ผลการฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi* ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในกุ้งแชบ๊วย

Effect of *Vibrio harveyi* Injection on β-1,3-Glucanase Activity in Banana Shrimp *Fenneropenaeus merguiensis*

อรัญญา คงแก้ว [1] และ ประภาพร อุทารพันธุ์ [1*]
Arunya Kongkaew [1] and Prapaporn Utarabhand [1*]

บทคัดย่อ

การป้องกันตนเองของครัสเตเชียนขึ้นกับระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะ ซึ่งประกอบด้วยการทำงานของโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแชบ๊วย จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์และในสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วย พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสทำงานได้ดี เมื่อใช้ลามินารินเป็นสับสเตรท ใน 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60°ซ นาน 20 นาที พบแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมากสุดในสารสกัดตับ (58.6 ± 12.86 U/mg) พบน้อยกว่าในกระเพาะ กล้ามเนื้อ และฮีโมลิมฟ์ ซึ่งมีค่าเป็น 24.96 ± 15.74, 5.77 ± 0.44 และ 0.97 ± 0.15 U/mg ตามลำดับ แอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์และสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 2.57 และ 1.97 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl ในขณะที่แอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์นี้ของกุ้งชุดควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกันที่เวลาต่างๆ หลังการฉีดด้วยน้ำเกลือ ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่เพิ่มสูงขึ้นในฮีโมลิมฟ์หรือในตับน่าจะเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้ง

คำสำคัญ: เอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนส, กุ้งแชบ๊วย, จุลินทรีย์ก่อโรค, *Vibrio harveyi*

---

[1] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

[1] Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): prapaporn.u@psu.ac.th Tel: 0 7428 8270

ABSTRACT

The defense system of crustacean is dependent on the innate immune response that involves by many proteins and enzymes. In this report, β-1,3-glucanase was studied for its roles in defense mechanism against pathogenic infection of banana shrimp. Optimal conditions for assay of β-1,3-glucanase activity in the hemolymph and hepatopancreas extract were by using laminarin as a substrate in 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 and incubation at 60°C for 20 min. Specific activity of β-1,3-glucanase was mostly detected in the hepatopancreases extract (58.6 ± 12.86 U/mg) whereas less was found in the stomach, muscle and hemolymph as 24.96 ± 15.74, 5.77 ± 0.44 and 0.97 ± 0.15 U/mg, respectively. β-1,3-Glucanase specific activities in the hemolymph and hepatopancreas extract of banana shrimp challenged by *Vibrio harveyi* were significantly increased 2.57 and 1.97 folds, respectively. These were much higher than those of controls which were injected with 0.85% NaCl. Moreover, specific activities of β-1,3-glucanase of the controls were not different at any times post-saline injection. These results indicate that the increase of β-1,3-glucanase activity levels in the hemolymph or hepatopancreas may respond to the pathogenic infection as a defense mechanism in banana shrimp.

Key words: β-1, 3-Glucanase, *Fenneropenaeus merguiensis*, pathogen, *Vibrio harveyi*

บทนำ

กุ้งแชบ๊วย (banana shrimp, *Fenneropenaeus merguiensis*) เป็นกุ้งเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการส่งออกกุ้งทะเลของประเทศไทย ซึ่งสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นอย่างมาก เพราะมีราคาแพงและรสชาติดีกว่ากุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp, *Penaeus monodon*) หรือกุ้งขาว (white shrimp, *Litopenaeus vannamei*) ซึ่งเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยง ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวประสบปัญหาการติดเชื้อก่อโรค ซึ่งมีผลกระทบก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งเป็นอย่างมาก กุ้งแชบ๊วยซึ่งเป็นกุ้งท้องถิ่นของไทยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเพื่อการส่งออกแทนการจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีปริมาณลดลงตลอดเวลา ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงจนสามารถเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นได้ แต่ก็มีปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยากเพราะการเพาะเลี้ยงแบบนี้ทำให้กุ้งเครียดและอ่อนแอ จึงมักเกิดโรคระบาดที่เกิดจากการติดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคกุ้งได้ง่าย จุลินทรีย์สายพันธุ์หลักที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งเพาะเลี้ยงในไทยคือแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* และไวรัสก่อโรคตัวแดงดวงขาว (white spot syndrome virus, WSSV) การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง จึงมีความสำคัญเพื่อใช้เป็นแนวทางในการป้องกันการติดเชื้อต่อไป

กุ้งมีระบบไหลเวียนเลือดแบบเปิดเรียก

ฮีโมลิมฟ์ (hemolymph) อาศัยระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเพื่อป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค 2 แบบ คือ cellular immunity โดยอาศัยเซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์ (hemocyte) ในการทำลายเชื้อก่อโรค และแบบ humoral immunity โดยอาศัยโปรตีนและเอนไซม์บางชนิดที่เรียกว่า pattern recognition proteins (PRPs) เพื่อจดจำความแตกต่างขององค์ประกอบบนผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด เช่น ลิโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) เบตา-1,3-กลูแคน (β-1,3-glucan) เป็นต้น (Medzhitov and Janeway, 2002) PRPs ช่วยเซลล์ฮีโมไซท์ในการกำจัดจุลินทรีย์บุกรุก หรือเป็นตัวทำลายเชื้อบุกรุกโดยตรง ในสภาวะปกติจะมีปริมาณ PRPs น้อย แต่ถูกหลั่งจากเซลล์ฮีโมไซท์หรือจากตับทำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์ในสภาวะที่มีการติดเชื้อหรือถูกกระตุ้น เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคา เนส (β-1,3-glucanase) เป็น PRP ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของพืชเพื่อต่อต้านเชื้อราหรือแบคทีเรียก่อโรคพืช และยังถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ (marker) ในการคัดเลือกพืชพันธุ์ต้านทานโรค อาทิเช่น มะม่วง รวมถึงเป็นตัวบ่งชี้ในการบ่งบอกประสิทธิภาพของตัวกระตุ้นต่างๆ ในการชักนำให้พืชสร้างกลไกการป้องกันตนเอง (defense mechanism) ได้ เนื่องจากพบว่าระดับการแสดงออกของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสสอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรครวมถึงอาการของโรคในพืช (Oostendrop *et al*., 2001; Buzi *et al*., 2004; Pozo *et al*., 2005; Aleandri *et al*., 2010; Ebrahim *et al*., 2011)

ในสัตว์ทะเลมีการศึกษาเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสไม่มากนัก เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสของอาร์โธรพอดสามารถย่อยสลายพันธะเบตา-1,3-ไกลโคซิดิก (β-1,3-glycosidic bond) ของเบตา-1,3-กลูแคนของจุลินทรีย์ได้ และมีระดับเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์เมื่อได้รับเชื้อ *Helix pomatia* (Brimacombe, 1975) นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่ cortical granule ของไข่หอยเม่น (sea urchin egg) ซึ่งเมื่อเกิดการผสมพันธุ์ของไข่ เอนไซม์นี้จะถูกหลั่งจาก granule เพื่อไปจับอยู่กับ hyaline layer ของไข่ โดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันไข่ (Wessel *et al*., 1987) ในครัสเตเชียนโดยเฉพาะกุ้งยังไม่มีรายงานการศึกษาเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส อาจเป็นเพราะในสภาวะปกติ กุ้งมีระดับแอคทิวิที (activity) ของเอนไซม์ชนิดนี้ในฮีโมลิมฟ์ต่ำทำให้ยากต่อการศึกษา คณะผู้วิจัยได้ศึกษาบทบาทของโปรตีน PRPs หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งแชบ๊วย จึงสนใจที่จะศึกษาบทบาทของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในการป้องกันตนเองของกุ้ง เพื่อจะได้เชื่อมโยงกลไกการทำงานของโปรตีนเหล่านี้ในระบบภูมิคุ้มกันได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น โดยเลือกศึกษาในกุ้งแชบ๊วยซึ่งเป็นกุ้งเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ เบตา-1,3-กลูคาเนส เพื่อนำไปใช้วัดระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์นี้ในฮีโมลิมฟ์และในเนื้อเยื่อของกุ้งปกติ และศึกษาผลการเหนี่ยวนำให้ติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์ เบตา-1,3-กลูคาเนสในกุ้งแชบ๊วย ซึ่งเป็นการตรวจสอบบทบาทเบื้องต้นในระบบภูมิคุ้มกันกุ้งของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส เพื่อนำไปสู่การศึกษาระดับโปรตีนและยีนของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งแชบ๊วยอย่างละเอียดต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. กุ้งตัวอย่าง

กุ้งที่ใช้ศึกษาคือ กุ้งแชบ๊วยเพศผู้ที่มีน้ำหนักประมาณ 20-30 กรัม ไม่อยู่ในระยะลอกคราบ จับจากทะเล อันดามัน นำมาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 100 ลิตร โดยให้อาหารเม็ดทุก 8 ชั่วโมง ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. การเตรียมตัวอย่างจากกุ้งแชบ๊วย

ในการเตรียมฮีโมลิมฟ์ ดูดเลือดจากกุ้งแชบ๊วยด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มีเข็มขนาด 24G ความยาว 1 นิ้ว จากบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 ปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่ 4°ซ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเซนตริฟิวจ์ (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 20 นาที เก็บส่วนใสหรือฮีโมลิมฟ์ไว้ที่ -20°ซ สำหรับสารสกัดเนื้อเยื่อ เตรียมโดยตัดตับ กระเพาะ และกล้ามเนื้อจากกุ้ง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ TBS (50 mM Tris-HCI, pH 7.5 - 0.85% NaCI) ที่มี 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) แล้วโฮโมจีไนซ์ (homogenize) ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม หลังการเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 20 นาที นำส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดเนื้อเยื่อเก็บไว้ที่ -20°ซ เพื่อใช้วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสต่อไป

3. การวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

วัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส โดยใช้ลามินาริน (laminarin) เป็นสับสเตรท ทำโดยใช้เอนไซม์ตัวอย่าง 30 ไมโครลิตร ในสารผสมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 4 mg/ml laminarin ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ 0.1 M sodium acetate, pH 6 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60°ซ นาน 20 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือด 2 นาที ตั้งให้เย็นแล้วเติม 40 mM DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที ตั้งให้เย็นบนน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (A540) คำนวณแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสจากกราฟมาตรฐานกลูโคส กำหนดให้ค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ 1 หน่วย (U = nmol/min) เท่ากับปริมาณกลูโคส 1 นาโนโมล (nmole) ที่เกิดจากการที่เอนไซม์สามารถย่อยสลายลามินารินได้ในเวลา 1 นาที ส่วนแอคทิวิทีจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์คิดเป็นค่าแอคทิวิทีต่อมิลลิกรัมโปรตีนของเอนไซม์ตัวอย่างที่ใช้ (U/mg)

กราฟมาตรฐานกลูโคสทำโดยเตรียม 5 mM D-glucose ใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6 ให้มีปริมาณต่างๆ กันในช่วง 0-500 นาโนโมล ในปริมาตร 210 ไมโครลิตร แล้วผสมกับ 40 mM DNS ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งให้เย็นบนน้ำแข็ง เติมน้ำกลั่น 650 ไมโครลิตร แล้ววัดค่า A540 พล็อตกราฟระหว่างค่า A540 กับปริมาณกลูโคสที่ใช้

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

จากการศึกษาเบื้องต้นพบแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมากสุดในสารสกัดตับและพบน้อยกว่าในฮีโมลิมฟ์ แต่งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์ในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ฉีดเชื้อก่อโรค ดังนั้นจึงได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ทั้งในสารสกัดตับและในฮีโมลิมฟ์ โดยวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสตาม

วิธีการข้อ 3 โดยใช้ 2-3 ตัวอย่างในแต่ละการทดลอง แต่หาสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ในประเด็นต่อไปนี้คือ

4.1 หาปริมาณเอนไซม์ตัวอย่างที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิที โดยใช้ฮีโมลิมฟ์หรือสารสกัดตับที่มีโปรตีนปริมาณต่างๆ

4.2 หาปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาเมื่อใช้ 4 mg/ml laminarin ปริมาตรต่างๆ ในช่วง 0-50 ไมโครลิตร

4.3 หา pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยใช้สารผสมปฏิกิริยาที่มีบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ในช่วง pH 3-11

4.4 หาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ ใน ช่วง 0-90°ซ

4.5 หาเวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยทำปฏิกิริยาที่เวลาต่างๆ ในช่วง 0-50 นาที

5. การศึกษาผลการฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนส

เลี้ยงกุ้งที่คัดขนาดใกล้เคียงกัน (ตัวละประมาณ 25 กรัม) ในถังละ 4-5 ตัว ให้อาหารทุก 8 ชั่วโมง ปล่อยให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม 3 วัน โดยสังเกตว่ากุ้งแข็งแรงไม่มีอาการอ่อนเพลีย ว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ จากนั้นนำ *V. harveyi* (5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหางเพื่อกระตุ้นให้กุ้งติดโรค ตามวิธีการของ Rattanaporn and Utarabhand (2011) สำหรับกุ้งชุดควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ (0.85% NaCl) ปริมาตรเท่ากัน ดูดเลือดจากกุ้งตัวเดียวกันที่เวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง หลังการฉีด กลุ่มละ 3-5 ตัว หลังจากดูดเลือดจากกุ้งที่เวลา 12 ชั่วโมง ตัดตับจากกุ้งแต่ละตัว นำเลือดและตับไปเตรียมเอนไซม์ตัวอย่างตามวิธีการข้อ 2 เพื่อหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสต่อไป

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

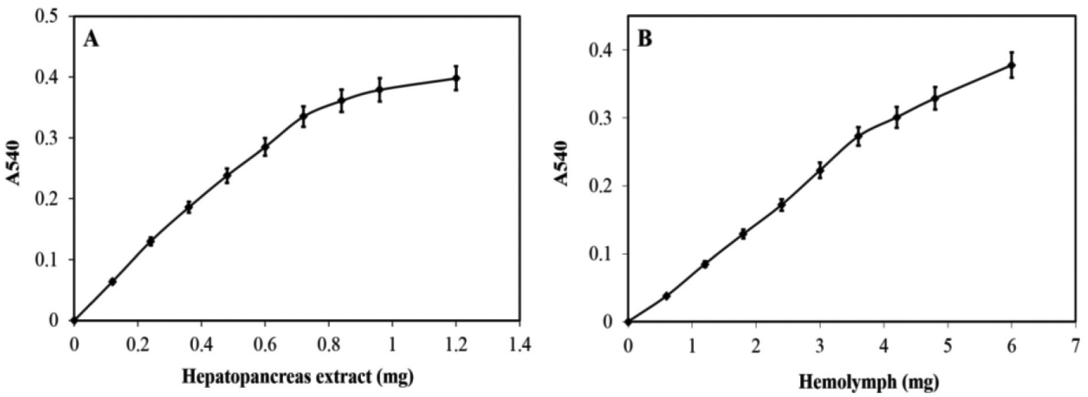
1. สภาวะที่เหมาะสมของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส

จากการหาปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมของสารสกัดตับและฮีโมลิมฟ์เพื่อวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนส โดยการเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีนพอเหมาะแล้วนำไปหาแอคทิวิทีของเอนไซม์ พบว่าค่า A 540 แปรผันเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนในสารสกัดตับในช่วง 0-0.72 มิลลิกรัม และเพิ่มสูงสุดและเริ่มคงที่ที่ปริมาณมากกว่า 0.72 มิลลิกรัม (ภาพที่ 1A) ดังนั้นปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมในสารสกัดตับที่ใช้วัดแอคทิวิทีคือ 0.7 มิลลิกรัม เช่น เดียวกับฮีโมลิมฟ์ที่ใช้ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมคือ 3.6 มิลลิกรัม (ภาพที่ 1B) ในทำนองเดียวกันกับสับสเตรท พบว่าควรใช้ 4 mg/ml laminarin ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ภาพที่ 2) ในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์

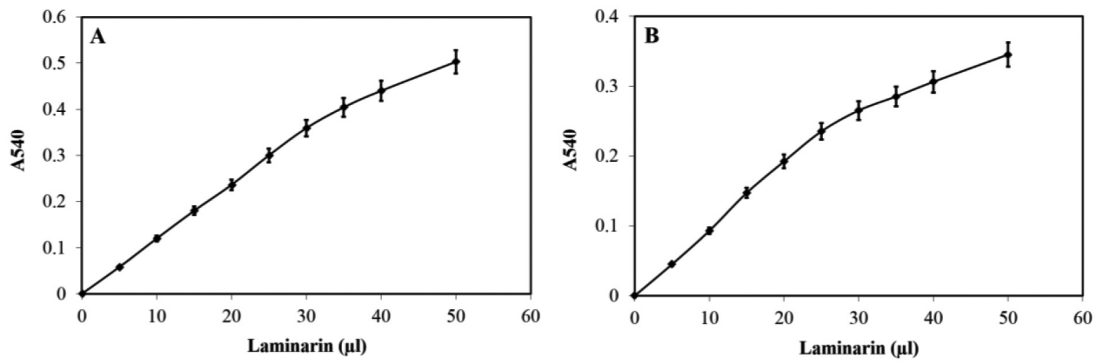
จากการวัดแอคทิวิทีที่ pH ต่างๆ พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยทำงานได้ดีที่ pH ในช่วง 5-8 และดีที่สุดที่ pH 6.0 (ภาพที่ 3) ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์นี้ที่พบในแหล่งต่างๆ เช่น จากหอยแครง (scallop *Mizuopecten yessoensis*) มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 4.5 (Kovalchuk *et al*., 2006) จากยีสต์ (*Arthrobacter* spp.) มีแอคทิวิทีสูงสุดที่ pH 6.5 (Pang *et al*., 2004) ส่วนจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีแอคทิวิทีสูงสุดในช่วงกว้างคือ 6.5-9.5 (Leelasuphakul *et al*., 2006) นอกจากนี้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและ

ฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 50-70°ซ และดีที่สุดที่ 60°ซ (ภาพที่ 4) ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์นี้ที่ทำงานดีที่สุดในหอยแครง *M. yessoensis* ที่ 45°ซ (Kovalchuk *et al*., 2006) ในยีสต์ (*Arthrobacter* spp.) ที่ 55°ซ (Pang *et al*., 2004) และในไข่หอยเม่นที่ 60°ซ (Talbot and Vacquier, 1982)

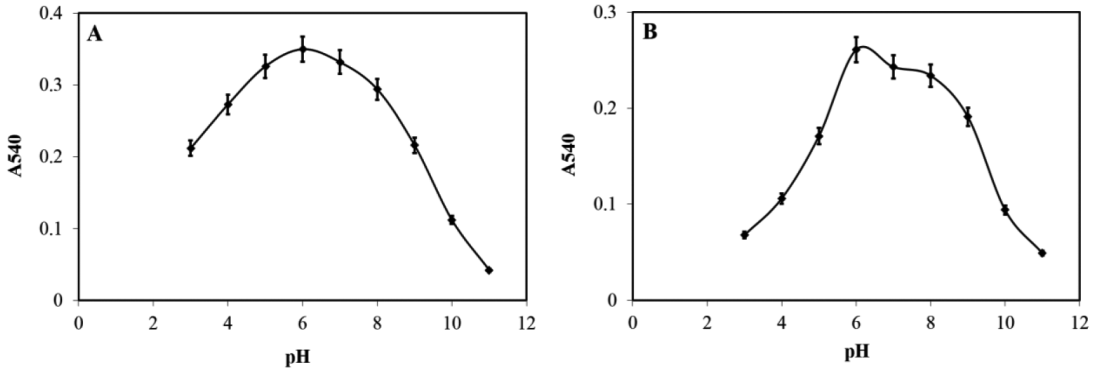
โดยสรุปพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย เป็นดังนี้คือ ใช้ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมของสารสกัดตับคือ 0.7 มิลลิกรัม (ภาพที่ 1A) หรือของฮีโมลิมฟ์คือ 3.6 มิลลิกรัม (ภาพที่ 1B) ในปริมาตร 30 ไมโครลิตร และใช้สับสเตรทลามินารินที่ความเข้มข้น 4 mg/ml ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ภาพที่ 2) ทำปฏิกิริยาในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 (ภาพที่ 3) ที่อุณหภูมิ 60°ซ (ภาพที่ 4) แล้วปล่อยให้เกิดปฏิกิริยานาน 20 นาที (ภาพที่ 5) ซึ่งผลงานวิจัยที่เหลือทั้งหมดได้ใช้สภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้ในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและฮีโมลิมฟ์ ส่วนการเตรียมกราฟมาตรฐาน เมื่อใช้



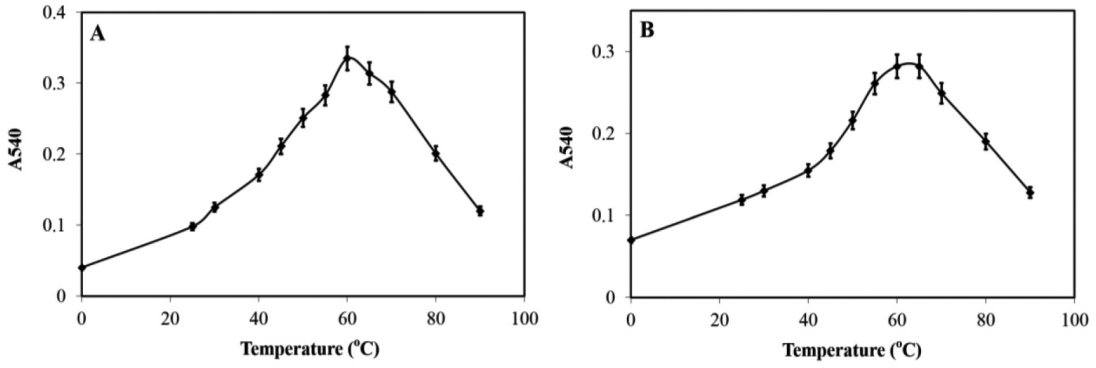
ภาพที่ 1 ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับ (A) และในฮีโมลิมฟ์ (B)



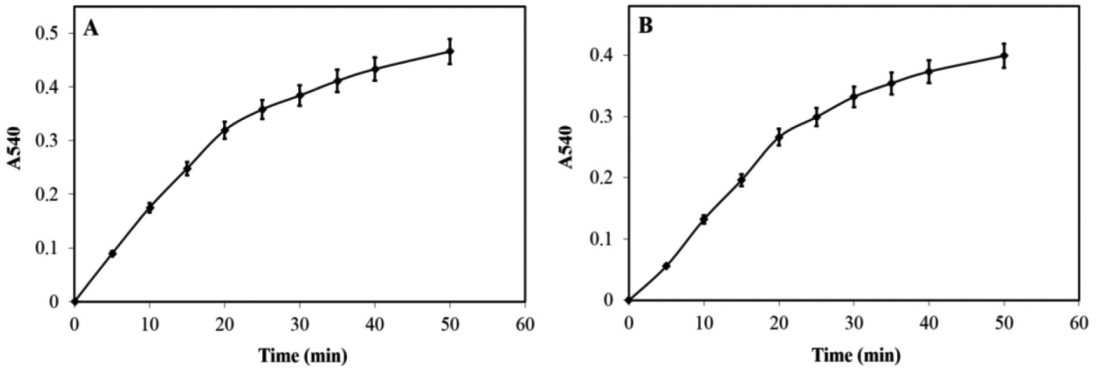
ภาพที่ 2 ปริมาณสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับ (A) และในฮีโมลิมฟ์ (B)



ภาพที่ 3 pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับ (A) และในฮีโมลิมฟ์ (B)



ภาพที่ 4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับ (A) และในฮีโมลิมฟ์ (B)

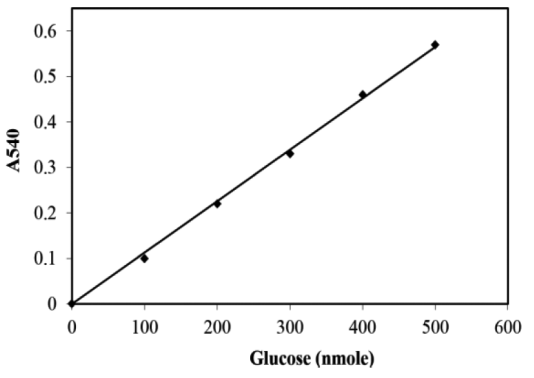


ภาพที่ 5 เวลาที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับ (A) และในฮีโมลิมฟ์ (B)

กลูโคสในช่วงปริมาณ 0-500 นาโนโมล ให้ความสัมพันธ์ระหว่าง A540 และปริมาณกลูโคสที่ใช้เป็นเส้นตรง ซึ่งมีค่า correlation coefficient R^2 = 0.98 (ภาพที่ 6) ดังนั้นจึงใช้กราฟมาตรฐานกลูโคสนี้เพื่อใช้ในการคำนวณแอคทิวิทีของเอนไซม์ตัวอย่าง

2. แอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในเนื้อเยื่อของกุ้งปกติ

จากการหาแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์และในสารสกัดเนื้อเยื่อของกุ้งแชบ๊วยตัวอย่างชุดเดียวกันที่จับจากธรรมชาติอย่างละ 3 ตัว พบแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับมากที่สุด (58.6 ± 12.86 U/mg, 100%) รองลงมาได้แก่ กระเพาะ (24.96 ± 15.74 U/mg, 6.5%) กล้ามเนื้อ (5.77 ± 0.44 U/mg, 2.9%) และในฮีโมลิมฟ์ (0.97 ± 0.15 U/mg, 1.8%) ตามลำดับ การที่พบแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับและกระเพาะมากแสดงถึงบทบาทของเอนไซม์นี้ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารที่เป็นส่วนเบตา-กลูแคนเพื่อการเจริญเติบโตของกุ้ง การพบแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในกล้ามเนื้อไม่สามารถคาดเดาบทบาทของเอนไซม์ได้แน่ชัด



ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

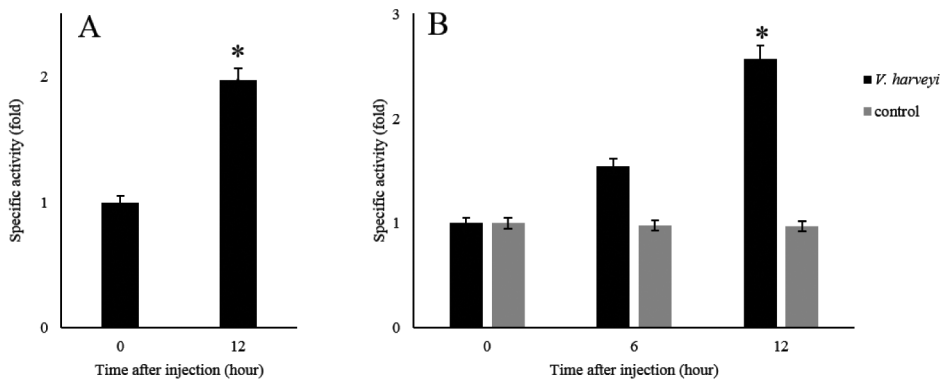
อาจเป็นระดับแอคทิวิทีพื้นฐานของเอนไซม์ที่มีทั่วไปเพื่อ metabolism ของเซลล์ ในทำนองเดียวกับการพบเอนไซม์นี้ในฮีโมลิมฟ์ แต่ยังไม่สามารถบอกบทบาทของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งในภาวะปกติที่ไม่ได้ติดเชื้อก่อโรคได้

3. ผลการฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* ต่อแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1, 3-กลูคาเนส

จากการกระตุ้นกุ้งแชบ๊วยให้ติดเชื้อโดยการฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* ที่ปริมาณ 5×10^7 เซลล์ต่อตัวกุ้ง ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ทำให้กุ้งติดเชื้อได้ดีและไม่ตายภายใน 12 ชั่วโมง เมื่อวัดระดับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ฉีดเชื้อเทียบกับกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือและไม่แสดงอาการติดเชื้อ ณ เวลา 0, 6 และ 12 ชั่วโมง หลังการฉีด พบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งชุดควบคุมมีค่าไม่แตกต่างกัน ณ เวลาต่างๆ ในขณะที่แอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ฉีด *V. harveyi* เพิ่มสูงขึ้น จากระดับก่อนฉีด (0 ชั่วโมง) อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นเป็น 1.54 และ 2.57 เท่า ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมงหลังการฉีด ตามลำดับ (ภาพที่ 7B) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ชนิดนี้เพิ่มขึ้นตามเวลาหลังการฉีดเชื้อ ซึ่งเป็นการตอบสนองของกุ้งแชบ๊วยต่อการติดเชื้อก่อโรค รูปแบบการเพิ่มขึ้นของระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคา เนสยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาในครัสเตเชียนชนิดต่างๆ แต่พบว่าแอคทิวิทีและการแสดงออกของยีนของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในข้าวบาร์เลย์ถูกกระตุ้นให้

เพิ่มสูงขึ้นเมื่อถูกรุกรานจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคราแป้ง ซึ่งเป็นการป้องกันตนเองของพืชที่กระตุ้นยีนให้สร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสมากขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อก่อโรค และได้มีการเตรียม hybridization cDNA probe จากข้าวบาร์เลย์เพื่อใช้วัดการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ เบตา-1,3-กลูคาเนสในข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวเจ้าและข้าวฟ่างที่ถูกบุกรุกจากเชื้อรา (Jutidamrongphan *et al*., 1991) จากการศึกษาโดยรดมะเขือเทศด้วยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* EPCO 16 ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค ตามด้วยการฉีดด้วยเชื้อราก่อโรค *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* พบว่ามะเขือเทศมีแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพิ่มสูงขึ้น จนมีแอคทิวิทีสูงสุดหลังการฉีดเชื้อรา 7 วัน และลดลงเมื่อผ่านไป 9 วัน บ่งชี้ว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสถูกกระตุ้นให้ผลิตเพิ่มขึ้นเพื่อป้องกันตนเองจากการติดเชื้อรา (Ramyabharathi *et al*., 2012) ในทำนองเดียวกับการศึกษาในพืช transgenic *Brassica napus* ที่มีการตัดต่อยีนของเอนไซม์เบตา- 1,3-กลูคาเนสจากเชื้อรา *Trichoderma virens*-10 พบการแสดงออกของยีนและการผลิตเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในพืชนี้ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยเชื้อราก่อโรค *Sclerotinia sclerotiorum* และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ดี (Kheiri *et al*., 2014)

ในงานวิจัยนี้ยังพบว่าแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* มีระดับสูงขึ้นกว่าของกุ้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อวัดที่เวลา 12 ชั่วโมง หลังการฉีด โดยเพิ่มขึ้นเป็น 1.97 เท่า (ภาพที่ 7A) เนื่องจากตับเป็นแหล่งสำคัญในการสร้างโปรตีนและเอนไซม์หลายชนิด ดังนั้นกุ้งแชบ๊วยอาจตอบสนองการติดเชื้อก่อโรคโดยมีการสร้างเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับเพิ่มขึ้นจึงพบระดับแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์นี้ในตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุม (0 ชั่วโมง) และระดับเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสที่เพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์เนื่องมาจากการติดเชื้ออาจหลั่งมาจากตับของกุ้งแชบ๊วย เพราะจากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสพบว่าเอนไซม์ในตับและในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยมีสมบัติต่างๆ คล้ายกันมาก ดังนั้นการที่มีแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้นตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค อาจมีผล



ภาพที่ 7 แอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับ (A) และในฮีโมลิมฟ์ (B) ของกุ้งแชบ๊วยที่ฉีดเชื้อ *V. harveyi* หรือชุดควบคุม (*Significant differences at $p < 0.95$)

ต่อส่วนประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ เช่น เบตา-1,3-กลูแคน โดยมีบทบาทสำคัญในการป้องกันตนเองต่อเชื้อก่อโรคเช่นเดียวกับพืช แต่กลไกของเอนไซม์ชนิดนี้ในการป้องกันตนเองของกุ้งต่อเชื้อก่อโรคเป็นเช่นไร ยังไม่สามารถสรุปได้ ณ ที่นี้ ซึ่งควรมีการศึกษาการแสดงออกระดับยีนของเอนไซม์นี้ในสภาวะที่กุ้งมีการติดเชื้อต่อไป

สรุป

งานวิจัยนี้ได้หาสภาวะที่เหมาะสมของการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและในฮีโมลิมฟ์ และเมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้ไปวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์พบว่ากุ้งแชบ๊วยปกติมีแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในตับมากที่สุด พบน้อยในฮีโมลิมฟ์ ในกุ้งที่เหนี่ยวนำด้วยการฉีดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* พบว่ามีแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์นี้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในตับและในฮีโมลิมฟ์ บ่งชี้ว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสเป็นอีกโปรตีนหนึ่งที่อาจมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองตอบสนองต่อเชื้อก่อโรคในกุ้ง ซึ่งควรมีการศึกษาระดับโมเลกุลโปรตีนและยีนของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในกุ้งต่อไป เพื่อจะได้เข้าใจบทบาทและกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของเอนไซม์นี้ต่อเชื้อก่อโรคในกุ้งมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนการศึกษาแก่ นางสาวอรัญญา คงแก้ว จากโครงการความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี

เอกสารอ้างอิง

Aleandri, M.P., Reda, R., Tagliavento, V., Magro, P. and Chilosi, G. 2010. Effect of chemical resistance inducers on the control of monosporascus root rot and vine decline of melon. **Phytopathologia Mediterranea** 49: 18-26.

Brimacombe, J.S. 1975. **Carbohydrate chemistry. In: The Chemical Society Vol. 6.** Burlington House, London.

Buzi, A., Chilosi, G., De Sillo, D. and Magro, P. 2004. Induction of resistance in melon *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotionum* by seed treatments with acibenzolar-S-methyl and methyl jasmonate but not with salicylic acid. **Journal of Phytophatology** 152: 491-497.

Ebrahim, S., Usha, K. and Singh, B. 2011. Pathogenesis-related (PR)-proteins: Chitinase and β-1,3-glucanase in defense mechanism against malformation in mango (*Mangifera indica* L.). **Scientia Horticulturae** 130: 847-852.

Jutidamrongphan, W., Anderson, J.B., Mackinnon, G., Manners, J.M., Simpson, R.S. and Scott, K.J. 1991. Induction of β-1,3-glucanase in barley in response to infection by fungal pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 4: 234-238.

Kheiri, H.-R., Motallebi, M., Zamani, M.-R. and Deljo, A. 2014. Beta glucanase (Bgn13.1) expressed in transgenic *Brassica napus* confers antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Crop**

Protection 3: 31-42.

Kovalchuk,S.N.,Sundukova,E.V.,Kusaykin,M.I., Guzev, K.V., Anastiuk, S.D., Likhatskaya, G.N., Trifonov, E.V., Nurminski, E.A., Kozhemyako, V.B., Zvyagintseva, T.N. and Rasskazov. 2006. Purification, cDNA cloning and homology modeling of endo-1,3-β-D-glucanase from scallop *Mizuopecten yessoensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology** 143B: 473-485.

Leelasuphakul, W., Sivanunsakul, P. and Phongpaichit, S. 2006. Purification, characterization and synergistic activity of β-1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight. **Enzyme and Microbial Technology** 38: 990-997.

Medzhitov, R. and Janeway, Jr.C.A. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. **Science** 296: 298-300.

Oostendrop, M., Kunz, W., Dietrich, B. and Staub, T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology** 107: 19-28.

Pang, Z., Otaka, K., Suzuki, Y., Goto, K. and Ohnishi, M. 2004. Purification and characterization of an endo-1,3-β-glucanase from *Arthrobacter* sp.. **International Journal of Biological Macromolecules** 4(2): 57-66.

Pozo, M.J., van Loon, L.C. and Pesterse, C.M.J. 2005. Jasmonates - signals in plant-microbe interactions. **Journal of Plant Growth Regulation** 23: 211-222.

Ramyabharathi, S.A., Meena, B. and Raguchander, T. 2012. Induction of chitinase and β-1,3-glucanase PR proteins in tomato through liquid formulated *Bacillus subtilis* EPCO 16 against *Fusarium* wilt. **Journal of Today's Biological Sciences: Research and Review (JTBSRR)** 1: 50-60.

Rattanaporn, O. and Utarabhand, P. 2011. Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis*: Early gene-up regulation after *Vibrio harveyi* infection. **Journal of Invertebrate and Pathology** 106: 196-204.

Talbot, C.F. and Vacquier, V.D. 1982. The purification and characterization of an exo-β (1->3)-glucanohydrolase from sea urchin eggs. **Journal of Biological Chemistry** 257: 742-746.

Wessel, G.M., Truschel, M.R., Chamber, S.A. and McClay, D.R. 1987. A cortical granule-specific enzyme, β-1,3-glucanase, in sea urchin eggs. **Gamete Research** 18: 339-348.