



ไลโซไซม์: ความรู้พื้นฐานสู่การประยุกต์ใช้

Lysozymes: from basic knowledge to applications

พัชรี บุญศิริ¹ และ จุริรัตน์ ปู่อาจ²

บทคัดย่อ

ไลโซไซม์เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะปีตา 1,4 ไกลโคซิดิก ของน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ เช่น พันธะระหว่างน้ำตาล N-acetylglucosamine และ N-acetylmuramic acid ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรีย พบไลโซไซม์ได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งชนิดยูคาริโอตและโปรคาริโอต ไลโซไซม์ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาแบบเดียวกัน แต่ไลโซไซม์เหล่านี้จะมีลักษณะเฉพาะตัวคือมีลำดับ ชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน โครงรูปแตกต่างกัน และกลไกการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างกันเล็กน้อย นอกจากนั้นไลโซไซม์ยังมีกลไกการทำงานคล้ายคลึงกับเอนไซม์บางตัวที่จัดอยู่ในกลุ่ม hydrolase เช่น โคตินเนสและโคโทซานเนสด้วย จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ ในด้านการแพทย์ การตรวจวินิจฉัยโรค ด้านเภสัชกรรม และการเกษตร

คำรหัส: ไลโซไซม์ • โคตินเนส • โคโทซานเนส • การตรวจวินิจฉัยโรค

¹ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ภาควิชาเคมีคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Abstract

Lysozymes: from basic knowledge to applications

Patcharee Boonsiri¹ and Jureerut Pooart²

Lysozyme is a hydrolytic enzyme which hydrolyzes β -1,4 glycosidic linkages between polysaccharide (e.g., N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid) that are found in the cell wall of some bacteria. It can be found in both eukaryote and prokaryote. Lysozymes from various living sources have a common catalytic mechanism. However, they are different in their amino acid sequences and composition, conformation and slightly different in catalytic mechanism. Lysozyme also acts like chitinase and chitosanase. Thus, it is often used in medicine for diagnosis in pharmacy and agriculture.

Key words: lysozyme ● chitinase ● chitosanase ● diagnosis

บทนำ

ไลโซไซม์ (lysozyme, E.C.3.2.1.17) เป็นเอนไซม์ที่มี hydrolytic activity ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียบางกลุ่ม เช่น *Micrococcus lysodeikticus* โดยย่อยพันธะบีตา 1,4 ไกลโคซิดิก (β -1,4 glycosidic linkages) ที่เชื่อมระหว่างน้ำตาล N-acetylglucosamine (NAG) และ N-acetylmuramic acid (NAM) ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในแบคทีเรียดังกล่าว (รูปที่ 1) จึงอาจเรียกไลโซไซม์ในกรณีนี้ว่าเป็น muramidase หรือ mucopolysaccharide N-acetylmuramylhydrolase¹ พบไลโซไซม์ได้ทั้งสิ่งมีชีวิตประเภทยูคาริโอตและโพรคาริโอต ไลโซไซม์เป็นสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา

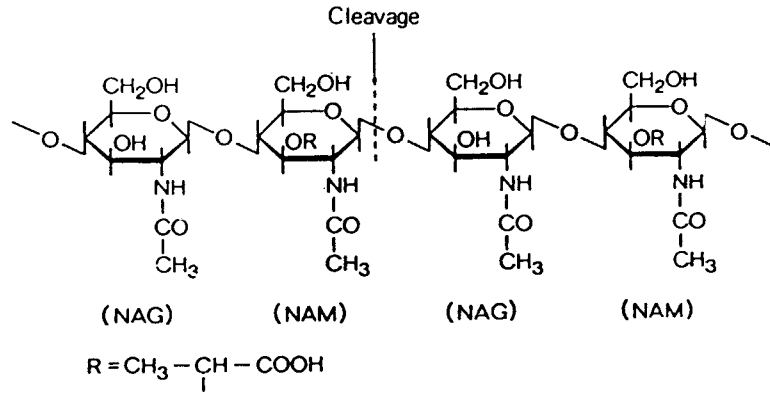
แบบเดียวกัน แต่ไลโซไซม์เหล่านี้จะมีลักษณะเฉพาะตัวคือมีลำดับ ชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน โครงรูปแตกต่างกัน และกลไกการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างกันเล็กน้อย ไลโซไซม์มีกลไกการทำงานคล้ายคลึงกับเอนไซม์บางตัวที่จัดอยู่ในกลุ่ม hydrolase เช่น ไคตินเนส (chitinase) และ ไคโทซานเนส (chitosanase)² เป็นต้น

การค้นพบไลโซไซม์

อเล็กซานเดอร์ เฟลมมิง (Alexander Flemming) เป็นผู้ค้นพบและศึกษาไลโซไซม์มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1922 จากการสังเกตเห็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่หลั่งออกมาจากเชื้อเชื้อสามารถรบกวนการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิด และมีฤทธิ์

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Khon Kaen University

² Department of Clinical Chemistry, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University



รูปที่ 1 โครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (ที่มา: Fersht A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York: WH Freeman and Company, 1999:43.)

ในการทำลายแบคทีเรีย เขาจึงตั้งชื่อโปรตีนนี้ว่าไลโซไซม์ ซึ่งพบได้ทั้งเนื้อเยื่อหลาย ๆ ชนิด ในปศุสัตว์นั้นเฟลมมิงได้ทำการศึกษาลิโซไซม์จากไข่ขาวของไก่ เนื้อเยื่อ และสารคัดหลั่งของสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด

หลังจากนั้น มีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านที่ศึกษาเกี่ยวกับไลโซไซม์เพิ่มเติม และรายงานการพบไลโซไซม์ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในธรรมชาติทั้งพืชและสัตว์ ตลอดจนสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น ฟาจ (phage) พบไลโซไซม์ปนอยู่ในสารคัดหลั่งของมนุษย์หลายชนิด เช่น น้ำตา น้ำลาย น้ำนม สารคัดหลั่งจากมดลูก เม็ดเลือดขาว ไค เป็นต้น ส่วนในสัตว์มักพบไลโซไซม์ในไข่ขาว และในพืชพบไลโซไซม์มากในเมล็ดและยางของพืช

ไลโซไซม์ของยูคาริโอตที่มีผู้ศึกษาและรายงานไว้มากที่สุดคือไลโซไซม์จากไข่ขาวของไก่ (hen egg white lysozyme, HEWL) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ lysozyme C (C = chicken) การที่ไข่ขาวมีปริมาณไลโซไซม์อยู่สูงเพื่อทำหน้าที่ปกป้องไข่แดง (yolk sac) จากการทำลายของ

แบคทีเรีย นอกจากไก่แล้วสัตว์ปีกหลาย ๆ ชนิด เช่น ห่านก็มีไลโซไซม์เป็นปริมาณมากอยู่ในไข่ขาว (goose egg white lysozyme, GEWL) จึงจัดอยู่ในกลุ่มของ lysozyme G (G = goose) ส่วนในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำมีผู้ศึกษาไลโซไซม์ของฟาจ T4 (phage T4) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า lysozyme T4L ในเชิงอุตสาหกรรมการผลิตไลโซไซม์ นิยมใช้ไข่ขาวเป็นวัตถุดิบสำหรับการนำมาสกัดไลโซไซม์เพราะเป็นแหล่งที่หาได้ง่าย และมีปริมาณมาก

ไลโซไซม์จากไก่

ปัจจุบันไลโซไซม์จากไข่ขาวของไก่หรือ HEWL เป็นไลโซไซม์ที่นักวิทยาศาสตร์ทำการศึกษาจนกระทั่งรู้คุณสมบัติและหน้าที่มากที่สุด และเป็นโปรตีนตัวแรกที่นักวิทยาศาสตร์ใช้เทคนิค x-ray crystallography ช่วยในการศึกษาโครงสร้าง

HEWL มีน้ำหนักโมเลกุล 14,400 ดาลตัน มีค่า isoelectric point (pI) 10.5-11, optimum pH 9.2, extinction coefficient 26.4 ถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารประกอบประเภท surface-

active agent เช่น dodecyl sulfate, alcohol และ fatty acid สารที่สามารถยับยั้งการทำงานของไลโซไซม์ได้คือสารกลุ่มที่เป็นอนุพันธ์ของimidazoleและ indole

HEWL มีองค์ประกอบเป็นกรดอะมิโนจำนวน 129 ตัว ได้แก่ Asp* 21 ตัว, Glu 5 ตัว, Ala 12 ตัว, Arg 11 ตัว, Cys 8 ตัว, Phe 3 ตัว, Gly 12 ตัว, Ile 6 ตัว, His 1 ตัว, Leu 8 ตัว, Lys 6 ตัว, Pro 2 ตัว, Met 2 ตัว, Ser 10 ตัว, Tyr 3 ตัว, Thr 7 ตัว, Trp 6 ตัว และ Val 6 ตัว³ มีพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลอยู่ 4 ตำแหน่ง เมื่อทำให้บริสุทธิ์จะเป็นผลึกสีขาว ละลายน้ำได้ดีมาก แต่ละลายไม่ดีในตัวทำละลายอินทรีย์

HEWL ทำหน้าที่สร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงในการกำจัด Herpes zoster, Herpes simplex และเชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้น HEWL จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม เพื่อใช้เป็นยาที่ทำลายแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก (gram-positive bacteria) โดยการย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีโครงสร้างเป็นมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ ไลโซไซม์ถูกใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของไวรัสโดยการเกิดอันตรกิริยากับรีเซพเตอร์ที่ผิวเซลล์แล้วกระตุ้นให้ร่างกายสร้างระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองโดยวิถีคอมพลีเมนต์ (complement pathway) จากการทดลองในหนูเมื่อให้ไลโซไซม์แก่หนูในปริมาณมาก ๆ จะทำให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลันได้ (LD₅₀ เท่ากับ 13 กรัม/น้ำหนักหนู mice 1 กิโลกรัม และ 15 กรัม/น้ำหนักหนู rat 1 กิโลกรัม) ส่วนการได้รับไลโซไซม์

จำนวนน้อยแต่ได้รับบ่อย ๆ เข้าสู่ร่างกายไม่ปรากฏอาการพิษเรื้อรัง การที่ HEWL มีศักยภาพในทางการแพทย์นี้เองจึงทำให้นักวิทยาศาสตร์สนใจที่จะศึกษาไลโซไซม์จากแหล่งอื่น ๆ ด้วย⁴

การศึกษาไลโซไซม์จากแหล่งอื่น ๆ

ไลโซไซม์จัดเป็นโปรตีนที่มีวิวัฒนาการแบบ divergent evolution คือมีที่มาจากสารต้นกำเนิด (precursor) เดียวกัน แต่เมื่อเวลาผ่านไปนาน ๆ วิวัฒนาการจะทำให้โปรตีนเหล่านี้เกิดความแตกต่างกัน เช่น มีการเปลี่ยนแปลงจำนวน ลำดับ และชนิดของกรดอะมิโนในโครงสร้างของโปรตีน ทำให้การม้วนตัว (folding) ของโปรตีนผิดไปจากเดิม ส่งผลให้การทำหน้าที่ของโปรตีนแตกต่างจากเดิม ดังนั้นไลโซไซม์ที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ แม้จะมีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่แตกต่างกัน แต่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลสน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ได้เหมือนกัน แหล่งของไลโซไซม์ที่มีผู้สนใจศึกษากันมากในขณะนี้ได้แก่ไข่ขาวของสัตว์ปีกจำพวกห่านหรือ GEWL

GEWL จัดเป็นไลโซไซม์ที่มีผู้ศึกษามากเป็นอันดับสองรองจาก HEWL การศึกษา GEWL เริ่มมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1974 และมักจะศึกษาเปรียบเทียบกับ HEWL และ T4L โดยเน้นในด้านของจำนวนชนิดและลำดับกรดอะมิโนโครงสร้างตำแหน่งที่จับกับซับสเตรท กลไกการเร่งปฏิกิริยารวมไปถึงการเปรียบเทียบกับเอนไซม์อื่นที่สามารถย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ได้ ได้แก่ โคตินเนสและ

* คือ ตัวย่อชนิดสามตัวอักษรของกรดอะมิโน ได้แก่

Asp = กรดแอสพาร์ติก	Glu = กรดกลูตามิก	Ala = อะลานีน
Arg = อาร์จินีน	Cys = ซิสเทอีน	Phe = ฟีนิลอะลานีน
Gly = ไกลซีน	Ile = ไอโซลิวซีน	His = ฮิสทิดีน
Leu = ลิวซีน	Lys = ไลซีน	Pro = โพรลีน
Met = เมไทโอนีน	Ser = เซรีน	Tyr = ไทโรซีน
Thr = ทรีโอนีน	Trp = ทริปโทเฟน	Val = แวลีน

การเปรียบเทียบไลโซไซม์จากแหล่งต่าง ๆ

ไลโซไซม์ที่มีผู้ศึกษามากและถูกนำมาเปรียบเทียบกันในแง่ต่าง ๆ อยู่เสมอ ได้แก่ GEWL, HEWL และ T4L ซึ่งพอจะสรุปสิ่งที่ถูกนำมาเปรียบเทียบกันได้ดังนี้

1. จำนวน ชนิดและลำดับกรดอะมิโนของไลโซไซม์

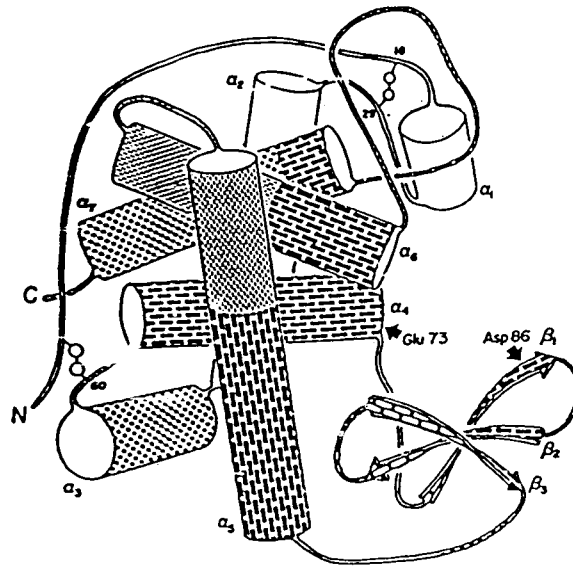
ไลโซไซม์จากแหล่งต่างกันจะไม่มีโฮโมโลกัส (homologous) กัน หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าไลโซไซม์จากแหล่งต่างกันมักมีความแตกต่างของจำนวนลำดับและชนิดกรดอะมิโนนั่นเอง HEWL, GEWL, T4L มีองค์ประกอบเป็นกรดอะมิโน 129 หน่วย

(residue), 185 หน่วย และ 164 หน่วย ตามลำดับ ความแตกต่างกันของกรดอะมิโนนี้มีผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของไลโซไซม์⁵

โครงสร้างทุติยภูมิหลายบริเวณในโมเลกุลของไลโซไซม์ทั้งสามชนิดแตกต่างกัน ยกเว้นที่บริเวณเร่ง (active site) ซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ให้คงอยู่เพื่อจับกับสเตรทที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่

2. โครงสร้างของไลโซไซม์

การใช้เทคนิคการวาดภาพเชิงสามมิติ (stereodrawing) ทำให้ทราบว่าไลโซไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีโครงรูปสามมิติลักษณะคล้ายกันมาก ที่บริเวณเร่งซึ่งจัดเป็นบริเวณอนุรักษ์สำหรับไลโซไซม์ทั้งสามมี



รูปที่ 2 โครงสร้างทุติยภูมิที่บริเวณเร่งของไลโซไซม์จาก HEWL, GEWL, และ T4L บริเวณที่มีสัญลักษณ์รูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า เป็นส่วนที่พบได้ในไลโซไซม์ทั้ง 3 ชนิด บริเวณที่มีสัญลักษณ์รูปจุด เป็นส่วนที่พบได้เฉพาะ HEWL และ GEWL บริเวณที่มีสัญลักษณ์รูปขีดสั้น ๆ เป็นส่วนที่พบได้เฉพาะ GEWL และ T4L บริเวณที่ไม่มีสัญลักษณ์ใดอยู่ เป็นส่วนที่พบได้เฉพาะ GEWL เท่านั้น (ที่มา: Grutter MG, Weaver LH, Matthews BW. Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozymes. Nature 1983;303:830.)

โครงสร้างทุติยภูมิเหมือนกันกล่าวคือมีเกลียวอัลฟา 2 เกลียว (2 alpha-helices) และแผ่นพับลิทบีตา 1 แผ่น (1 beta-pleated sheet) แผ่นพับลิทบีตานี้ประกอบด้วยสายกรดอะมิโน 3 สาย (3-stranded beta-pleated sheet) เรียงตัวกันแบบสวนทาง (antiparallel) (รูปที่ 2) ส่วนโดเมน (domain) ที่อยู่ปลาย N และปลาย C ของไลโซไซม์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน

ชนิดและตำแหน่งกรดอะมิโนในบริเวณเร่งที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของ HEWL คือ Glu35 กับ Asp52 ของ T4L คือ Glu11 กับ Asp20 ส่วนตำแหน่งกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาของ GEWL นั้นแต่เดิมในปี ค.ศ.1983 Grutter MG และคณะ⁵ เคยรายงานไว้ว่าเป็นตำแหน่ง Glu73 กับ Asp86 ต่อมา Weaver LH และคณะ⁶ ได้ศึกษาโครงสร้างของ GEWL อย่างละเอียดและสรุปว่า GEWL ไม่มีกรดอะมิโน Asp ที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เลย GEWL มีเพียง Glu73 เท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาการย่อยยับสเตรท

นักวิทยาศาสตร์พิสูจน์ว่า Asp ไม่มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาของ GEWL โดยการนำโครงสร้างของไลโซไซม์ทั้ง 3 ชนิดมาซ้อนทับกัน (superimpose) พบว่าแม้ GEWL จะมี Asp86, Asn89, Gln95 อยู่ใกล้เคียงกับ 'catalytic aspartate หรือ Asp52' ของ HEWL โดยเฉพาะ Asp86 ของ GEWL ก็แทบจะซ้อนทับกับ Asp52 ของ HEWL นั่นคือห่างกันเพียง 10 อังสตรอม เท่านั้น แต่เมื่อใช้น้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์ (NAG)₃ มาเป็นยับสเตรทของไลโซไซม์ ทั้ง Asp86, Asn89, Gln95 ของ GEWL ก็ไม่ได้เคลื่อนเข้ามาจับกับยับสเตรทดังกล่าวเลย⁶ แสดงว่า Asp ไม่จำเป็นในการเร่งปฏิกิริยาของ GEWL

3. กลไกการเร่งปฏิกิริยาของไลโซไซม์

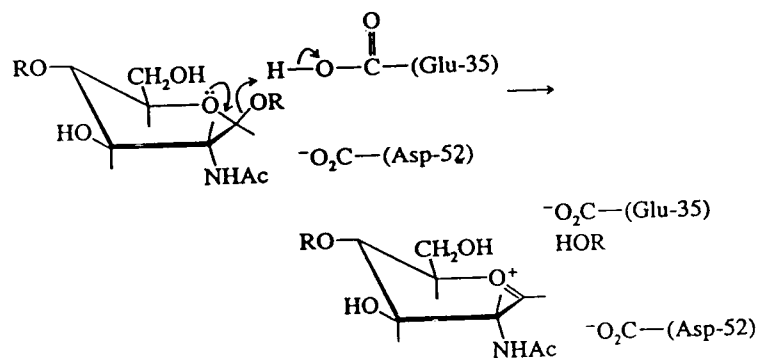
กลไกการเร่งปฏิกิริยาของไลโซไซม์ได้จากการศึกษา subsite ของไลโซไซม์ subsite เป็นบริเวณเล็ก ๆ ที่อยู่ภายในบริเวณเร่ง ทำหน้าที่ช่วย

ตรึงยับสเตรทให้อยู่ในบริเวณเร่ง โดยการใช้กรดอะมิโนที่ subsite นั้น สร้างพันธะไฮโดรเจนกับยับสเตรท ทำให้การเร่งปฏิกิริยาเกิดได้สะดวกขึ้น ปัจจุบันนิยมใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการสร้างแบบจำลองและคำนวณหาความเหมาะสมระหว่างการจับของเอนไซม์กับยับสเตรท

กลไกการเร่งปฏิกิริยาของ HEWL เกี่ยวข้องกับ subsite ในโมเลกุลของ HEWL ดังนี้ คือ HEWL มี 6 subsites คือ A, B, C, D, E และ F เมื่อน้ำตาลโมเลกุลใหญ่เป็นยับสเตรท ทั้ง 6 subsites จะจับกับวงแหวนกลูโคไพราโนส (glucopyranose ring) ของน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ โดยให้พันธะบีตา 1,4-ไกลโคซิดิกของน้ำตาลที่จะถูกไลโซไซม์ตัดเข้าไปอยู่ระหว่าง subsite D และ E นั่นคืออยู่ใกล้กับหมู่คาร์บอกซิลิกของ Glu35 และ Asp52

เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป หมู่คาร์บอกซิลิกของ Glu35 ซึ่งอยู่ในรูปที่มีอะตอมไฮโดรเจน (protonated) หรือรูปที่ไม่แตกตัว (unionized form) จะให้โปรตอนกับวงแหวนของน้ำตาล ทำให้วงแหวนของน้ำตาลที่อยู่ตรงบริเวณ subsite D เกิดการบิดเบี้ยวมีรูปร่างคล้ายโซฟา (sofa) หรือมีลักษณะคล้ายเก้าอี้เอน (half-chair conformation) การบิดเบี้ยวของน้ำตาลนี้มีผลทำให้โครงรูปของไลโซไซม์เปลี่ยนไป เป็นโครงรูปที่เหมาะสมแก่การย่อยน้ำตาล⁷ ระหว่างการย่อยจะเกิดสารอินเทอร์มีเดียตออกโซคาร์บีนีเนียมไอออน (oxocarbenium ion) ออกโซคาร์บีนีเนียมไอออนจะถูกทำให้เสถียรโดยการจับกับหมู่คาร์บอกซิลิกของ Asp52 ซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่มีอะตอมไฮโดรเจน (deprotonated) หรือรูปที่แตกตัว (ionized form) จากนั้นหมู่แอลคอกซี (alkoxy, -OR) ของโมเลกุลน้ำตาลจะหลุดออกไป หมู่ที่หลุดออกไป (leaving group) นี้จะจับกับอะตอมไฮโดรเจนของ Glu35 เกิดแอลกอฮอล์ ROH ขึ้น และผลจากการย่อยน้ำตาลโมเลกุลใหญ่จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลที่โมเลกุลเล็กลง¹ (รูปที่ 3)

น้ำตาลโมเลกุลเล็กจัดเป็นยับสเตรทที่



รูปที่ 3 กลไกการเกิดออกโซคาร์บีเนียมไอออน (ที่มา: Fersht A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York: WH Freeman and Company, 1999:497.)

ไม่ค่อยดีนักสำหรับ HEWL เพราะจะจับกับ subsite A, B และ C แต่การจับนี้ไม่ทำให้เกิดความเครียด (strain) ขึ้นที่ subsite D จึงไม่ค่อยมีผลต่อการเปลี่ยนโครงรูปของเอนไซม์ ทำให้น้ำตาลโมเลกุลเล็กถูกย่อยได้ไม่ดีเท่าน้ำตาลโมเลกุลใหญ่

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของ HEWL จะมีสเตอริโอเคมีที่มีโครงแบบเหมือนซัสเตรท (retention of configuration) คือเป็น บีตาอะโนเมอร์ (β -anomer) เพราะการเร่งปฏิกิริยาของ HEWL เป็นกลไกการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ (nucleophilic substitution) ชนิด SN^1 (S = substitution, N = nucleophile, 1 = unimolecular) โดยนิวคลีโอไฟล์จะเข้ามาทำปฏิกิริยาด้านเดียวกับหมู่ที่หลุดออกไป ซึ่งกลไกนี้ต้องการ Asp52 ช่วยในการทำให้สารอินเทอร์มีเดียตออกโซคาร์บีเนียมไอออนมีความเสถียร

วิธีการทดสอบหากลไกการเร่งปฏิกิริยาของไลโซไซม์ชนิดอื่น ๆ ว่าเหมือนหรือแตกต่างจาก

HEWL ทำได้โดยการใส่โลหะหนักเป็นซัสเตรทไปจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ทำให้เกิดสารเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับซัสเตรท เปรียบเทียบกับไลโซไซม์ในรูปที่ไม่มีซัสเตรทมาจับ (native enzyme)⁶ ผลสรุปว่า GEWL, HEWL, T4L มี subsite B, C, D ที่ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาลักษณะนี้ แต่มีบาง subsite ที่ทำหน้าที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เพราะกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของไลโซไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ทำให้จับซัสเตรท เช่น น้ำตาล NAG กับ NAM ได้แข็งแรงไม่เท่ากัน

เมื่อเปลี่ยนจากโลหะหนัก มาเป็นซัสเตรทชนิดที่เป็นน้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์ (NAG)₃ แล้วศึกษาเปรียบเทียบ subsite ของไลโซไซม์ HEWL, GEWL, T4L โดยการดูลักษณะสารเชิงซ้อนระหว่างไลโซไซม์เหล่านี้กับ (NAG)₃ พบว่า (NAG)₃ นี้จะเข้าไปจับกับ GEWL ตรงบริเวณที่เหมือนกับ subsite B, C, D ของ HEWL และ T4L เช่นเดียวกับการใช้โลหะหนักเป็นซัสเตรท⁶ ไลโซไซม์

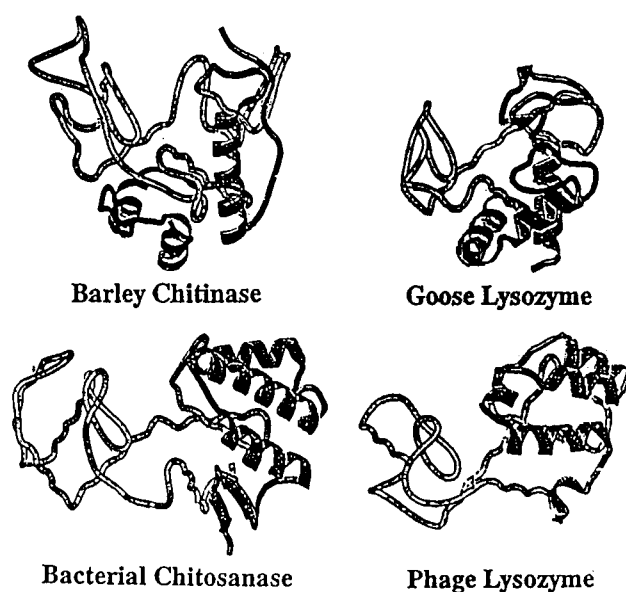
ทั้ง 3 ชนิดสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างแนวกระดูกสันหลังของโปรตีนเองกับหมู่ 2-acetamido group ของน้ำตาลที่บริเวณ subsite C ได้

สำหรับ GEWL มี Glu73 อยู่ใกล้กับ Glu35 ของ HEWL และ Glu11 ของ T4L แสดงว่า Glu73 ของ GEWL มีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาอย่างไรก็ตามดังได้กล่าวมาแล้วว่าไม่มีกรดอะมิโนใดใน GEWL ที่ทำหน้าที่คล้าย Asp52 ใน HEWL หรือคล้ายกับ Asp20 ใน T4L เลย แสดงว่าเพียงแคกรดอะมิโนชนิดที่เป็นกรด (acidic amino acid) ตัวเดียวก็ช่วยเร่งปฏิกิริยาของ GEWL ได้

ผลจากการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่ง

ปฏิกิริยาของ GEWL และ T4L พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีสเตอริโอเคมีที่มีโครงแบบกลับกันกับของซับสเตรท (conversion of configuration) ทั้งนี้เนื่องจาก Glu73 ของ GEWL มีระยะทางห่างจาก Asp ตัวอื่น ๆ มาก กลไกการเร่งปฏิกิริยาจึงเป็นชนิด SN^2 (2 = bimolecular) นิวคลีโอไฟล์จะเข้ามาทำปฏิกิริยากับสารทางด้านตรงข้ามกับหมู่ที่หลุดออกไป

จะเห็นว่าไลโซไซม์จากแต่ละแหล่งแม้จะสามารถย่อยซับสเตรทเดียวกันได้แต่กลไกการเร่งปฏิกิริยาและผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดและลำดับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ



รูปที่ 4 เปรียบเทียบโครงสร้างสามมิติของไคตินเนสจากข้าวบาร์เลย์, GEWL, ไคโทซานเนสจากแบคทีเรีย และ T4L (ที่มา: Monzigo AF, Marcotte EM, Hart PJ, Robertus JD. Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into prokaryotic and eukaryotic families sharing families sharing a conserved core. Nat Struct Biol 1996;3:139.)

ของไลโซไซม์นั้น ๆ

4. เปรียบเทียบไลโซไซม์กับไคตินเนสและไคโทซานเนส

ไลโซไซม์ ไคตินเนส และไคโทซานเนส เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเดียวกัน⁸ คือ chitosidase (รูปที่ 4) พบว่าไลโซไซม์จากสิ่งมีชีวิตบางชนิดย่อยไคติน (chitin) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่เกิดจากการต่อกันของน้ำตาล NAG ด้วยพันธะบีตา 1,4-ไกลโคซิดิกได้ แต่การย่อยอาจไม่มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับไคตินเนส เช่น HEWL สามารถย่อยไคตินได้ดีเพียงครึ่งเดียวของซับสเตรทปกติของ HEWL เอง ไลโซไซม์จึงถูกจัดว่ามีความสามารถในการย่อยน้ำตาลได้คล้ายไคตินเนสและไคโทซานเนส

สิ่งที่คล้ายกันของไลโซไซม์ ไคตินเนสและไคโทซานเนส คือ ลักษณะของ subsite ที่บริเวณเร่งคล้ายกัน เป็นโปรตีนที่มีเกลียวอัลฟาจำนวนมากและมีโครงสร้างที่มี 2 lobe เช่นกัน โครงสร้างทุติยภูมิตรงบริเวณเร่งเป็นเกลียวอัลฟา 2 เกลียวและแผ่นฟลิตปีดา 1 แผ่น เช่นกัน แต่สิ่งที่แตกต่างกันคือจำนวน ชนิดและลำดับกรดอะมิโนในโมเลกุล ซึ่งได้กล่าวถึงชนิดและลำดับของกรดอะมิโนของไลโซไซม์ชนิดต่าง ๆ แล้วในตอนต้น สำหรับไคตินเนสจากเมล็ดข้าวบาร์เลย์ (barley chitinase, BCN) มีกรดอะมิโน 243 ตัวเป็นองค์ประกอบ และมีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน ส่วนไคโทซานเนสจาก *Streptomyces* N174 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 238 ตัวและมีประจุบวกอยู่จำนวนมาก (polycationic chitosanase)

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง GEWL กับ BCN แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการย่อยน้ำตาล (NAG)₆ และความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของ GEWL กับ BCN แตกต่างกัน⁹ GEWL ย่อยน้ำตาล (NAG)₆ มักจะให้ผลิตภัณฑ์เป็น (NAG)₃ กับ (NAG)₃ แต่ BCN ย่อยน้ำตาล (NAG)₆ มักจะให้ผลิตภัณฑ์เป็น (NAG)₂ กับ (NAG)₄

สามารถอธิบายกลไกการตัดซับสเตรทที่

แตกต่างกันระหว่าง GEWL กับ BCN ได้โดยการสร้างแบบจำลองของ subsite ที่จับกับซับสเตรทและคำนวณค่าพลังงานอิสระของการจับซับสเตรทที่เปลี่ยนแปลงไปก่อนและหลังจับซับสเตรท (binding free energy changes of subsites) โดยใช้สมการคณิตศาสตร์ พบว่าที่ subsite C ของ GEWL และ BCN มีค่าพลังงานแตกต่างกันมากกว่าที่ subsite อื่น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากโครงสร้างทุติยภูมิบริเวณที่ใช้จับกับน้ำตาลมีความแตกต่างกัน นอกจากนั้น GEWL ไม่มีโครงสร้างแบบเกลียวที่ subsite C ชนิดของกรดอะมิโนที่ subsite C ของเอนไซม์ทั้งสองก็แตกต่างกันด้วย กล่าวคือ subsite C ของ GEWL มี Ser100 กับ His101 ทำหน้าที่จับโมเลกุลน้ำตาล ในขณะที่ subsite C ของ BCN มี Tyr123 กับ Asn124 ทำหน้าที่จับโมเลกุลน้ำตาล ผลลัพธ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาของไคตินเนสและไคโทซานเนสมีโครงแบบกลับกันกับของซับสเตรทเช่นเดียวกับ GEWL และ T4L⁹ ความรู้ที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างไลโซไซม์ ไคตินเนสและไคโทซานเนสนี้ มีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ทดแทนกัน

การตรวจวัดไลโซไซม์

การตรวจวัดไลโซไซม์จากสิ่งส่งตรวจทำได้หลายวิธี แต่ละวิธีมีความไวในการตรวจวัดต่างกัน สิ่งส่งตรวจมักเป็นซีรัมหรือปัสสาวะ วิธีที่นิยมใช้กันแพร่หลายคือวิธีการตรวจวัดความขุ่น (turbidimetric assay)^{10,11} ซึ่งเกิดจากการที่ไลโซไซม์ทำให้เกิดการแตกของเชื้อ *Mycrococcus lysodeikticus* หากมีปริมาณไลโซไซม์มากจะมีอัตราการแตกของเชื้ออย่างรวดเร็ว กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับการลดค่าการดูดกลืนแสง 0.001 หน่วยต่อนาทีที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร pH 7 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากสามารถทำได้ง่ายและสะดวก มีความไว

ในการตรวจวัด 10 ไมโครกรัม/ลิตร วิธีนี้จึงถูกนำไปประยุกต์ใช้ในเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

วิธี radioimmunoassay เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการตรวจวัดไลโซไซม์จากซีรัมและปัสสาวะได้ หลักการของวิธีนี้ใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากกับมันดภาพรังสีทำปฏิกิริยาจำเพาะกับไลโซไซม์ มีความไวในการตรวจวัด 3.5 ไมโครกรัม/ลิตร¹² และมีความสัมพันธ์กับการตรวจวัดโดยวิธีวัดความขุ่น $r = 0.94$

วิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ใช้ตรวจวัดไลโซไซม์ได้ทั้งจากซีรัม ปัสสาวะ และน้ำลาย เป็นการตรวจวัดปริมาณโปรตีนไลโซไซม์ มีความไวในการตรวจวัด 1 ไมโครกรัม/ลิตร¹³

การตรวจวัดไลโซไซม์ที่ให้ความไวสูงใช้วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) ซึ่งมีความไวในการตรวจวัดถึง 0.2 ไมโครกรัม/ลิตร การตรวจวัดวิธีนี้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาาระดับไลโซไซม์ของผู้ป่วยโรคไต พบว่าผู้ป่วยโรคไตมีระดับของไลโซไซม์สูงกว่ากลุ่มควบคุม¹⁴ ดังนั้นระดับไลโซไซม์อาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเสียสภาพของไต

นอกจากนั้นยังมีการพัฒนาการตรวจวัดไลโซไซม์โดยใช้วิธีการวัดสี (colorimetric assay) ซึ่งใช้ p-nitrophenyl-penta-N-acetyl-beta-chitopentaoside เป็นซับสเตรต¹⁵ การตรวจวัดนี้แม้จะมีความไวเพียง 85% และมีความจำเพาะต่อไลโซไซม์ 92% ของการตรวจวัดโดยวิธีตรวจวัดความขุ่น แต่ข้อดีคือใช้เวลาในการตรวจวัดไม่เกิน 1 ชั่วโมง ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปใช้ตรวจวัดปริมาณไลโซไซม์ในน้ำตาเพื่อตรวจความผิดปกติของการทำงานของต่อมน้ำตา อันอาจนำไปสู่การเกิด ocular surface disease

การประยุกต์ใช้ไลโซไซม์

ไลโซไซม์ถูกนำไปประยุกต์อย่างกว้างขวางในหลาย ๆ ด้าน เช่น ด้านการแพทย์ ด้านการ

ตรวจวินิจฉัยโรค ด้านเภสัชกรรม ด้านอุตสาหกรรมอาหาร และด้านการเกษตร เป็นต้น

ในด้านการแพทย์ พบว่าไลโซไซม์มีความเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ยับยั้งมะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งของแมคโครฟาจ มะเร็งเต้านม มะเร็งผิวหนัง^{16,17} ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด mono-myelocytic leukemia และ monocytic leukemia ปริมาณไลโซไซม์จะมีระดับสูงขึ้นในซีรัมและในปัสสาวะ แต่ถ้าเป็นมะเร็งที่ระบบประสาทส่วนกลางจะมีไลโซไซม์เพิ่มระดับสูงในน้ำไขสันหลัง ผู้ที่มีไตเสื่อมสภาพจะมีระดับไลโซไซม์เพิ่มสูงขึ้นในปัสสาวะ ส่วนคนที่ไม่มีพยาธิสภาพใด ๆ จะพบไลโซไซม์ปริมาณน้อยอยู่ในปัสสาวะ น้ำดีและน้ำไขสันหลัง^{14,18}

ข้อมูลดังกล่าวข้างต้นนี้แสดงให้เห็นว่าไลโซไซม์สามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคบางชนิดได้ ในขณะนั้นนักวิทยาศาสตร์กำลังศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับไลโซไซม์กับโรคเอดส์ ทั้งนี้เนื่องจากไลโซไซม์ทำหน้าที่เป็นสารต้านจุลชีพธรรมชาติ (natural antibiotic) พบว่าไลโซไซม์สามารถทำลายเชื้อ HIV ที่เป็นสาเหตุของโรคเอดส์ได้ในหลอดทดลอง¹⁹ การค้นพบดังกล่าวคาดว่าจะมีประโยชน์ต่อการแพทย์ในการผลิตวัคซีนต้านโรคเอดส์

นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ยังสนใจการนำไลโซไซม์ไปใช้ด้านเภสัชกรรมด้วย เพราะไลโซไซม์มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial action) และยับยั้งไวรัส (antiviral action) รวมทั้งมีคุณสมบัติเกี่ยวกับการตอบสนองด้านภูมิคุ้มกัน (immune-response modulation action) ด้วยไลโซไซม์ถูกนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ยาโดยการทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization ไลโซไซม์ที่อยู่ในรูปผลึกเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส จะเสถียรนานเป็นปี ถ้าอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มี pH 4-5 และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเสถียรนานเป็นสัปดาห์ แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจะเสถียรนานเป็นวัน⁴

อุตสาหกรรมอาหารใช้ไลโซไซม์เป็นสารกันบูด (preservative) ในกระบวนการผลิต แทนสารกันบูดที่เป็นสารเคมี เช่น ไนเตรต ทั้งนี้เนื่องจากไลโซไซม์มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารโดยไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภค เช่น ยับยั้งสปอร์ของ *Clostridium tyrobutyricum* ที่เป็นสาเหตุของการเกิด 'late blowing' ในอุตสาหกรรมการผลิตเนย และมีการนำไปใช้ในกระบวนการหมักเครื่องดื่มนมแอลกอฮอล์เช่น อุตสาหกรรมการผลิตไวน์เพื่อช่วยกำจัดแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก²⁰ ทั้งนี้โดยได้รับการยอมรับจาก EC Commission Regulation 2066/2001 ในปี ค.ศ. 2001

ไลโซไซม์จากพืช เช่น ไลโซไซม์จากยางมะละกอ²¹ มีสมบัติแตกต่างจากไลโซไซม์จากไข่ขาว มีบทบาทในการป้องกันพืชจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ด้านการเกษตร โดยใช้เป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์สามารถสังเคราะห์พอลิเพปไทด์ที่มี lysozyme activity ได้

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับไลโซไซม์ และการแสวงหาแหล่งใหม่ ๆ ของไลโซไซม์ยังเป็นเรื่องน่าสนใจที่รอการศึกษาค้นคว้าต่อไป เพื่อประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

1. Fersht A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York: WH Freeman and Company, 1999:1-45.
2. Davis CS. Diagnostic value of muramidase. Lab Med 1971;5:51-4.
3. Blake CCF, Koenig DF, Mair GA, North ACT, Phillips DC, Sarma VR. Structure of hen egg white lysozyme: a three-

dimensional Fourier synthesis at 2 Å^o resolution. Nature 1965;206:757-61.

4. Jolles P, Jolles J. What's new in lysozyme research? Mol Cell Biochem 1984;63:165-89.
5. Grutter MG, Weaver LH, Matthews BW. Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozymes. Nature 1983;303:828-31.
6. Weaver LH, Grutter MG, Matthews BW. The refined structures of goose lysozyme and its complex with a bound trisaccharide show that the 'goose-type' lysozymes lack a catalytic aspartate residue. J Mol Biol 1995;245:54-68.
7. Strynadka NCJ, James MNG. Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site D. J Mol Biol 1991;220:401-24.
8. Monzigo AF, Marcotte EM, Hart PJ, Robertus JD. Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into prokaryotic and eukaryotic families sharing families sharing a conserved core. Nat Struct Biol 1996;3:133-40.
9. Honda Y, Fukamizo T. Substrate binding subsites of chitinase from barley seeds and lysozyme from goose egg white. Biochim Biophys Acta 1998;1388:53-65.
10. Morsky P. Turbidimetric determination of lysozyme with *Micrococcus lysodeikticus* cells: reexamination of reaction conditions. Anal Biochem 1983;128:77-85.
11. Houser MT. Improved turbidimetric assay for lysozyme in urine. Clin Chem 1983;29:1488-93.

12. Thomas MJ, Russo A, Craswell P, Ward M, Steinhardt I. Radioimmunoassay for serum and urinary lysozyme. *Clin Chem* 1981;27:1223-6.
 13. Taylor DC, Cripps AW, Clancy RL. Measurement of lysozyme by an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 1992;146:55-61.
 14. Severini G, Aliberti LM. Diagnostic significance of urinary enzymes: development of a high performance liquid chromatographic method for the measurement of urinary lysozyme. *Clin Chim Acta* 1987;163:97-103.
 15. Klaeger AJ, Cevallos V, Sherman MD, Whitcher JP, Stephens RS. Clinical application of a homogeneous colorimetric assay for tear lysozyme. *Ocul Immunol Inflam* 1999;7:7-15.
 16. Vizoso F, Plaza E, Vazquez J, Serra C, Lamelas ML, Gonzalez LO, et al. Lysozyme expression by breast carcinomas, correlation with clinicopathologic parameters, and prognostic significance. *Ann Surg Oncol* 2001;8:667-74.
 17. Meyer P, Zechel T. Quantitative studies of lysozyme and phosphohexose isomerase enzymes in mixed saliva in oral squamous epithelial carcinoma. *HNO* 2001;49:626-9.
 18. Prockup DJ, Davidson WD. A study of urinary and serum lysozyme in patients with renal disease. *New Eng J Med* 1964;270:269.
 19. Lee-Huang S, Huang PL, Sun Y. Lysozyme and RNases as anti-HIV in components in beta-core preparations of human chorionic gonadotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2678-81.
 20. WHO (World Health Organisation) Toxicological evaluation of lysozyme. Series 1993;30:25.
 21. Howare JB, Glazer AN. Papaya lysozyme: terminal sequences and enzymatic properties. *J Biol Chem* 1969;244:1399-409.
-