nondenaturing PAGE ปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบแสดงว่ายังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ ดังแสดงผลในรูปที่ 13 แถวที่ 3

จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยสามารถจับกับ DEAE-Sephacel ที่มีประจุบวกได้ดีที่ pH 7.5 เพราะไม่ถูกชะออกได้ด้วย TB-PMSF ที่มี 0-0.5 M NaCl เอนไซม์นี้ถูกชะออกจากคอลัมน์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ถึง 0.60 M (รูปที่ 12) ที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะมีความแรงของประจุมากพอที่จะไปแย่งจับกับประจุของ DEAE-Sephacel แล้วเข้าไปแทนที่เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสทำให้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสถูกชะออกมา ซึ่งแตกต่างกับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจาก *B. subtilise* NSRS89-24 ที่ถูกชะจากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วย NaCl ที่ความเข้มข้น 0.1-0.2 M (Leelauphakul *et al*., 2005) จากผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมีประจุเป็นลบในภาวะที่มี pH เป็น 7.5 เพราะจับกับ DEAE-Sephacel ที่เป็นประจุบวกได้ และแสดงให้เห็นว่า pH 7.5 มีค่าสูงกว่า pI (isoelectric pH) ของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ดังนั้น pI ของเอนไซม์ เบตา-1,3-กลูคาเนสควรมีค่าต่ำกว่า pH 7.5

ตารางที่ 1 การทำให้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์จากสารสกัดตับ

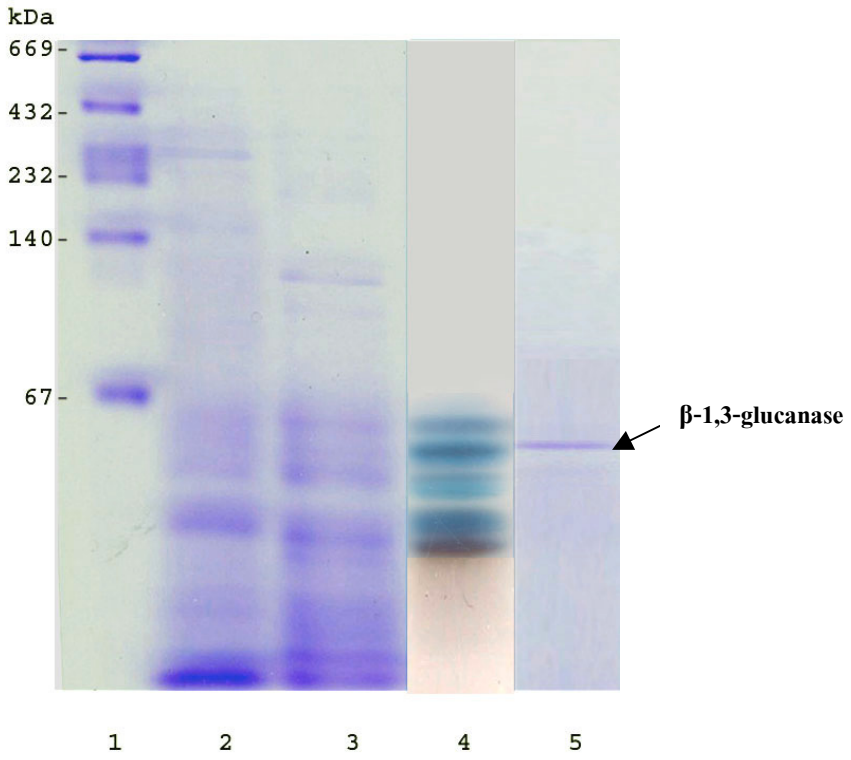
Purification step	Protein		Activity			Purification fold
	mg	% yield	unit	% yield	unit/mg	
Hepatopancreas extract	284.4	100	30,600	100	107.59	1
70% $(NH_4)_2SO4$ saturation	94.62	33.27	23,332	76.25	246.59	2.29
DEAE-Sephacel eluate	13.97	4.91	16,485	53.87	1,180.45	10.97
Superdex 200 HR10/30 eluate	0.492	0.172	3,988	13.04	16,221.43	150.76
Preparative PAGE	0.0056	0.002	208	0.68	37,142.86	345.21

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจาก 3 การทดลอง



รูปที่ 12 การแยกเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากสารสกัดตับด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel

นำสารสกัดตับปริมาตร 9 มิลลิลิตร (โปรตีน 94.62 มิลลิกรัม) ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 70% ไปแยกโดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2.6x 9 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF เก็บสารละลายหลอดละ 3 มิลลิลิตร จนค่า A280 เป็นศูนย์ แล้วชะด้วย NaCl ที่เพิ่มความเข้มข้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 0-0.5 M ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากนั้นชะต่อด้วย 0.5-1.0 M NaCl ปริมาตร150 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ด้วยอัตราไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 1.5 มิลลิลิตร



รูปที่ 13 แบบแผนโปรตีนใน Nondenaturing PAGE ของสารละลายเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ซึ่งทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ ที่ย้อมสีคูมาซีบลู

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 สารสกัดตับ

แถวที่ 3 สารละลายเอนไซม์พีค D3 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel

แถวที่ 4 สารละลายเอนไซม์พีค S1 จากคอลัมน์ Superdex 200 HR10/30

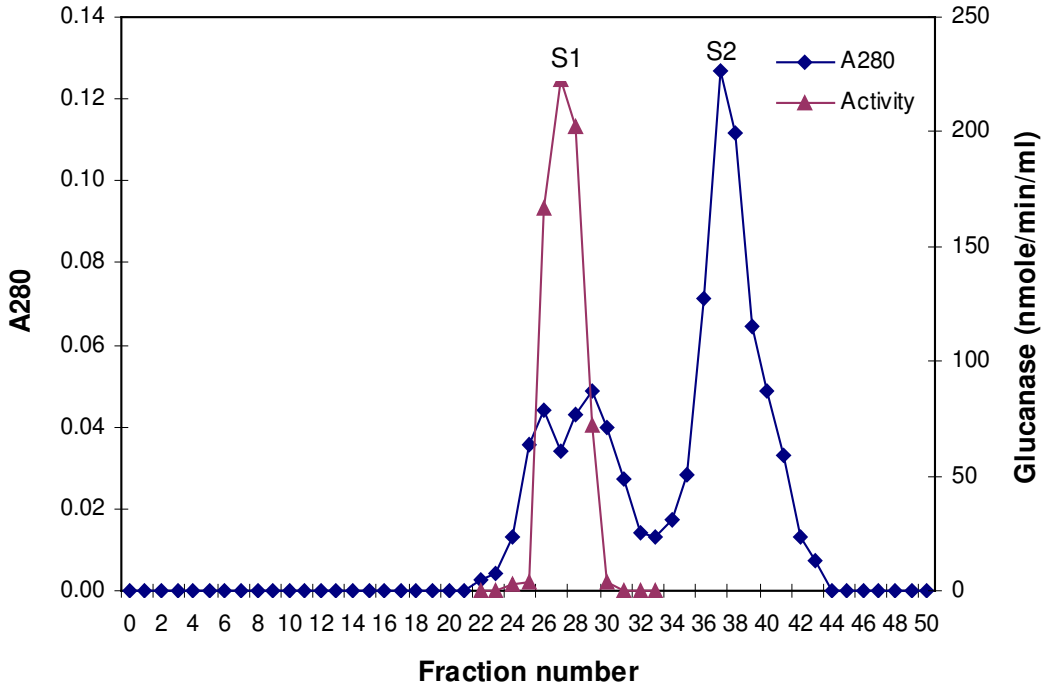
แถวที่ 5 สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทำ preparative PAGE

ถึงแม้การแยกเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส จากสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel จะยังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ (รูปที่ 13 แถวที่ 3) แต่สามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกไปได้ถึง 95.09% มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 10.97 เท่าของสารสกัดตับเริ่มต้น (ตารางที่ 1) ดังนั้นคอลัมน์ DEAE-Sephacel จึงเหมาะสำหรับใช้แยกเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วย

3.2 โดยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel (พีค D_3) ซึ่งมีโปรตีน 13.97 มิลลิกรัม ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีคโดยมีแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในพีคแรกคือพีค S1 (หลอดที่ 22-34)โดยหลอดที่ 28 เป็นหลอดที่มีแอคทิวิทีสูงสุด ดังแสดงผลในรูปที่ 14 เมื่อทำการรวมสารละลายในพีค S1 หลอดที่มีแอคทิวิทีสูงเข้าด้วยกัน พบว่าแอคทิวิทีจำเพาะมีค่าเป็น 16,221.43 nmol/min/mg protein และมีโปรตีน 0.492 มิลลิกรัม มีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสคิดเป็น 150.76 เท่าของสารสกัดเริ่มต้น (ตารางที่ 1) แต่เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์โดย nondenaturing PAGE พบว่ายังมีแถบโปรตีนปรากฏ 7 แถบ แสดงว่ายังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ (รูปที่ 13 แถวที่ 4) เมื่อเทียบกับแบบแผนโปรตีนของสารละลายเอนไซม์ก่อนแยกด้วยคอลัมน์นี้ พบว่าคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 สามารถกำจัดโปรตีนที่มีขนาดเล็กออกไปได้

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 ไปหาแถบโปรตีนของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ใน nondenaturing PAGE ตามวิธีการข้อ 7.5 พบว่าเฉพาะโปรตีนแถบที่มีลูกศรชี้ในรูปที่ 13 (แถวที่ 4) เท่านั้นที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์ บ่งชี้ว่าโปรตีนแถบนี้เป็นแถบของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส และจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนไซม์พีค S1 ที่แยกได้จากคอลัมน์ Superdex 20 HR 10/30 ยังมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kovalchuk *et al.* (2006) ที่พบว่าการใช้คอลัมน์ Sephadex G-75 ไม่สามารถแยกเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากหอย *M. yessoensis* ออกจากโปรตีนอื่นได้หมด แต่ต่างจากแบคทีเรีย *Arthorobacter* spp. ที่สามารถแยกเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-200 HR (Pang *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *B. subtilis* NSRS 89-24 ได้ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 (Leelasuphakul *et al.*, 2006) ดังนั้นการแยกเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสต่อด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 นี้ยังไม่ได้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่บริสุทธิ์ แต่ก็ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 150.76 เท่าของสารสกัดตับเริ่มต้น (ตารางที่ 1)

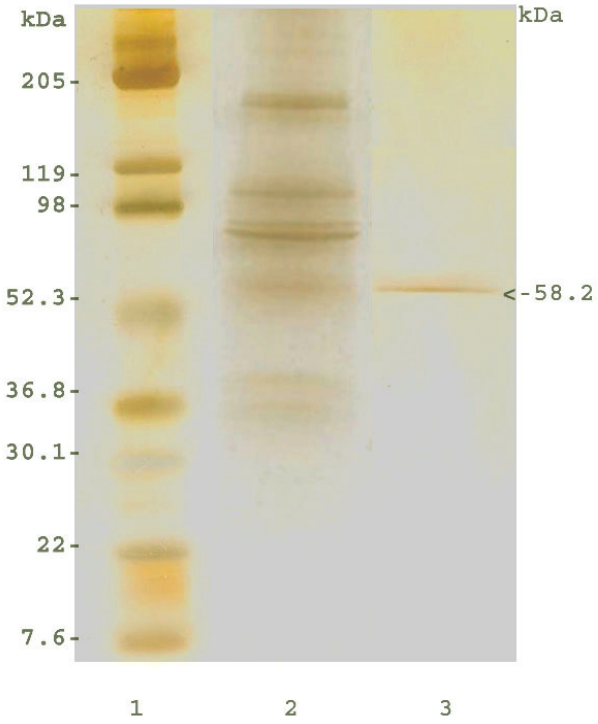


รูปที่ 14 การแยกสารละลายเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสพืค D3 ที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30

นำสารละลายเข้มข้นพืค D3 จากคอลัมน์ DEAE-Sephacel ปริมาณโปรตีน 13.97มิลลิกรัม) ไปแยกต่อด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 (1.0 x 40 เซนติเมตร) ล้างคอลัมน์ด้วย TB-PMSF ด้วยอัตราไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายหลอดละ 0.5 มิลลิลิตรจนค่า A280 เป็นศูนย์

3.3 โดยวิธี Preparative PAGE

จากการนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นพีค S1 ที่แยกได้จากคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 ไปแยกต่อโดยวิธี preparative PAGE โดยตัดเฉพาะแถบโปรตีนของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพียงแถบเดียว (โปรตีนแถบที่ชี้ด้วยลูกศร ในรูปที่ 13 แถวที่ 4) แล้วชะโปรตีนออกจากเนื้อเจลตามวิธีการข้อ 7.3 นำสารละลายที่ได้ไปทำให้เข้มข้น หาปริมาณโปรตีนและหาแอคทิวิทีพบว่าสารละลายที่เตรียมได้มีปริมาณโปรตีน 5.6 ไมโครกรัม และมีแอคทิวิทีจำเพาะเป็น 37,142.86 nmol/min/mg protein คิดความบริสุทธิ์เป็น 345.21 เท่าของสารสกัดตับเริ่มต้น (ตารางที่ 1) เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ไปทดสอบความบริสุทธิ์โดย nondenaturing PAGE ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อย้อมโปรตีนด้วยคูมาซีบลู (รูปที่ 13 แถวที่ 5) ที่ตรงกับแถบเอนไซม์ในรูปที่ 13 แถวที่ 4 แสดงว่าโปรตีนแถบนี้เป็นเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส เมื่อนำสารละลายเอนไซม์นี้ไปวิเคราะห์โดยการทำ SDS-PAGE ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเช่นกันเมื่อย้อมโปรตีนแบบซิลเวอร์ (รูปที่ 15 แถวที่ 3) บ่งชี้ว่าการทำ preparative PAGE สามารถแยกเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสได้บริสุทธิ์



รูปที่ 15 แบบแผนโปรตีนใน SDS-PAGE ของสารละลายเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ซึ่งทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ ที่ย้อมแบบซิลเวอร์

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 สารละลายเอนไซม์พีค S1 จากคอลัมน์ Superdex 200 HR10/30

แถวที่ 3 สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการทำ preparative PAGE

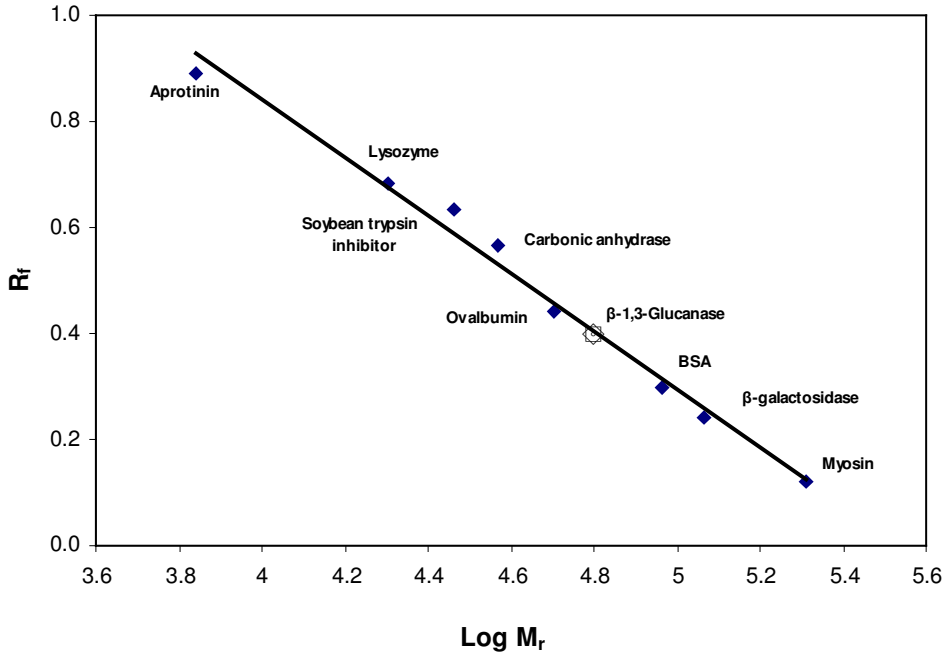
4. การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์

4.1 แบบแผนโปรตีนใน PAGE

จากการทำ nondenaturing PAGE ของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่แยกได้จากการทำ preparative PAGE ปรากฏโปรตีน 1 แถบ (รูปที่ 13 แถวที่ 5) บ่งชี้ว่าเอนไซม์ที่แยกได้เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์ และเมื่อนำเอนไซม์บริสุทธิ์ไปทำ SDS-PAGE ปรากฏโปรตีน 1 แถบเช่นกัน (รูปที่ 15 แถวที่ 3) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 58,200 ดัลตัน ผลที่ได้จากการทำ SDS-PAGE นี้บ่งชี้ว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ไม่มีหน่วยย่อย ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากไข่หอยแม่น (Talbot and Vacquier, 1982) จากหอย *M. yessoensis* (Kovalchuk *et al*., 2006) และหอยสองฝา *C. abbidus* (Privalova and Elyaova, 2003) ที่ไม่มีหน่วยย่อยและมีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 68,000, 36,000 และ 20,000 ดัลตันตามลำดับ หรือเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสของเชื้อรา *T. viride* (Kulminskaya *et al*., 2001) แบคทีเรีย *Arthrobacter* spp. (Pang *et al*., 2000) หรือยีสต์ *S. cerevisiae* (Mrsa *et al*., 1993) ที่ไม่มีหน่วยย่อยและมีน้ำหนักโมเลกุล 61,000, 32,500 และ 29,000 ดัลตัน ตามลำดับ

4.2 น้ำหนักโมเลกุล

จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ที่แยกได้จากการทำ preparative PAGE ด้วยการทำ SDS-PAGE แล้วคำนวณจากกราฟมาตรฐานในรูปที่ 16 พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 58,200 ดัลตัน ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสซึ่งทำให้บริสุทธิ์จากแหล่งอื่น เช่น จากไข่หอยแม่ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 68,000 ดัลตัน (Talbot and Vacquier, 1982) และจากเชื้อรา *T. viride* ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 61,000 ดัลตัน (Kulminskaya *et al*., 2001)

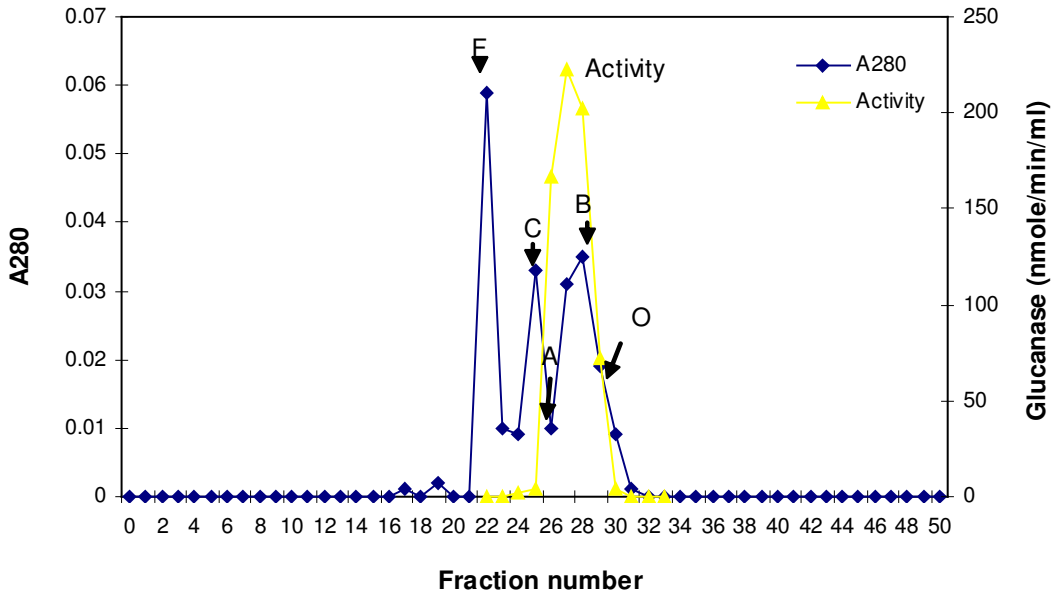


รูปที่ 16 กราฟมาตรฐานของการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ใน SDS-PAGE

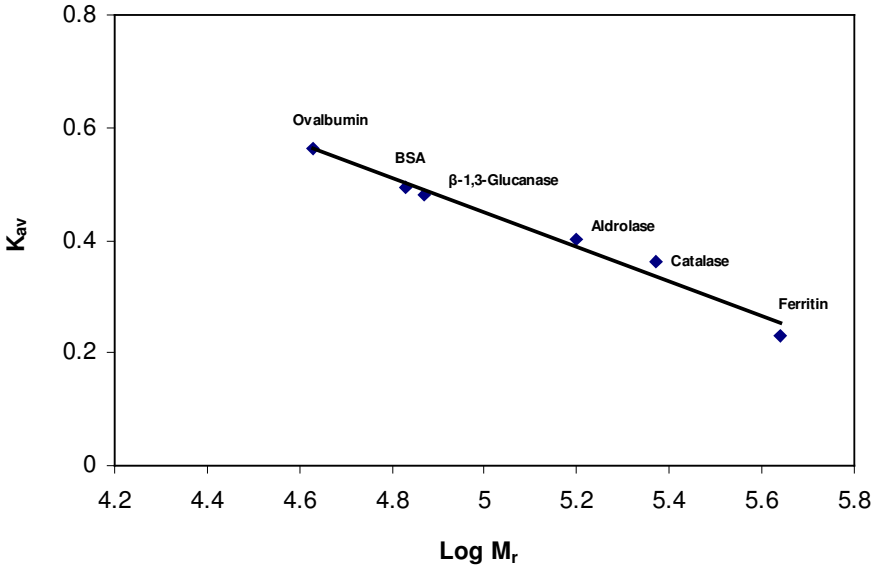
และจากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ ด้วยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 พบว่ามีพีคแอคทิวิทีถูกชะออกมาเพียงพีคเดียว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิดที่ใช้ พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมีน้ำหนักโมเลกุล 74,000 ดัลตัน ดังแสดงผลในรูปที่ 17

นอกจากนี้น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ที่หาโดยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 แม้จะมากกว่าแต่ก็ยังมีค่าใกล้เคียงกับการหาใน SDS-PAGE (58,200 ดัลตัน) ซึ่งช่วยยืนยันว่าเอนไซม์นี้ไม่มีหน่วยย่อย

A



B



รูปที่ 17 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสโดยคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 (A) และกราฟมาตรฐาน (B)

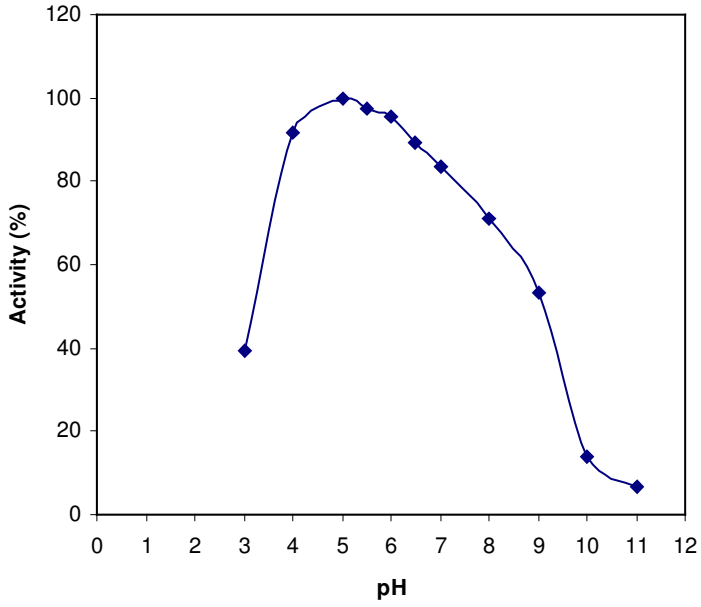
F = Ferritin; C = Catalase; A = Aldrolase; B = BSA; O = Ovalbumin

4.3 ผลของ pH

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์เร่งปฏิกิริยาได้แตกต่างกันในสารผสมปฏิกิริยาที่มี pH แตกต่างกันตั้งแต่ pH 3-11 พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์มีแอคทิวิทีต่ำสุดที่ pH 3 (39%) และมีค่าแอคทิวิทีเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อทำปฏิกิริยาที่ pH 4 และสูงที่สุดที่ pH 5 (100%) จากนั้นแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสลดลงเมื่อ pH มีค่าเพิ่มขึ้นจนมีแอคทิวิทีน้อยสุดที่ pH 11 (7%) ดังแสดงผลในรูปที่ 18

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5 ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์นี้ในสารสกัดตับที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ pH 6 (รูปที่ 9) อาจเป็นเพราะมีสารบางชนิดในสารสกัดตับที่มีผลทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 6 และสารนี้ถูกกำจัดไปในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 5 ใกล้เคียงกับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ที่พบจากแหล่งต่าง ๆ เช่นเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จากไข่หอยแม่น และหอย *M. yessoensis* ที่มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 5.4 และ pH 4.5 ตามลำดับ (Talbot and Vacquier, 1982; Kovalchuk *et al*., 2006) และของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* spp. และ *B. halodurans* C-125 ที่มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 6.5 และ pH 6-8 ตามลำดับ (Pang *et al*, 2004; Akita *et al*., 2005) เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในแบคทีเรีย *F. glucanolyticae* มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 5.5 (Nagata *et al*., 1990) และในแบคทีเรีย *B. circulans* IAM1165 มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 6.5 (Aono *et al*., 1992) จึงสรุปได้ว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสสามารถทำงานได้ดีที่ pH ค่อนข้างเป็นกรด

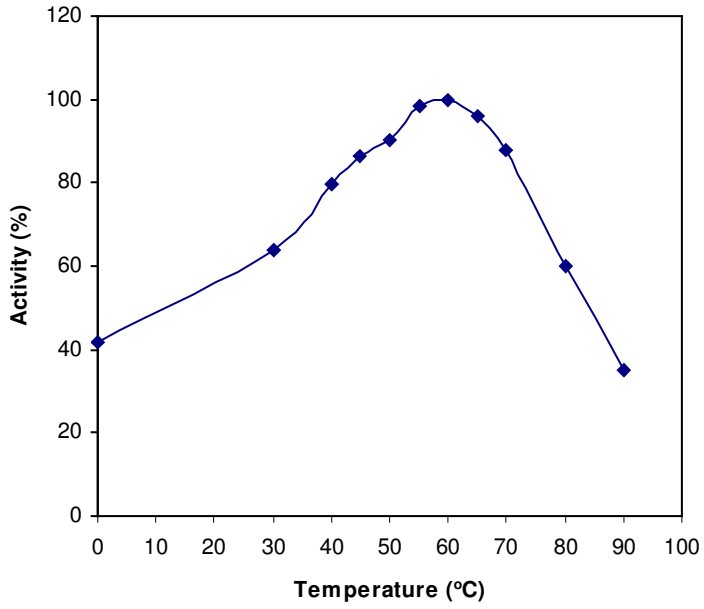


รูปที่ 18 ผลของ pH ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์

4.4 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ โดยการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-90 °ซ นาน 20 นาที หลังจากหยุดปฏิกิริยา และวัดค่า A540 พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์มีแอคทิวิทีต่ำสุดที่อุณหภูมิ 0 °ซ (42%) มีค่าเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในช่วง 30-55 °ซ และสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 °ซ (100%) จากนั้นแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสลดลงตามลำดับเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 °ซ จนมีค่าน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 90 °ซ (35%) (รูปที่ 19)

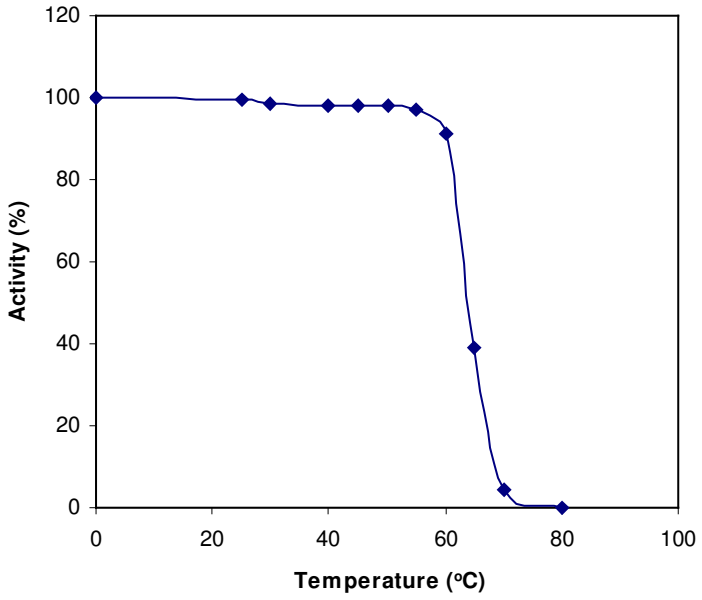
จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ (รูปที่ 19) และเอนไซม์นี้ในสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วย (รูปที่ 8) เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 °ซ เท่ากับของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จากไข่หอยแม่น (Talbot and Vacquier, 1982)เช่นเดียวกับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากแบคทีเรีย *B. halodurans* C-125 และเชื้อรา *A. fumigatus* ที่มีแอคทิวิทีสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 °ซ เช่นกัน (Akita *et al*., 2005; Fontaine *et al*., 1997) ในหนอนไม้สนมีแอคทิวิทีสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 °ซ ในแบคทีเรีย *Arthrobacter* spp. มีแอคทิวิทีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 °ซ (Pang *et al*, 2004) เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเพิ่มพลังงานจลน์ช่วยทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้เร็วขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้แอคทิวิทีของเอนไซม์ลดลง เพราะอุณหภูมิที่สูงเกินไปมีผลทำให้โครงรูปของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดลงจนไม่สามารถย่อยสับสเตรทได้เมื่อเอนไซม์เกิดการแปลงสภาพ



รูปที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์

4.5 ความเสถียรต่ออุณหภูมิ

จากการทดสอบความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ โดยการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25-80 °ซ นาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นโดยแช่บนน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปหาแอคทิวิทีที่เหลืออยู่เปรียบเทียบกับเอนไซม์ซึ่งเก็บไว้ที่ 0 °ซ นาน 15 นาที พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วง 0-55 °ซ และเริ่มมีแอคทิวิทีลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60-70 °ซ จนเสียแอคทิวิทีอย่างสมบูรณ์ที่ 80 °ซ (รูปที่ 20) ในทำนองเดียวกันเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อรา *A. fumigatus* ที่สูญเสียแอคทิวิทีที่อุณหภูมิ 55 °ซ (Fontaine *et al*., 1997) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมีโครงสร้างเป็นโปรตีนซึ่งถูกทำให้แปลงสภาพได้เมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงทำให้สูญเสียแอคทิวิที ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากแบคทีเรีย *Arthrobacter* spp., *B. halodurans* C-125 และ *B. subtilis* NSRS 89-24 ที่พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมีแอคทิวิทีลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °ซ (Pang *et al*., 2004; Akita *et al*., 2005; Leelasuphakul *et al*., 2006)

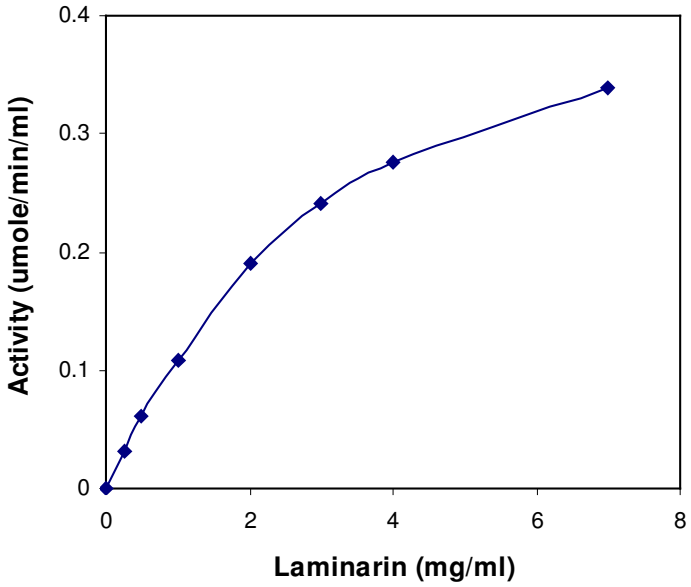


รูปที่ 20 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์

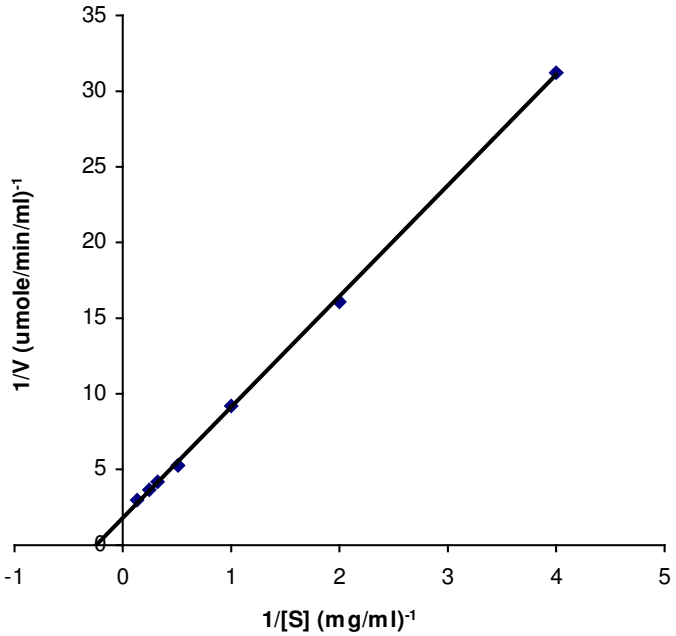
4.6 จลนศาสตร์

จากการศึกษาผลของสับสเตรทลามินารินต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์โดยการทำปฏิกิริยากับลามินารินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, และ 7.0 mg/ml พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์มีจลนศาสตร์แบบ hyperbola (รูปที่ 21A) เช่นเดียวกับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *B. subtilis* NSRS 89-24 (Leelasuphakul *et al*, 2006) และจากการหาค่า K_m และ V_{max} โดยการเขียนกราฟแบบ Lineweaver-Burk ระหว่างค่า 1/V และ 1/[S] (รูปที่ 21B) พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมีค่า K_m สำหรับลามินารินเท่ากับ 5 mg/ml และ ค่า V_{max} เท่ากับ 0.625 μmol/min/ml ซึ่งมีค่าสูงกว่าของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ที่แยกจากแบคทีเรีย *B. subtilis* NSRS 89-24 ที่พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมี K_m เท่ากับ 0.91 mg/ml และค่า V_{max} เท่ากับ 0.11 μmol/min/ml (Leelasuphakul *et al*, 2006) เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสของเชื้อรา *A. fumigatus* มี K_m เท่ากับ 0.3 mg/ml (Fontaine *et al*., 1997) ของหอย *M. yessoensis* มี K_m เท่ากับ 0.6 mg/ml (Kovalchuk *et al*., 2006) และของแบคทีเรีย *Arthrobacter* spp. มี K_m เท่ากับ 0.16 mg/ml (Pang *et al*, 2004)

A



B



รูปที่ 21 จลนศาสตร์ของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์แบบ Hyperbola (A)

และแบบ Lineweaver-Burk (B)

จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ที่แยกจากสารสกัดตับในงานวิทยานิพนธ์นี้ พอสรุปสมบัติต่าง ๆ ได้ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์

Properties	**β-1,3-glucanase**
Molecular weight	58,200 dalton
Number of subunit	1
Optimal pH	5.0
Optimal temperature	60 °C
Temperature stability	0-60 °C
Kinetic	Hyperbola
K_m	5 mg/ml
V_{max}	0.625 μmol/min/ml

5. การศึกษาบทบาทเบื้องต้นทางชีวภาพของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase

5.1 แอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส และเอนไซม์ NAGase ในกุ้งแชบ๊วย

จากการหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGaseในฮีโมลิมฟ์ (ซีรัม) และในสารสกัดจากตับ กระเพาะและกล้ามเนื้อของกุ้งแชบ๊วย ดังแสดงผลในตารางที่ 3 พบแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด โดยพบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับมากที่สุด รองลงมาได้แก่ กระเพาะ กล้ามเนื้อและซีรัม ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ NAGase พบแอคทิวิทีจำเพาะในกระเพาะมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ ตับ ซีรัมและกล้ามเนื้อ ตามลำดับ การที่พบแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองในกระเพาะและตับมากที่สุดแสดงถึงบทบาทของเอนไซม์นี้ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารที่เป็นส่วนเบตากลูแคนและส่วนของไคตินเพื่อการเจริญเติบโตของกุ้ง

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดพบว่าเอนไซม์ NAGase มีระดับแอคทิวิทีจำเพาะในทุกเนื้อเยื่อสูงกว่าของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมาก ๆ การพบแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในกล้ามเนื้อยังไม่สามารถคาดเดาบทบาทของเอนไซม์ได้แน่ชัด อาจเป็นระดับแอคทิวิทีพื้นฐานของเอนไซม์ที่มีทั่วไปเพื่อเมแทบอลิสม (metabolism) ของเซลล์ ในทำนองเดียวกับการพบเอนไซม์นี้ในซีรัมแต่ยังไม่สามารถบอกบทบาทของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในซีรัมของกุ้งในภาวะปกติทั้งที่ไม่ได้ติดเชื้อก่อโรคได้ ถึงแม้เอนไซม์ NAGase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินในขั้นตอนสุดท้ายเพื่อการลอกคราบแต่กุ้งที่ใช้ตลอดการทดลองนี้อยู่ในระยะคราบแข็ง ดังนั้นการมีเอนไซม์ NAGase ในซีรัมจึงไม่ควรเกี่ยวข้องกับการลอกคราบ

ตารางที่ 3 แอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในส่วนต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย

Sample	β-1,3-glucanase (nmol/min/mg protein)	NAGase * (nmol/min/mg protein)
Hepatopancreas	58.6±12.86	835.5 ± 5.0
Gut	24.96±15.74	952.0 ± 8.0
Muscle	5.77±0.44	12.1 ± 0.4
Hemolymph (serum)	0.97±0.15	24.9 ± 0.1

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐานที่ได้จากกุ้งตัวอย่าง การทดลองละ 3-5 ตัว

* ผลจากพงษธร ล้ำเลิศกิตติกุล (2548)

5.2 บทบาทของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส และเอนไซม์ NAGase ที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi*

จากการกระตุ้นกุ้งแชบ๊วยให้ติดเชื้อโดยการฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* แบบ active ปริมาณต่าง ๆ ในช่วง 3×10^9, 4×10^9 และ 5×10^9 เซลล์ พบว่าการฉีดกุ้งแต่ละตัวด้วย *V. harveyi* ที่ 5×10^9 เซลล์ เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ทำให้กุ้งติดเชื้อได้ดีแต่ไม่ตายภายใน 12 ชั่วโมง และเมื่อวัดระดับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดเชื้อด้วยปริมาณที่เหมาะสมนี้เทียบกับกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือและไม่แสดงอาการติดเชื้อ ณ เวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง หลังการฉีด พบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกุ้งชุดควบคุมมีระดับไม่แตกต่างกัน ณ เวลาต่าง ๆ ดังแสดงผลในตารางที่ 4 ในขณะที่แอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกุ้งที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อ *V. harveyi* เพิ่มสูงขึ้นจากระดับก่อนฉีด (0 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) โดยแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นเป็น 1.54 และ 2.57 เท่า ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด ตามลำดับ และของเอนไซม์ NAGase เพิ่มขึ้นเป็น 1.49 และ 1.99 เท่า ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลของพงษธร ล้ำเลิศกิตติกุล (2548) ที่พบว่าเอนไซม์ NAGase มีแอคทิวิทีจำเพาะเพิ่มสูงขึ้นทั้งในซีรัม (1.92 และ 2.00 เท่า) และในตับ (1.50 เท่า) เมื่อกุ้งแชบ๊วยได้รับเชื้อ *V. harveyi* ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในซีรัมน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแชบ๊วย ซึ่งสอดคล้องกับการกระตุ้นให้หากน้ำจืด (freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*) ติดเชื้อ schistosome parasite ที่พบว่ามีแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase และเอนไซม์ N-acetyl-β-D-galactosaminidase (ซึ่งย่อยสลายให้ผลผลิตเป็น N-acetyl galactosamine, NAcGal) เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในพลาสมาหลังการติดเชื้อ 2 วัน บ่งชี้ว่าน้ำตาล NAG และ NAcGal เกี่ยวข้องกับกลไกการจดจำและป้องกันตนเอง และยังพบว่าหลังการติดเชื้อ 4 วัน แอคทิวิทีของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ลดลงเท่ากับระดับภาวะก่อนติดเชื้อ ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่ schistosome parasite ถูกทำลายโดยฮีโมไซท์ (hemocyte) ของหากน้ำจืด (Zelck , 1999) ส่วนเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสยังไม่เคยมีรายงานการศึกษามาก่อนในครัสเตเชียนชนิดต่าง ๆ แต่พบว่าในถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) มีการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส G2 และไคติเนส Ch1 ซึ่งเป็นปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อต่อต้าน (defense response) การรุกรานจากเชื้อรา *Fusarium solani* และ *F. phasioli* โดยไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคและประสิทธิภาพในการยับยั้งจะสูงขึ้นเมื่อ

เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดทำงานร่วมกัน (Mauch *et al*., 1988) ในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeu vulgare*) เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจะถูกกระตุ้นให้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อถูกรุกรานจากเชื้อรา *Erysiphe graminisf* spp. *hordei* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราแป้ง และเมื่อได้ถูกรุกรานจากเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* พบว่ามีการแสดงออกของยีนของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นโดยเมื่อพืชได้รับการรุกรานจากเชื้อโรคพืชจะป้องกันตนเองโดยไปกระตุ้นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสให้มีการสร้างเอนไซม์ขึ้นมามากขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อก่อโรค และได้มีการเตรียม cDNA ของเอนไซม์นี้จากข้าวบาร์เลย์มาใช้เป็น hybridization probe เพื่อวัดการแสดงออกของยีนของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสของข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวเจ้าและข้าวฟ่างที่ถูกรุกรานจากเชื้อรา *B. sorokiniana* (Jutidamronphan *et a*l., 1991)

ในงานวิทยานิพนธ์นี้ยังพบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในตับของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* มีระดับสูงขึ้นกว่าของกุ้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p< 0.01$) เมื่อวัดที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังการฉีด โดยเพิ่มขึ้นเป็น 1.97 เท่า และ 1.50 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 4) เนื่องจากตับเป็นแหล่งสำคัญในการสร้างโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด ดังนั้นกุ้งแชบ๊วยอาจตอบสนองการติดเชื้อก่อโรค โดยมีการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในตับเพิ่มขึ้นจึงพบระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีในตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมและระดับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ที่เพิ่มขึ้นในซีรัมเนื่องมาจากการติดเชื้ออาจหลั่งมาจากตับของกุ้งแชบ๊วย เพราะจากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดในตับและในซีรัมของกุ้งแชบ๊วยมีสมบัติต่าง ๆ คล้ายกันมาก ดังนั้นการที่มีแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase เพิ่มขึ้นตอบสนองต่อการการติดเชื้อก่อโรคกุ้ง อาจมีผลต่อส่วนประกอบของเซลล์จุลชีพ เช่น ไคตินและ เบตา-1,3-กลูแคน (Lorito *et al*, 1994) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันตนเองต่อเชื้อก่อโรคเช่นเดียวกับพืช แต่กลไกของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ในซีรัมหรือในตับในการป้องกันตนเองของกุ้งแชบ๊วยต่อเชื้อก่อโรคเป็นเช่นไร ยังไม่สามารถสรุปได้ ณ ที่นี้ ซึ่งควรมีการศึกษาการแสดงออกระดับยีนของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในภาวะที่กุ้งมีการติดเชื้อต่อไป งานวิทยานิพนธ์นี้ได้ทำให้เอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์จากซีรัมตามวิธีของสุวรรณา ผลใหม่ (2547) และจากตับกุ้งแชบ๊วย (ตามวิธีการของพงษธร ล้ำเลิศกิตติกุล, 2548) ซึ่งไม่ได้แสดงผลไว้ แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ไม่สามารถหาการเรียงลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลายเอ็น (N-terminal amino acid sequence) ของเอนไซม์ NAGase บริสุทธิ์ได้เพราะมีการบล็อคที่ปลายเอ็นของเอนไซม์บริสุทธิ์ สำหรับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ขณะนี้ได้ส่งไปหาการเรียงลำดับของกรดอะมิโนทาง

ด้านปลายเอ็นแล้วแต่ใช้เวลาอีกประมาณ 2-3 เดือนจึงจะได้ผล ซึ่งจะรายงานผลต่อไปในผลงานตีพิมพ์

ตารางที่ 4 แอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ของกุ้งที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi*

Enzymes	Time after injection (hour)	Injection			
		Control (0.85% NaCl)		*V. harveyi*	
		Activity	Fold	Activity	Fold
β-1,3-Glucanase	0	0.97 ± 0.15	1	0.64 ± 0.41	1
in hemolymph	6	0.95 ± 0.19	0.98	0.98 ± 0.56	1.54
(nmol/min/ mg protein)	12	0.94 ± 0.25	0.97	*1.63 ± 0.60	*2.57
β-1,3-Glucanase in hepatopancreas (nmol/min/mg protein)	12	58.60 ±12.86	1	**115.25 ±20.39	**1.97
NAGase in hemolymph	0	13.84 ± 1.67	1	14.70 ± 5.19	1
(nmol/min/ mg protein)	6	13.36 ± 0.49	0.97	21.90 ± 7.99	1.49
	12	15.24 ± 0.40	1.10	*29.28 ± 9.62	*1.99
NAGase in hepatopancreas (nmol/min/mg protein)	12	791.46±28.12	1	**1,183.81 ± 95.71	**1.50

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ โดยใช้กุ้งตัวอย่างในการทดลองละ 3-5 ตัว

* เป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

** เป็นค่าที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

กุ้งที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* (ตัวละ $5x10^9$ เซลล์) แสดงผลการติดเชื้อในตับ

กุ้งที่ฉีดด้วยน้ำเกลือไม่แสดงผลการติดเชื้อในตับ

ผลการทดลองข้างต้นที่พบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในซีรัมของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดด้วย เชื้อ *V. harveyi* $5x10^9$ เซลล์ เพิ่มสูงขึ้นจากระดับก่อนฉีด (0 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่เมื่อได้ทดลองฉีดกุ้งแชบ๊วยด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ inactive ในปริมาณเดียวกันคือ $5x10^9$ เซลล์ พบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในซีรัมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามเวลาหลังการฉีดและทั้งในตับอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 5 ในทำนองเดียวกันพบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์ NAGase ก็มีค่าไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 6) อาจเนื่องจากเชื้อก่อโรค *V. harveyi* แบบ inactive ไม่สามารถเพิ่มปริมาณในตัวกุ้งได้ จึงอาจมีปริมาณไม่มากพอที่จะส่งผลให้กุ้งตอบสนองโดยการเพิ่มแอคทิวิทีของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเพื่อต่อต้านเชื้อดังกล่าว ซึ่งต่างจากการฉีดด้วยเชื้อ *V. harveyi* แบบ active ที่เชื้อสามารถเพิ่มปริมาณในตัวกุ้งได้ หลังจากที่กุ้งได้รับเชื้อเข้าไปนาน 6 และ 12 ชั่วโมง จึงมีผลมากพอที่ทำให้กุ้งแชบ๊วยมีการตอบสนองเชื้อก่อโรคโดยมีระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในระดับที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกุ้งที่ไม่ติดเชื้อหรือชุดควบคุม

จากการฉีดกุ้งแชบ๊วยด้วยแบคทีเรียไม่ก่อโรคกุ้งคือ *E. coli* และเชื้ออหิวาต์ในคน *V. cholerae* ด้วยปริมาณเดิมคือ $5x10^9$ เซลล์หรือการฉีดด้วยไวรัสก่อโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งแชบ๊วย WSSV (Lightner, 1999) ด้วยปริมาณตัวละ $1x10^{-3}$ เท่าของ stock ซึ่งเป็นปริมาณที่ใช้ในการกระตุ้นให้กุ้งกุลาดำเกิดโรคและตายภายใน 3 วัน (กิจการ ศุภมาตย์, 2542) พบผลทำนองเดียวกันคือทั้งเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส (ตารางที่ 5) และเอนไซม์ NAGase (ตารางที่ 6) มีแอคทิวิทีจำเพาะเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญตามเวลาหลังการฉีดและทั้งในซีรัมและในตับ เป็นไปได้ว่าเป็นการตอบสนองเบื้องต้นพื้นฐานของกุ้งที่เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมบุกรุกเข้าสู่ร่างกายซึ่งต้องมีการกำจัดออกแม้จะเป็นจุลชีพไม่ก่อโรคก็ตาม จึงมีระดับเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญสำหรับ WSSV แม้จะใช้ในปริมาณที่ทำให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำได้แต่อาจมีปริมาณไม่มากพอที่จะทำให้เกิดการตอบสนองในกุ้งแชบ๊วยในช่วงเวลาที่ศึกษา ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของกุ้งแชบ๊วยโดยตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคที่รุกราน เช่น *V. harveyi* แบบ active แต่ไม่มีผลจากจุลชีพไม่ก่อโรคในกุ้งแชบ๊วย เช่น *E. coli* , *V. cholerae* หรือ WSSV ซึ่งคล้ายกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณเลคตินในซีรัม (Utarabhand *et al*., 2007) ที่มีบทบาทป้องกันตนเองในกุ้งแชบ๊วยต่อ *V. harveyi* เช่นกัน (Rittidach *et al*., 2007)

5.3 บทบาทของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะเครียด

นอกเหนือจากการเกี่ยวข้องกับการตอบสนองเพื่อป้องกันตนเองของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสต่อเชื้อก่อโรคกุ้งแล้ว ในระยะแรกของงานวิทยานิพนธ์พบว่าการนำกุ้งจากบ่อเลี้ยงมาทำการทดลองจะพบระดับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสลดลงตามเวลาที่ปล่อยให้กุ้งพักปรับสภาพในถังเลี้ยงใหม่ ผลดังกล่าวแสดงถึงระดับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่เกี่ยวข้องกับการตกใจของกุ้งจึงได้ทำให้กุ้งแชบ๊วยซึ่งเลี้ยงไว้และปล่อยให้อยู่ในระยะพักจนสงบไม่น้อยกว่า 3 ชั่วโมง เกิดภาวะเครียดโดยทำให้ตกใจด้วยการเขย่าถังเลี้ยงอย่างแรงแล้วเจาะฮีโมลิมฟ์ ณ เวลา 20 นาที, 3 และ 6 ชั่วโมงหลังการเขย่า จากนั้นเขย่าซ้ำและเจาะฮีโมลิมฟ์วิธีการเช่นเดิม เมื่อวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์หรือซีรัมเหล่านี้พบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพิ่มสูงขึ้น 1.22 เท่าอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ที่เวลา 20 นาทีหลังการเขย่าหรือการทำให้ตกใจครั้งแรกเพิ่มขึ้นจากนั้นแอคทิวิทีลดลงตามเวลาตามลำดับจนใกล้เคียงกับระดับก่อนเกิดการตกใจดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 22 และการทำให้ตกใจรอบที่ 2 ก็ให้ผลในทำนองเดียวกันแม้จะมีแอคทิวิทีต่ำกว่าในรอบแรกแต่ก็เพิ่มขึ้นเมื่อวัดที่ 20 นาทีแรกแล้วลดลง ในการทดลองทั้งหมดนี้ได้วัดระดับน้ำตาลในฮีโมลิมฟ์ที่เวลาต่าง ๆ ควบคู่ไปด้วย โดยวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในซีรัมเช่นเดียวกับการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสแต่ไม่ใส่สับสเตรทแล้วนำค่าที่ได้ไปหักลบออกก่อนคิดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในพืชที่ถูกรุกรานจากเชื้อก่อโรค เช่น เชื้อรา แบคทีเรียและไวรัสแล้วยังเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกดดันจากสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เช่นด้วยสารเคมีฮอร์โมนหรือการเกิดบาดแผล (David *et al*., 1993) จากการศึกษาของ Mauch และ Staehelin (1989) ในใบถั่วที่พบว่าหลังจากใบถั่วได้รับเอธิลีน (ethylene) ความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 2 วัน พบว่า จะมีการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มขึ้น 40-50 เท่าและ 30-40 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับใบถั่วที่ไม่ได้รับสารเคมีดังกล่าว และเอนไซม์ทั้งสองยังถูกสร้างเพิ่มมากขึ้นอย่างคงที่นานถึง 72 ชั่วโมง

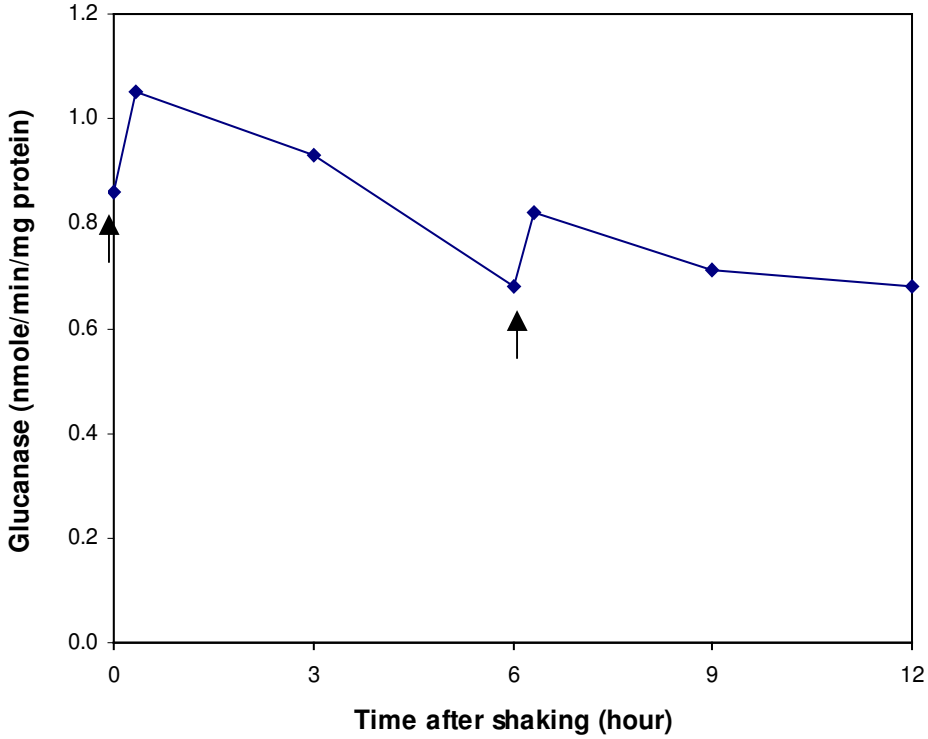
เมื่อทำการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ในตัวอย่างซีรัมเดียวกันนี้พบว่าระดับแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์ NAGase ในซีรัม ณ เวลาต่าง ๆ หลังการเขย่ามีค่าไม่แตกต่างกัน (ผลการทดลองไม่ได้แสดงไว้) บ่งชี้ว่าเอนไซม์ NAGase ไม่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะเครียดและระดับของน้ำตาลกลูโคสในฮีโมลิมฟ์

จากผลการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในกุ้งแชบ๊วยเมื่อถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดอาจเป็นการตอบสนองของกุ้งเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในพืชคือเพิ่มขึ้นจากภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อม โดยแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่เพิ่มขึ้นเพื่อไปกระตุ้นเมแทบอลิสมให้เกิดขึ้นในเซลล์เพื่อรักษาภาวะสมดุลของระดับน้ำตาลในกระแสเลือดให้คงที่ ทั้งนี้เพราะเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลขนาดเล็กที่ใช้ในเมแทบอลิสมของเซลล์

ตารางที่ 7 แอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส ในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียด

	Time after shaking	β-1,3-Glucanase (nmol/min/mg protein)	Fold
First shaking	0 hour	0.86±0.18	1.0
	20 min	*1.05±0.19	1.22
	3 hour	0.93±0.19	1.08
	6 hour	0.68±0.16	0.79
Second shaking	0 hour	0.68±0.16	1.0
	20 min	*0.82±0.16	1.20
	3 hour	0.71±0.29	1.04
	6 hour	0.68±0.30	1.00

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าผิดพลาดมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ โดยใช้กุ้งตัวอย่าง 3-4 ตัว
* เป็นค่าแสดงนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 22 แอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในซีรัมของกุ้งแชบ๊วยหลังการกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียดที่เวลาต่าง ๆ

↑ ลูกศรชี้แสดงเวลาที่เขย่าให้กุ้งแชบ๊วยเกิดภาวะเครียด