บทที่ 2
วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กระบือ (Buffalo)

กระบือหรือควาย ในภาษามาเลย์เรียกกระบาว (Krabau) ชาวสเปนในฟิลิปปินส์เรียกตัวผู้ว่า คาราบาว (Carabao) ตัวเมียเรียกว่า Caraballa ส่วนชาวเนเธอร์แลนด์ในอินโดนีเซียเรียก คาร์บาว (Karbauw) และชาวอังกฤษในมาเลเซียเรียกเคอร์บาว (Kerbau) ชาวเขมรเรียกว่ากระบือหรือกระบาย และเป็นไปได้ว่ากระบือในภาษาไทยจะเลียนจากภาษาเขมร แต่คำไทยแท้นั้นคือ ควาย เพราะคนไทยทั่วไปใช้คำนี้ ในบางท้องที่ของจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี หรือสุพรรณบุรี ออกเสียงว่า ฟาย (จรัญ จันทลักขณา, 2527) กระบือจัดว่าเป็นสัตว์ขนาดใหญ่ มีน้ำหนักตัวตั้งแต่ 300 – 800 กิโลกรัม ลำตัวอาจมีสีดำ สีน้ำตาล หรือสีขาว มีความทนทานในการทำงาน และมีแรงงานมาก ในท้องที่ ๆ เป็นโคลนตมกระบือทำงานได้ดีกว่าโค ทนร้อนได้ดีพอสมควร แต่ไม่ดีเท่าโค เนื่องจากโครงสร้างของผิวหนัง ต่างกัน คือ มีขนที่ผิวหนังและต่อมเหงื่อน้อยกว่า แต่กระบือมีหนังที่หนากว่า มีการหมุนเวียนโลหิตในผิวหนังดีกว่าโค จึงทำให้กระบือเป็นสัตว์ที่ชอบแช่ปลัก แช่โคลน แช่น้ำได้นานและดีกว่าโค น้ำนมกระบือมีสีขาวและมีไขมันอยู่สูง ประมาณ 7 – 9% น้ำนมกระบือเหมาะที่จะใช้ทำเนย เนยแข็ง หรือผลิตภัณฑ์นมอย่างอื่นที่ใช้ไขมันสูง การที่น้ำนมกระบือมีสีขาวเนื่องจากน้ำนมมีแคโรทีนอยู่น้อย เพราะกระบือมีประสิทธิภาพที่จะเปลี่ยนแคโรทีนไปเป็นวิตามินเอได้สูง

โดยทั่วไปกระบือมี 2 ประเภท คือ กระบือปลัก (swamp buffalo) และกระบือแม่น้ำ (riverine buffalo) โดยกระบือปลักส่วนใหญ่อยู่ในประเทศจีนและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ขณะที่กระบือแม่น้ำส่วนใหญ่อยู่ในอินเดียและปากีสถาน กระบือทั้งสองประเภทนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์เหมือนกัน คือ *Bubalus bubalis* L. แต่มีความแตกต่างกันทั้งจีโนไทป์ (genotype) และฟีโนไทป์ (phenotype) สำหรับความแตกต่างทางจีโนไทป์ที่ชัดเจนได้แก่ จำนวนโครโมโซมทั้งหมด ซึ่งกระบือปลักมีจำนวน 2n = 48 แต่กระบือแม่น้ำมีจำนวน 2n = 50 ส่วนความแตกต่างทางฟีโนไทป์ได้แก่ รูปร่างลักษณะภายนอกซึ่งสามารถแยกได้ชัดเจน คือ กระบือปลักมีลักษณะลำตัวกำยำล่ำสัน (stocky) เหมาะสมต่อการใช้แรงงาน แต่กระบือแม่น้ำมีโครงร่างใหญ่แน่น (massive) ใช้ผลิตน้ำนมเป็นหลัก (สุรชัย สุวรรณลี, ม.ป.ป.)

กระบือ (*Bubalus bubalis* L.) มีลำดับอนุกรมวิธานสัตว์ดังนี้

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Subphylum : Vertebrata

Class : Mammalia

Order : Artiodactyla

Suborder : Ruminantia

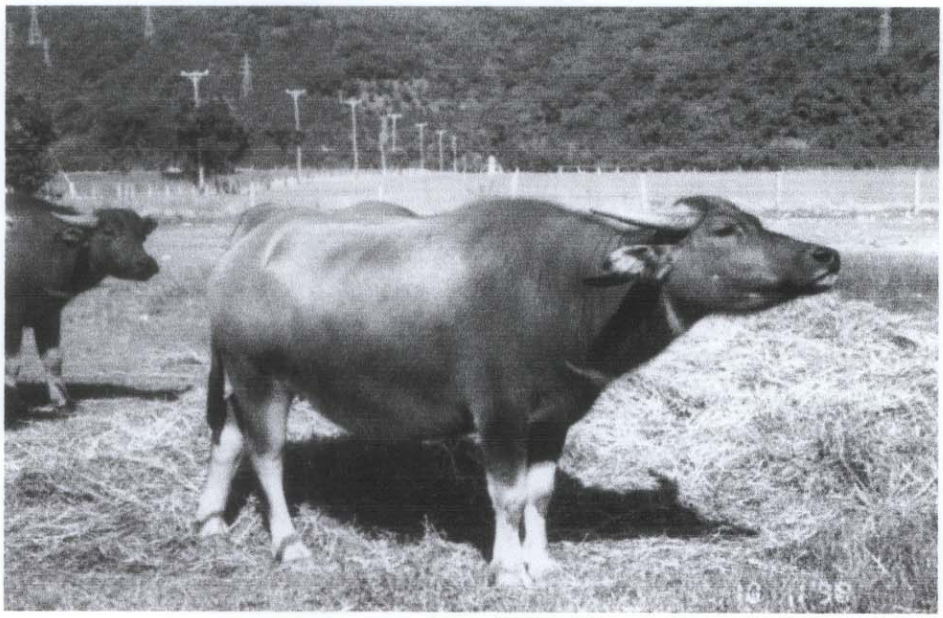
Family : Bovidae

Genus : *Bubalus*

Species : *bubalis*

กระบือไทยจัดเป็นประเภทกระบือปลัก มีลักษณะรูปร่างกำยำล่ำสัน ลักษณะเขาส่วนใหญ่โค้งเป็นวงกว้าง สีผิวเป็นสีเทาดำ มีกระบือเผือกบ้างเป็นส่วนน้อย ซึ่งแตกต่างจากโคที่มีความหลากหลายในสีสันมากกว่า คือ ขาว เทา น้ำตาล และสีดำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบือปลักมีพันธุกรรมที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ คือมียีนที่เหมือนกันและคงที่ (homologous and stable) หรืออาจเรียกว่าเป็นพันธุ์แท้ที่มีจีโนไทป์และฟีโนไทป์ใกล้เคียงกันมาก กระบือปลักจะโตเต็มวัยเมื่ออายุประมาณ 4-5 ปี โดยทั่วไปแล้วกระบือตัวผู้จะถูกใช้แรงงานมากกว่าตัวเมียเนื่องจากมีขนาดใหญ่กว่า โดยกระบือที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 400-900 กิโลกรัม ให้แรงได้เทียบเท่า 0.75 แรงม้า (Hp) ซึ่ง 1 แรงม้า หมายถึง แรงงานที่ได้จากม้าที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 400-700 กิโลกรัม (Cockril, 1994) แม้การเคลื่อนที่ของกระบือในสภาพปกติอาจจะดูเชื่องช้ามากกว่า ม้า ลา หรือล่อ แต่การเคลื่อนที่ในสภาพที่พื้นดินเป็นโคลนตมหรือสภาพที่น้ำท่วมขัง เช่น ในพื้นที่ทำนา กระบือมีการเคลื่อนที่เร็วกว่ามาก ประโยชน์ของกระบือปลักด้านเศรษฐกิจมีมากมาย เช่น เป็นแรงงานที่มีราคาถูก โดยทั่วไปเกษตรกรจะใช้ทั้งกระบือเพศผู้และเพศเมียที่มีอายุตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไปในการทำงาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้ในการไถนา เนื่องจากการใช้กระบือไถนานั้นจะช่วยให้ดินไม่แน่น และสามารถเดินได้ดีในที่มีน้ำขัง น้ำนมที่ได้จากกระบือปลักนั้นมีปริมาณของโปรตีน ฟอสฟอรัส และวิตามินเอสูง และสามารถที่จะนำมาแปรรูปเป็นเนย (butter) น้ำมันเนย (butter oil) เนยแข็ง (hard cheese) นมข้น นมระเหยน้ำ ไอศกรีม โยเกิร์ต และ butter milk ได้ เนื้อนำมาใช้ประกอบอาหาร มูลก็สามารถนำมาใช้เป็นปุ๋ยในนาไร่ หรือนำมาผลิตเป็นแก๊สชีวภาพได้ โดยที่กระบือปลักสามารถให้มูลได้ประมาณปีละ 2-3 ตันต่อตัว (จรูญศักดิ์ สวนสวรรค์, 2548) สำหรับคุณค่าด้านสังคมของกระบือใน

ชนบทของประเทศในเอเชียยังคงเปรียบกระบือเป็นเสมือนธนาคารหรือเป็นสมบัติของครอบครัว ที่สามารถเปลี่ยนเป็นเงินได้ทันทีเมื่อมีความต้องการเร่งด่วน บางประเทศใช้เป็นสินสอดในงานแต่งงาน เช่น ในอินโดนีเซีย และบางประเทศยังมีเกมส์แข่งควายหรือชนควายซึ่งถือเป็นคุณค่าทางสังคมของกระบือ การเลี้ยงกระบือในประเทศไทยเป็นการเลี้ยงตามยถากรรม ไม่มีการปรับปรุงพันธุ์ ในปี พ.ศ. 2544 มีประมาณ 1.7 ล้านตัว และประมาณ 80% เลี้ยงโดยเกษตรกรรายย่อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเลี้ยงมากที่สุดในจังหวัดอุบลราชธานี ในปัจจุบันจำนวนประชากรของกระบือปลักประเทศไทยลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 5-13% ต่อปี สาเหตุที่สำคัญ คือ การฆ่าเพื่อบริโภคในปริมาณที่สูงมากขึ้นตามจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น (จินตนา อินทรมงคล, 2539) จนน่าเป็นห่วงว่ากระบือไทยที่เคยเป็นสัตว์คู่บ้านคู่เมืองมานานอาจเหลือไว้เพียงชื่อให้คนรุ่นหลังทำความรู้จักเท่านั้น



ภาพที่ 1 ลักษณะของกระบือปลัก (ที่มา: Shih, 1992)

จากรายงานสถิติของกระบือในประเทศไทยของกรมปศุสัตว์ปี พ.ศ. 2538-2548 พบว่าจำนวนของกระบือมีแนวโน้มของการลดปริมาณลงทุกปีคือ ปี พ.ศ. 2538 มีกระบือในประเทศไทยทั้งหมด 3,710,061 ตัว แต่ในปี พ.ศ. 2548 มีกระบือเหลือเพียง 1,624,919 ตัวเท่านั้น และสาเหตุที่สำคัญของการลดจำนวนลงของประชากรกระบือปลักมีหลายประการด้วยกัน เช่น

1. ผู้บริโภคนิยมบริโภคเนื้อวัวมากกว่าเนื้อกระบือจึงไม่มีแรงจูงใจให้เกษตรกรเลี้ยงกระบือเพื่อขายเนื้อ

2. มีการเปลี่ยนแปลงระบบเศรษฐกิจจากภาคเกษตรกรรมเข้าสู่ภาคอุตสาหกรรมมากขึ้น

3. มีการนำเครื่องจักรกล เช่น รถไถนาเข้ามาใช้ในการไถนาแทนกระบือมากขึ้นเนื่องจากมีความสะดวกและรวดเร็วกว่า

4. มีการทำลายพันธุ์กระบือ โดยนำกระบือเพศเมียซึ่งเหมาะแก่การเก็บไว้ใช้เป็นแม่พันธุ์รวมทั้งกระบือที่ยังโตไม่เต็มที่ทั้งเพศผู้และเพศเมียเข้าไปขายในโรงฆ่าสัตว์เพื่อใช้เป็นอาหาร

5. เกษตรกรไม่นิยมเลี้ยงกระบือเพศผู้ เพราะคิดว่าไม่สามารถให้ลูกได้จึงนำไปขายให้โรงฆ่าสัตว์ ดังนั้นจึงไม่มีพ่อพันธุ์ที่ดีเหลืออยู่ในฝูงทำให้อัตราการติดลูกและการเจริญเติบโตลดลง อีกทั้งลูกกระบือที่ได้อาจมีลักษณะที่ไม่ดีส่งผลให้การเพิ่มจำนวนของกระบือปลักมีอัตราลดลง

6. เนื่องจากเนื้อของกระบือปลักมีความนุ่มและเหนียวเป็นอย่างมากจึงมักมีการลักลอบฆ่าเพื่อนำเนื้อมาทำลูกชิ้น (ธรรมนันท์ จันทรมณี, 2548)

ตารางที่ 1 สถิติกระบือปลักในประเทศไทยแสดงรายภาคปี พ.ศ. 2538-2548

ปี พ.ศ.	ภาคกลาง (ตัว)	ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ตัว)	ภาคเหนือ (ตัว)	ภาคใต้ (ตัว)	รวมทั่วประเทศ (ตัว)
2538	228,023	3,009,063	398,562	74,413	3,710,061
2539	153,892	2,258,494	236,686	70,602	2,719,674
2540	135,618	1,911,639	187,095	59,586	2,293,938
2541	109,806	1,614,867	171,371	55,024	1,951,068
2542	97,879	1,503,176	151,134	47,417	1,799,606
2543	98,968	1,406,442	151,829	44,984	1,702,223
2544	104,415	1,413,697	149,856	42,127	1,710,095
2545	102,263	1,317,540	163,953	33,602	1,617,358
2546	114,562	1,316,530	168,526	33,088	1,632,706
2547	97,573	1,215,531	153,211	27,923	1,494,238
2548	130,609	1,241,766	220,610	31,934	1,624,919

ที่มา: กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ (2548)

จากสถานการณ์ที่จำนวนประชากรกระบือปลักของประเทศไทยลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ทำให้กรมปศุสัตว์ตระหนักถึงความจำเป็นในการอนุรักษ์และยับยั้งอัตราการการลดลงของจำนวนประชากรกระบือปลักจึงได้ดำเนินกิจกรรมหมู่บ้านอนุรักษ์และพัฒนากระบือปลักขึ้น โดยดำเนินการเฉพาะ 19 จังหวัด ๆ ละ 1 หมู่บ้านในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการเลี้ยงกระบือปลักหนาแน่นหรือมากกว่าร้อยละ 80 ของประเทศ แม้กรมปศุสัตว์จะดำเนินการและยับยั้งการลดลงของกระบือปลักแต่อัตราการลดลงยังคงเป็นไปอย่างรวดเร็วจึงควรมีความร่วมมือจากหลาย ๆ ฝ่าย มีแนวทางการพัฒนาอย่างยั่งยืน มีการวางแผนการอนุรักษ์แนวทางอื่นร่วมหรือศึกษาวิจัยในแนวทางต่าง ๆ อย่างจริงจังและเร่งรีบเพื่อนำไปสู่การเพิ่มจำนวนประชากรของกระบือปลัก

2. ลักษณะทั่วไปของเอนไซม์

เอนไซม์เป็นสารประกอบอินทรีย์พวกโปรตีนมีสมบัติทั่วไปเหมือนโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์ มีการสลายไปและถูกสร้างขึ้นใหม่ตลอดเวลา โดยในปี ค.ศ.1926 J.B. Sumner เป็นคนแรกที่สามารถเตรียมผลึกที่บริสุทธิ์ของเอนไซม์ได้ โดยการสกัดยูรีเอส (urease) ออกมาเป็นรูปผลึกบริสุทธิ์ และพบว่าผลึกนั้นคือโปรตีนที่สามารถเร่งการสลายยูเรียให้เป็นแอมโมเนียกับคาร์บอนไดออกไซด์ จนถึงปัจจุบันพบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้ทุกชนิดเป็นโปรตีนทั้งสิ้น อาจเรียกเอนไซม์ได้ว่าเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ (biocatalysts) เพราะปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งซึ่งเกิดขึ้นในร่างกายนั้นสามารถดำเนินได้ที่พีเอชเป็นกลางและอุณหภูมิไม่สูง เอนไซม์แตกต่างจากตัวเร่งทั่วไป คือ มีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะต่อซับสเตรทสูง ซึ่งระดับความจำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ โดยซับสเตรทเหล่านั้นต้องมีหมู่หรือพันธะชนิดเดียวกันที่จำเพาะต่อเอนไซม์ด้วย นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีประสิทธิภาพในการทำงานสูงด้วยเพราะอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตังเร่งจะสูงกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีเอนไซม์ช่วยเร่งได้ถึง 10^{20} เท่า (มนตรี จุฬาวัฒนฑล, 2530)

3. แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส

3.1 ลักษณะทั่วไปของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส

แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส (α-L-fucosidase) หรือเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคไซด์ ฟูโคไฮโดรเลส (α-L-fucoside fucohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มเอนไซม์พวกไฮโดรไลติก (hydrolytic enzyme) ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายสารชีวโมเลกุลที่มีน้ำตาลแอลฟูโคสเป็นองค์ประกอบได้เป็นแอลกอฮอล์และน้ำตาลแอลฟูโคส ทำหน้าที่ในการตัดน้ำตาลฟูโคสที่ต่ออยู่ปลายสุดของสารประกอบชีวโมเลกุลที่มีน้ำตาลแอลฟูโคสเป็นองค์ประกอบ เช่น ไกลโคโปรตีน (glycoprotein)

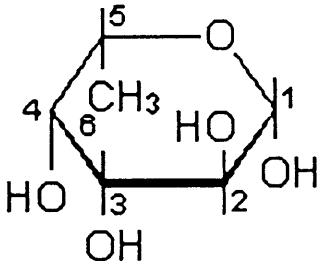
หรือไกลโคลิพิด (glycolipid) (Alhadeff, 1998) แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมีรหัสประจำตัวเอนไซม์ (code number) เป็น EC. 3.2.1.51 โดยตัวเลขชุดแรกจะบ่งบอกถึงพวกของเอนไซม์ (enzyme class) ซึ่งจัดอยู่ในพวกไฮโดรเลสซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดยกระบวนการไฮโดรไลซีส ตัวเลขชุดที่สองจะแบ่งเป็นพวกย่อย ๆ ตามชนิดของพันธะที่แยกสลายด้วยน้ำ คือ ไกลโคซิดิก (glycosidic) ตัวเลขชุดที่สามบ่งบอกถึงรายละเอียดของพันธะที่แยกสลายด้วยน้ำ คือ เป็นเอนไซม์พวกคาร์บอกซิลิก ไกลโคซิดิกไฮโดรเลส ส่วนตัวเลขที่สี่บอกถึงซับสเตรทของเอนไซม์ที่แยกสลายด้วยน้ำ

กระบวนการสร้างแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในมนุษย์ถูกควบคุมโดยยีนที่มีตำแหน่งอยู่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 1 (1p34.1-1p36.1) มีลักษณะเป็นยีนเดี่ยว (single gene) นอกจากนี้พบว่ายังมีซูโดยีน (pseudogene) อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 ที่มีลำดับเบสเหมือนกับยีนฟูโคซิเดสถึงร้อยละ 80 แต่ไม่มีส่วนที่อ่านรหัสได้ (open reading frame) (Kretz *et al.*, 1992)

แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ฟังไจ โปรโตซัว พืช สัตว์ และมนุษย์ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (mammalian) พบแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากเนื้อเยื่อ เซลล์ และของเหลวหลายแห่ง เช่น ในสมอง ไต ม้าม รก ตับ พลาสมาของน้ำอสุจิ และอสุจิ เป็นต้น (Johnson and Alhadeff, 1991) โดยปกติจะพบเอนไซม์ชนิดนี้ละลายน้ำอยู่ในไลโซโซม (lysosome) ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดมีพีเอชประมาณ 4-6 (Aviles *et al.*, 1996)

ปัจจุบันพบ แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ชนิดใหม่ ที่บริเวณผนังเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (plasma membrane) ของหอยสองฝา (Focarelli *et al.*, 1997) หอยขม (อรุณี แปยาว, 2544, สิทธิศักดิ์ ทองรอง, 2545) คางคก (Matinez *et al.*, 2000) หนูขาว (Aviles *et al.*, 1996) วัว (ปรีชา ลาภมาก, 2545; วุฒิไกร นิ่มละมูล, 2546) มนุษย์ (Khunsook *et al.*, 2003) และกระบือปลัก (*Bubalus bubalis* L.) (สิทธิศักดิ์ จันทรัตน์, 2548) โดยจากการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของมนุษย์พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสไม่ได้ละลายอยู่ในสารละลายและไม่ได้พบอยู่ในไลโซโซม แต่จะพบอยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นพวกโปรตีนที่ฝังตัวแน่นภายในชั้นลิพิด (integral membrane protein) โดยมีลักษณะแบบโปรตีนที่พาดผ่านเพียงครั้งเดียว (single pass transmembrane protein) และน้ำตาลที่อยู่นอกสุดไม่มีกรดเซียลิกสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง (Khunsook *et al.*, 2002) นอกจากนี้ในการศึกษาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของมนุษย์โดย Khunsook *et al.*. (2002) พบว่าลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีไอโซฟอร์ม (isoform) ที่เด่นชัดจำนวน 2 ไอโซฟอร์ม (พีไอ 6.5 และ 6.7) และในพลาสมาของน้ำอสุจิโดยทั่วไปมีอยู่ประมาณ 3 – 6 ไอโซฟอร์ม สำหรับการศึกษาด้วยวิธี Western analysis พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบน

เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีน้ำหนักโมเลกุล 51 kDa และในพลาสมาของน้ำอสุจิมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56-57 kDa เมื่อทดสอบทางจลนพลศาสตร์ (kinetics) พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีพีเอชที่เหมาะสมในสภาวะเป็นกลาง ประมาณช่วงพีเอช 6.8–7.3 มีค่า Michaelis-Menten constant (K_m) เท่ากับ 0.08 mM และค่า Maximum velocity (V_{max}) เท่ากับ 6.8 μmol/min/mg protein ส่วนในพลาสมาของน้ำอสุจิมีพีเอชที่เหมาะสมในสภาวะเป็นกลาง ประมาณช่วงพีเอช 4.0–4.5 มีค่า Michaelis-Menten constant (K_m) เท่ากับ 0.06 mM และค่า Maximum velocity (V_{max}) เท่ากับ 92 μmol/min/mg protein



ภาพที่ 2 โครงสร้างของน้ำตาลแอลฟูโคส (ที่มา: Wieczorek and Thimm, 2005)

3.2 ความสำคัญของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส

3.2.1 โรคฟูโคซิโดซีส (fucosidosis)

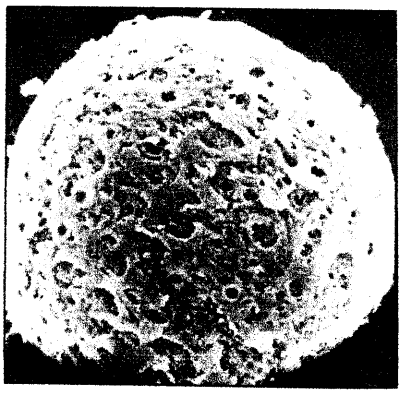
การขาดเอนไซม์ชนิดนี้จะมีผลทำให้เกิดโรคฟูโคซิโดซีสซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่ค่อนข้างหายาก มีการถ่ายทอดแบบยีนด้อยบนโครโมโซมร่างกาย (autosomal recessive) เป็นผลเนื่องจากการไม่มีกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเพราะเกิดการกลาย (mutation) ทำให้เกิดการสะสมของสารชีวโมเลกุลที่มีน้ำตาลฟูโคสเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ สารพวกไกลโคโปรตีน และไกลโคลิพิดในอวัยวะต่าง ๆ ทำให้เสียชีวิตตั้งแต่วัยเด็ก โรคฟูโคซิโดซิสมี 2 ชนิด คือ fucosidosis type I โรคฟูโคซิโดซีสชนิดนี้ผู้ป่วยจะเป็นโรคก่อนอายุประมาณ 6 เดือน จากนั้นอาการของโรคก็จะเป็นไปอย่างรวดเร็วและเสียชีวิตก่อนอายุ 10 ปี ส่วน fucosidosis type II ผู้ป่วยจะป่วยเป็นโรคเมื่ออายุได้ประมาณ 1 ปี อาการของโรคจะเป็นไปอย่างช้า ๆ ซึ่งจะช้ากว่าแบบแรก โดยผู้ป่วยอาจมีชีวิตอยู่ถึงประมาณ 20 ปี ลักษณะอาการทางคลินิกที่แสดงให้เห็นในผู้ที่ป่วยเป็นโรคฟูโคซิโดซีสได้แก่ มีการเสื่อมลงของระบบประสาทอัตโนมัติ (sympathetic nervous system) ปัญญาอ่อน เกิดความบกพร่องของการสร้างกระดูก เจริญเติบโตช้า มีอาการชักของลมบ้าหมู กล้ามเนื้อกระตุก อวัยวะภายในช่องท้องขยายโตขึ้น ผิวหนังเป็นหูด เคลื่อนไหวช้า สายตาผิดปกติ สูญเสียการได้ยิน และมีอาการเกี่ยวกับโรคหัวใจ เป็นต้น (Willems *et al.*, 1999)

สำหรับความสำคัญของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ยังไม่ทราบแต่มีรายงานในสุนัขที่เป็นโรคฟูโคซิโดซีสว่าจะมีปริมาณอสุจิลดลง เกิดความผิดปกติบริเวณอะโครโซม (acrosome) ของอสุจิ เซลล์อสุจิไม่สามารถพัฒนาจนเป็น mature spermatozoa และพบว่าในพลาสมาของน้ำอสุจิของสุนัขที่มีเซลล์อสุจิจำนวนประมาณ 72.6 ล้านตัว มีเพียงร้อยละ 3-5 เท่านั้นที่อสุจิสามารถเคลื่อนที่ได้ แสดงให้เห็นว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมีความจำเป็นต่อการพัฒนาของตัวเซลล์อสุจิและมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Veeramachaneni *et al.*, 1998)

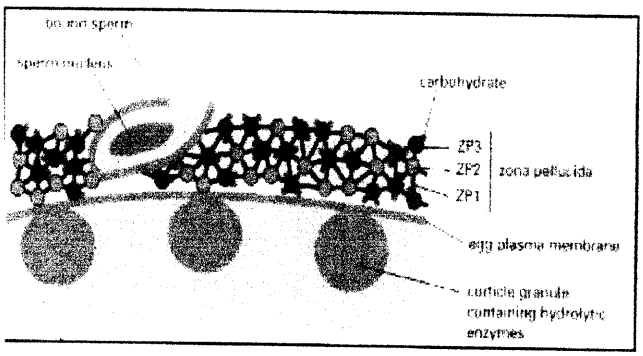
3.2.2 กระบวนการปฏิสนธิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

กระบวนการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างอสุจิและไข่ (sperm-egg interaction) ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (species-specific form) ในการที่จะมีเซลล์เหล่านั้นจดจำกันได้ (recognition) และเกิดกระบวนการจับกัน (binding) ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องเกิดขึ้นก่อนจะมีการปฏิสนธิ โดยที่ปฏิสัมพันธ์เหล่านี้จะเกี่ยวข้องกันระหว่างโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (protein-carbohydrate interaction) (Park *et al.*, 2002)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมก่อนที่จะมีการปฏิสนธิจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิก่อน (sperm capacitation) เพื่อให้เกิดความสมบูรณ์และความพร้อมของอสุจิก่อนจะพบกับไข่ โดยจะมีการเคลื่อนย้ายและเปลี่ยนตำแหน่งของไกลโคโปรตีนที่อยู่บนและฝังในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ เมื่อกระบวนการดังกล่าวเสร็จสิ้น อสุจิจะเดินทางจนถึงส่วนของโซนาเพลลูซิดา (zona pellucida, ZP) ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีนที่ปกคลุมอยู่บนผิวด้านนอกของเซลล์ไข่ บริเวณโซนาเพลลูซิดานี้จะเป็นบริเวณแรกที่จะเกิดการจับกัน (primary binding site) ของอสุจิกับไข่ โดยที่โซนาเพลลูซิดาจะมี 3 ชนิด คือ ZP1, ZP2 และ ZP3 มีน้ำหนักโมเลกุล 200, 120, และ 83 kDa ตามลำดับ ซึ่งพบว่า ZP3 มีคุณสมบัติเป็นรีเซปเตอร์ของอสุจิ และน้ำตาลที่พบบริเวณนี้ ได้แก่ กรดเซียลิก (sialic acid) ฟูโคส (fucose) แมนโนส (mannose) กาแลกโทส (galactose) N-acetylgalactosamine และ N-acetylglucosamine เป็นต้น (อำพา เหลืองภิรมย์, 2536)



ภาพที่ 3 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะภายนอกของโซนาเพลลูซิดา (ที่มา : http://www.ansi.okstate.edu/course/3443/study/Embryo Development/EARLYEMB/img002.JPG)



ภาพที่ 4 การจัดเรียงตัวกันของ ZP1 ZP2 และ ZP3 ประกอบกันเป็นโซนาเพลลูซิดา (ที่มา : Alberts *et al.*, 2002)

การจับกันของอสุจิกับไข่จะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นตัวกลาง (carbohydrate-mediated) บนเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งอสุจิจะจดจำและจับอย่างจำเพาะกับโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมอยู่กับไกลโคโปรตีน (ZP-glycoprotein) ของไข่ (Wassarman and Litscher, 2001) ในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีรีเซปเตอร์ต่าง ๆ ที่ประกอบด้วย saccharide-binding protein ได้แก่ fucose-binding protein mannose-binding protein และ galactose-binding protein รวมทั้งประกอบด้วยโปรตีนพวกไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (glycosyltransferase) และไกลโคซิเดส (glycosidase) ได้แก่ เบต้า-1-4 กาแลกโทซิลทรานสเฟอเรส (β-1-4 galactosyl transferase) ฟูโคซิลทรานสเฟอเรส (fucosyltransferase) แอลฟา-ดี-แมนโนซิเดส (α-D-manosidase) แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส และ

เบต้า-กลูโคโรนิเดส (β-glucoronidase) เป็นต้น (Park *et al.*, 2002) เมื่ออสุจิเข้าไปจับกับไข่โดยอาศัยการจดจำและการจับอย่างจำเพาะของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ที่เป็นองค์ประกอบบนเยื่อหุ้มเซลล์จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอะโครโซมรีแอ็กชันทำให้อสุจิสามารถเจาะผ่านชั้นโซนาเพลลูซิดาได้ซึ่งนำไปสู่การปฏิสนธิ

แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและพลาสมาของน้ำอสุจิมีความสำคัญในกระบวนการปฏิสนธิของสัตว์หลายชนิด โดยแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในขั้นตอนการจับกันของอสุจิและไข่ (sperm-egg binding) พบว่าเซลล์อสุจิและไข่ของสัตว์หลายชนิดมีคาร์โบไฮเดรตเป็นตัวกลางให้อสุจิไปจับกับไข่ โดยโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิและไกลโคคอนจูเกต (glycoconjugate) บนผิวของไข่เป็นตำแหน่งที่โปรตีนไกลโคซิลทรานสเฟอเรส และไกลโคซิเดสไปจับกับน้ำตาลซึ่งทำให้เกิดสมมุติฐานว่าโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์อสุจิเป็นโปรตีนรีเซปเตอร์ (protein receptors) สำหรับจับกับไกลโคโปรตีนของไข่ จากการศึกษาในหนูเกี่ยวกับสมมุติฐานดังกล่าวซึ่งมีโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccarides) เชื่อมอยู่กับ 2 serine residues (O-glycans) บนโซนาเพลลูซิดา (zona pellucida glycoprotein, ZP3) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีบทบาทสำคัญในการจับกับโปรตีนบนอสุจิ (เช่น sp56, β-1-4 galactosyltransferase และ p95) โดยพบว่าการเกิดกระบวนการกลาย (mutagenesis) ของแต่ละตำแหน่งของแต่ละ serine residue เป็นผลจากการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ ZP3 บนผิวของไข่จึงไม่สามารถจับกับอสุจิได้ (Wassarman and Litscher, 2001) จากการทดลองแสดงให้เห็นความสำคัญของโปรตีนที่อยู่บนผิวเซลล์อสุจิซึ่งแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสอาจเกี่ยวข้องในกระบวนการที่อสุจิจะไปจับกับไข่ที่มีน้ำตาลแอลฟูโคสเป็นองค์ประกอบ โดยแอลฟูโคสจะมีส่วนยับยั้งในการปฏิสนธิ จึงได้มีการศึกษาในหนู hamsters (Ahuja, 1982) หนู mice (Boldt *et al.*, 1989) เพรียงหัวหอม (ascidian) (Hoshi, 1985, Matsumoto *et al.*, 2002) หนู rat (Shalgi *et al.*, 1986) และมนุษย์ (DeCerezo *et al.*, 1996)

นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลฟูโคส (fucose) บางส่วนจำเป็นใน zona pellucida ligand สำหรับตำแหน่งที่อสุจิจะไปจับและยังพบแอลฟูโคซิล (L-fucosyl) ในอะโครโซมโดยตรวจหาตำแหน่งเอนไซม์จากการติดฉลาก Neoglycoprotein fluorescien isothiocyanate bovine serum albumin-L-fucose (FITC-BSA-Fuc) พบตำแหน่งของ FITC-BSA-Fuc ที่ส่วนหัวของอสุจิซึ่ง FITC-BSA-Fuc จะถูกยับยั้งโดยฟูคอยดิน (fucoidin) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของฟูโคสซัลเฟต (polymer of predominantly sulfated L-fucose) แสดงว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส บนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิสามารถจับน้ำตาลแอลฟูโคสได้ (Khunsook *et al.*, 2003)

จากการศึกษา แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส ในสิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ได้แก่เพรียงหัวหอม (ascidian) *Halocynthia rorretzi* พบว่าที่เซลล์อสุจิของเพรียงหัวหอมมี

แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสทำหน้าที่จับกับน้ำตาลแอลฟา-แอล-ฟูโคซิล (α-L-fucosyl) ที่ต่ออยู่บริเวณส่วนปลายของสายไกลโคโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ (vitelline coat) ของไข่ ทำให้เกิดกระบวนการ sperm-egg binding (Matsumoto *et al.*, 2002)

ดังนั้นจึงทำให้คาดได้ว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการจดจำสารชีวโมเลกุล คือเป็นโปรตีนรีเซปเตอร์ซึ่งมีความจำเพาะกับน้ำตาลฟูโคสที่ต่ออยู่บริเวณสายไกลโคโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ของไข่ ส่วนแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่พบในพลาสมาของน้ำอสุจิอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในฐานะที่เป็นตัวกลางให้อสุจิสามารถจับกับไข่ได้อย่างจำเพาะ ทำให้เกิดกระบวนการจับกันระหว่างอสุจิและไข่นำไปสู่กระบวนการเกิดการปฏิสนธิ

หน้าที่ของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในกระบวนการปฏิสนธิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมยังไม่ชัดเจน แต่จากการศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ในบริเวณต่าง ๆ และคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสทำให้คาดว่าเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการจับกันระหว่างอสุจิกับไข่ซึ่งช่วยให้มีการปฏิสนธิในสิ่งมีชีวิต แต่ยังจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงหน้าที่ของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสนี้ต่อไป

4. ไอโซฟอร์ม (Isoform)

ไอโซฟอร์ม คือ รูปแบบที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยของโปรตีนที่สร้างจากยีนเดียวกัน เช่น การมีโครงรูปธรรมชาติหรือสมบัติบางประการด้านโครงสร้างแตกต่างกัน เป็นต้น ปกติปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดไอโซฟอร์มของโปรตีนมีดังนี้

4.1 Alternative splicing เป็นกระบวนการตัดแต่ง mRNA ต้นกำเนิดได้มากกว่าหนึ่งแบบ กระบวนการนี้จะเกิดหลังกระบวนการถอดรหัสของ mRNA ทำให้ได้ mature mRNA หลายแบบส่งผลให้ได้โปรตีนหลายแบบด้วย และพบเฉพาะในยูคาริโอตเท่านั้น ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะทำการตัดอินทรอนออกจาก mRNA ต้นกำเนิด (pre mRNA) และนำส่วนของเอกซอนมาเชื่อมต่อกันเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป โดยการเชื่อมต่อของเอกซอนและการตัดอินทรอนออกนั้นจะถูกกำหนดด้วยเซอรีน (serine) หรืออาร์จินีน (arginine) ในโปรตีน (เสาวลักษณ์ จิรกุลสมโชค, 2543)

4.2 Posttranslational modification เป็นกระบวนการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนหลังการแปลรหัสเพื่อให้ได้โปรตีนที่ทำหน้าที่ได้อย่างสมบูรณ์ การดัดแปลงที่เกิดขึ้นเป็นลักษณะเฉพาะตัวของโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งสามารถแบ่งการดัดแปลงได้ดังนี้

4.2.1 การตัดบางส่วนของโมเลกุลออก โปรตีนที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ส่วนใหญ่จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ซึ่งต่อมาจะถูกตัดบางส่วนออกไปก่อนที่โปรตีนนั้นจะ

ทำหน้าที่ได้ เช่น ฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) ถูกสร้างขึ้นมาในรูปพรีโพรอินซูลิน (preproinsulin) จากนั้นจึงถูกเปลี่ยนเป็นอินซูลินโดยผ่านขั้นตอนการตัดบางส่วนของโมเลกุลต้นกำเนิดออกไป

4.2.2 การเติมโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรท (glycosylation)ไกลโคโปรตีนเป็นกลุ่มสารชีวโมเลกุลที่พบมากในธรรมชาติ ตั้งแต่แบคทีเรียจนถึงมนุษย์ สำหรับในคนพบได้ทั้งในส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อและในส่วนของเหลวของร่างกาย เป็นหมู่คาร์โบไฮเดรตในรูปโอลิโกแซ็กคาไรด์เกาะติดอยู่กับโปรตีนซึ่งอาจเป็นได้ตั้งแต่สายสั้น ๆ จนถึงมีความยาวถึง 15 หน่วย สายนี้อาจเป็นเส้นตรงหรือแตกแขนงก็ได้ หมู่คาร์โบไฮเดรตเหล่านี้อาจเกาะอยู่กับอะตอมของออกซิเจนของกรดอะมิโนพวกเซอรีน (serine) หรือทรีโอนิน (threonin) แบบ O – glycosidic bond หรืออาจเกาะกับอะตอมไนโตรเจนของกรดอะมิโนอาร์จินิน (arginine) แบบ N - glycosidic bond หมู่คาร์โบไฮเดรตในรูปโอลิโกแซ็กคาไรด์เกาะติดอยู่กับโปรตีนมีความหลากหลายและความสลับซับซ้อนเป็นอย่างยิ่ง (พจน์ ศรีบุญลือ และคณะ, 2543) น้ำตาลที่เติมในสายคาร์โบไฮเดรตก็มีความแตกต่างกันซึ่งจะมีการฟอร์มของโอลิโกแซ็กคาไรด์หลายรูปแบบที่พบในไกลโคโปรตีน โดยน้ำตาลที่พบ ได้แก่ fucose mannose galactose N-acetylglucosamine และ sialic acid เป็นต้น (Stryer, 1995) แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ที่จำเพาะของหมู่คาร์โบไฮเดรตโดยเฉพาะอย่างยิ่งหน้าที่ในส่วนเกี่ยวข้องในเรื่องเป็นตัวรับและจำกันได้ของเซลล์ เป็นต้น ไกลโคโปรตีนเกิดจากการเติมสายคาร์โบไฮเดรทลงบนโมเลกุลของโปรตีน กรดอะมิโนในโปรตีนที่เป็นตัวเชื่อมต่อกับสายคาร์โบไฮเดรทได้แก่ แอสพาราจีน เซอรีน และทรีโอนีน (threonine) การเติมสายคาร์โบไฮเดรทนี้ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Glycosyltransferase ซึ่งพบในพลาสมิกเรติคูลัม คาร์โบไฮเดรทส่วนใหญ่ที่ถูกนำมาเติม ได้แก่ แมนโนส (mannose) กลูโคส (glucose) กาแลคโทส (galactose) ไซโลส (xylose) N-acetylglucosamine และ N-acetylneuraminic acid หรือกรดเซียลิก เป็นต้น

4.2.3 การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond formation) โปรตีนที่มีกรดอะมิโนซีสเทอีน (cysteine) อยู่หลายหน่วยในสายโพลีเพปไทด์ หลังจากถูกสร้างขึ้นมาแล้วมักมีพันธะไดซัลไฟด์เกิดขึ้นระหว่างหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (-SH) ของกรดอะมิโนซีสเทอีน ตัวอย่างเช่น ฮอร์โมนอินซูลิน เป็นต้น

2.4.2.4 การติดหมู่พรอสเทติก (attachment of prosthetic group) โปรตีนบางอย่างจะทำหน้าที่ได้สมบูรณ์ก็ต่อเมื่อมีสารประกอบบางชนิดที่ไม่ใช่โปรตีนที่เรียกว่าหมู่พรอสเทติกรวมอยู่ในโมเลกุลด้วย ถ้าโปรตีนขาดหมู่เหล่านี้แล้วจะทำงานไม่ได้ ยกตัวอย่างเช่น ฮีม (heme) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของฮีโมโกลบิน (hemoglobin) และไซโทโครม (cytochrome) เป็นต้น

4.2.5 การเติมหมู่คาร์บอกซิล (carboxylation) การเติมหมู่คาร์บอกซิลให้กับหมู่องค์ประกอบกรดอะมิโนบางตัวในโปรตีนบางชนิดทำให้โปรตีนนั้นสามารถทำงานได้ เช่น การ

เติมหมู่คาร์บอกซิลที่ตำแหน่งแกรมมา (γ) ของกรดอะมิโนกลูทามิก (glutamic acid) ในโปรตีนโพรทรอมบิน (prothrombin) และปัจจัยแข็งตัวของเลือด (blood clotting factor) บางตัวจะทำให้โปรตีนเหล่านี้ทำหน้าที่จับกับแคลเซียม (Ca^{2+}) ได้

4.2.6 การเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับกรดอะมิโนบางตัวในสายโพลีเพปไทด์โดยเอนไซม์โปรตีนไคเนส (protein kinase) เป็นกระบวนการหนึ่งที่เซลล์ใช้ควบคุมหรือกำหนดการทำงานของโปรตีน กรดอะมิโนที่มักถูกเติมหมู่ฟอสเฟตได้แก่ เซอรีน ทรีโอนีน และไทโรซีน (tyrosine)

4.2.7 การเติมหมู่เมทิล (methylation) กรดอะมิโนไลซีน (lysine) และกรดกลูทามิกของโปรตีนบางชนิดจะถูกเติมหมู่เมทิล 1-2 หมู่ เช่น โมโนเมทิลไลซีน (monomethyl lysine) และไดเมทิลไลซีน (dimethyl lysine) ที่พบในไซโทโครมซี (cytochrome C) เป็นต้น

4.2.8 การเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) กรดอะมิโนโพรลีน (proline) และไลซีนหลายหน่วยในสายคอลลาเจนจะถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิลเป็นไฮดรอกซิโพรลีน (hydroxyproline) และไฮดรอกซิไลซัน (hydroxylysine) ตามลำดับ (เสาวลักษณ์ จิรกุลสมโชค, 2543)

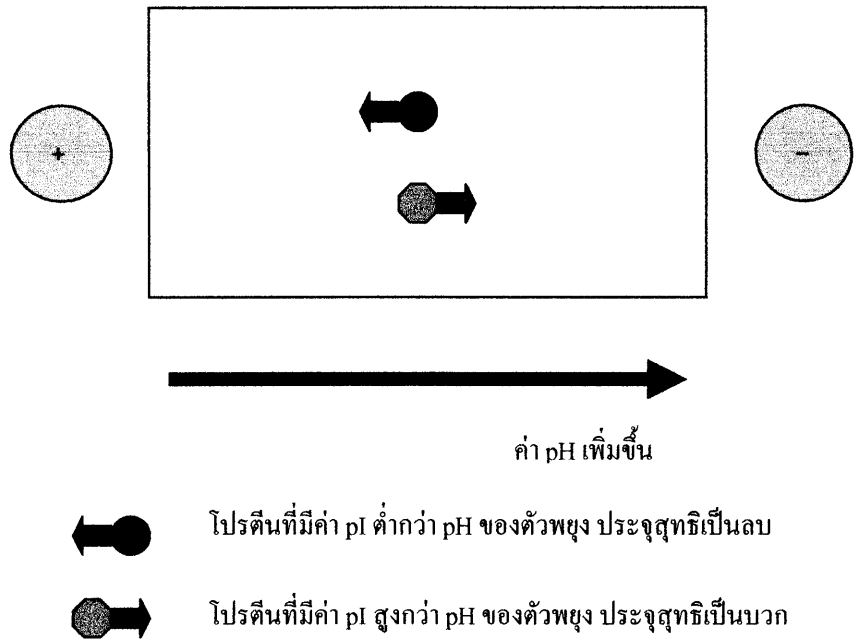
4.3 RNA editing เป็นกระบวนการดัดแปลงแก้ไขลำดับของ mRNA ต้นกำเนิด (pre mRNA) ทำให้ได้ mature mRNA ที่แตกต่างกันส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่มีความแตกต่างกันในที่สุด

สำหรับเทคนิคที่นิยมใช้ในการศึกษาไอโซฟอร์มของเอนไซม์แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส คือ เทคนิค Isoelectric focusing หรือ IEF เป็นเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิสอีกหนึ่งแบบที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีทั้งประจุลบและประจุบวกภายในโมเลกุล เช่น โปรตีน หรือเอนไซม์ เป็นต้น โดยการเคลื่อนที่ของสารดังกล่าวจะอยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าของสารละลาย polyacrylamide gels หรือ granular beads ที่มีพีเอชค่อย ๆ เปลี่ยนแปลงอย่างสม่ำเสมอที่เรียกว่า พีเอชเกรเดียนท์ (pH gradients) (Andrews, 1986)

โมเลกุลของโปรตีนจะเคลื่อนที่ผ่านพีเอชเกรเดียนท์โดยโปรตีนที่มีค่า Isoelectric point (pI, พีไอ) ต่ำกว่าพีเอชของตัวพยุง ณ บริเวณนั้นจะมีประจุของโมเลกุลเป็นลบ และเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก และในทางตรงกันข้ามโปรตีนที่มีค่าพีไอสูงกว่าพีเอชของตัวพยุงก็จะมีประจุของโมเลกุลเป็นบวกและเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบเช่นเดียวกัน ซึ่งประจุสุทธิและค่า mobility จะค่อยๆลดลงเมื่อโปรตีนเคลื่อนที่เข้าใกล้พีเอชที่เป็นค่าพีไอของโปรตีน และเมื่อโปรตีนเคลื่อนที่ถึงจุดที่พีเอชเท่ากับค่าพีไอของโปรตีนประจุของโปรตีนจะมีค่าเท่ากับศูนย์และโปรตีนจะหยุดการเคลื่อนที่ในที่สุด

การเกิดพีเอชเกรเดียนท์นั้นเป็นผลมาจากอิเล็กโตไลท์ขั้วลบ (cathode electrolyte หรือ catholyte) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเบสแตกตัวให้ไฮดรอกไซด์ไอออน (OH^-) เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) อิเล็กโตไลท์ขั้วบวก (anode electrolyte หรือ anolyte) ซึ่งที่คุณสมบัติเป็นกรดแตกตัวให้โปรตอน (H^+) เช่น กรดอะซิติก ($C_2H_4O_2$) หรือกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) เป็นต้น และสารแอมโฟไลต์ (ampholyte) ที่ใส่เข้าไป

แอมโฟไลต์ (ampholyte) เป็นพอลิเมอร์ขนาดเล็กที่มีคุณสมบัติเป็นสารที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบในโมเลกุล หรือที่เรียกว่าสารแอมโฟเทอริค (amphoteric substance) เช่นเดียวกันกับโปรตีนจะเป็นตัวช่วยทำให้เกิดพีเอชเกรเดียนท์ที่มีความเสถียรในสภาวะที่มีสนามไฟฟ้า โดยที่ช่วงค่าพีเอชจะเป็นเท่าใดนั้นขึ้นกับการใช้สารแอมโฟไลต์ เช่น แอมโฟไลต์ที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.5-10 2.5-4.0 และ 9.0-11.0 เป็นต้น และจะต้องเหมาะสมกับอิเล็กโตรไลต์ขั้วบวกและขั้วลบด้วย (สุพร นุชดำรงค์, ม.ป.ป.)



ภาพที่ 5 ทิศทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ถูกแยกโดยเทคนิค IEF (ที่มา: สุพร นุชดำรงค์, ม.ป.ป.)

Johnson and Alhadeff (1991) ได้ทำการศึกษาและรายงานไว้ว่าความแตกต่างของลักษณะและจำนวนไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมไม่ได้มีสาเหตุจากการเกิดกระบวนการตัดแต่ง mRNA ที่แตกต่างกัน (alternative splicing) แต่เนื่องมาจากมีกระบวนการดัดแปลงโมเลกุลของโปรตีนหลังการแปลรหัส (posttranslational modification) โดยการเติมโมเลกุล

ของคาร์โบไฮเดรตหรือที่เรียกว่า ไกลโคซิลเลชัน (glycosylation) ซึ่งจะมีการเติมสารประกอบพวกเซียโลไกลโคโปรตีน (sialoglycoprotein) และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) โดยเฉพาะกรดเซียลิกลงบนโมเลกุล นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความแตกต่างของชนิดสิ่งมีชีวิต และชนิดของเนื้อเยื่ออีกด้วย

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางโครงสร้างของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมบางชนิด

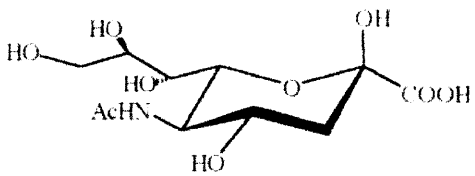
α-L-fucosidase source	**Number of isoforms**	**Presence and/or type of carbohydrate**	**Investigator(s)**
Human liver	8	Yes	Alhadeff *et al.* (1975)
	4-5	Man, Glc, Gal	Kress *et al.* (1980)
	-	GlcNAc, NANA	Alhadeff and Freeze (1977)
Human brain	-	*N*-glycans	Shoarinejad *et al.* (1994)
	>5	*N*-glycans	Johnson *et al.* (1992)
	7	-	Alhadeff and Janowsky (1977)
Human serum	6	-	Hopfer *et al.* (1990)
	7	NANA	Alhadeff and Janowsky (1978)
	7	-	DiCioccio *et al.* (1982)
Human placenta	4	-	DiMatteo *et al.* (1976)
	5	Man, GlcNAc, Gal, NANA	Turner (1979)
Human spleen	-	Man, GlcNAc, NANA	Chien and Dawson (1980)
Monkey brain	6	-	Alam and Balassubra-manian (1979)
Porcine thyroid	10	NANA	Grove and Serif (1981)
Rat epididymis	1	Yes	Carlsen and Pieree (1972)
	6	-	Leray *et al.* (1988)

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางโครงสร้างของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมบางชนิด(ต่อ)

α-L-fucosidase source	**Number of isoforms**	**Presence and/or type of carbohydrate**	**Investigator(s)**
Rat sperm	- 2	N-glycans -	Hancock *et al.* (1993) Aviles *et al.* (1996)
Rat liver	Multiple	Man, Gal, GlcNAc, Glc, NANA, Fuc	Opheim and Touster (1977)
Mouse liver	Multiple 7	- *N*-glycans	Laury-Klientop *et al.* (1987) Shoarinejad *et al.* (1993)
Hamster liver	6-8	-	Shoarinejad and Alhadeff (1993)

ที่มา: Alhadeff (1998)

กรดเซียลิก (Sialic acid) หรือ เอ็น-อะซิทิลนิวรามินิค แอซิด (N-acetylneuraminic acid, NeuAc) เป็นสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบคาร์บอน 9 อะตอม (แสดงดังภาพที่ 8)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของกรดเซียลิก (ที่มา: Reutter *et al.*,1997)

กรดเซียลิกพบได้ในยูคาริโอตชั้นสูงทั่วไปและในโปรคาริโอตบางชนิดโดยเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในโมเลกุลของไกลโคโปรตีนชนิดต่าง ๆ บทบาทที่สำคัญของกรดเซียลิกมีดังต่อไปนี้

1. มีผลต่อความสามารถในการเกาะ (adhesion) กัน การรวมกลุ่ม (aggregation) และการจับกันเป็นก้อน (agglutination) ของเซลล์ รวมทั้งทำหน้าที่เป็นรีเซปเตอร์ด้วย

2. มีอิทธิพลต่อการเกิดโครงสร้าง (conformation) ประจุ (charge) ความสามารถของการละลาย (solubility) และความหนืด (viscosity) ของไกลโคโปรตีนชนิดต่างๆ

3. ทำหน้าที่ในการป้องกันการถูกทำลายของ ไกลโคโปรตีน และเซลล์

4. มีผลต่อความประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Reutter *et al.*, 1997)

5. การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์

การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์มีบทบาทสำคัญในการศึกษาองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิตและการใช้สารบริสุทธิ์ให้เป็นประโยชน์ ก่อนที่จะหาองค์ประกอบของโปรตีนต้องแน่ใจว่าโปรตีนนั้นบริสุทธิ์เพื่อศึกษาโปรตีนเพียงชนิดเดียวเท่านั้น การศึกษาธรรมชาติการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จึงต้องทำสารให้บริสุทธิ์ (ประดิษฐ์ มีสุข, 2547) สารละลายโปรตีนอยู่ในรูปอิเล็กโทรไลท์ ดังนั้นการแยกโปรตีนออกจากสารละลายจึงอาศัยสมบัติการเปลี่ยนอิเล็กโทรไลท์ซึ่งทำได้ดังนี้

5.1 การแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างในการละลายได้ในสารละลาย โปรตีนแต่ละชนิดจะละลายได้ในสารละลายต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพีเอช ความแรงของไอออน และความเข้มข้นของ non-polar substance

5.2 โดยอาศัยความแตกต่างกันในทางประจุ เนื่องจากโปรตีนแต่ละชนิดมีจำนวนประจุต่างกัน ดังนั้นที่พีเอชหนึ่ง ๆ โปรตีนจึงมีผลรวมของประจุต่างกัน และเมื่อนำไปวิ่งในสนามไฟฟ้าการเคลื่อนที่ได้เร็วไม่เท่ากันจะทำให้สามารถแยกโปรตีนออกจากกันได้

5.3 โดยอาศัยขนาดของโมเลกุล

5.3.1 ไดอะไลซิส (Dialysis) เป็นวิธีการแยกสารที่มีขนาดแตกต่างกันออกจากกันโดยอาศัยหลักการสารขนาดเล็กสามารถแพร่ผ่าน semipermeable membrane สารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถผ่านได้ เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการแยกสารละลายเกลือแร่และ อิเล็กโทรไลท์ออกจากสารโมเลกุลชีวภาพขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิกและคาร์โบไฮเดรต

5.3.2 Ultrafiltration เป็นการแยกโปรตีนก้อนกลมโดยผ่าน semipermeable membrane โดยใช้ความดันหรือการปั่นเหวี่ยงร่วมด้วย

5.3.3 Density-Gradient centrifugation เป็นการแยกโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่างกันออกจากกันโดยใช้สารละลายซูโครสที่มีความเข้มข้นต่างกัน และทำให้ความเข้มข้นที่ก้นหลอดเป็นความเข้มข้นสูงที่สุด ยกตัวอย่างเช่น เริ่มจากความเข้มข้นร้อยละ 60 จนถึงร้อยละ 20 จากนั้นค่อย ๆ ต่ำลง ๆ ตามลำดับ ทำให้สามารถแยกโปรตีนออกจากกันได้

5.4 การแยกโปรตีนโดยใช้สารที่มีสมบัติในการดูดซับได้จำเพาะ โดยโปรตีนสามารถดูดซับได้ทั้ง non-polar substance เช่น ถ่าน (charcoal) และ polar substance เช่น พวกซิลิกา

และเจล ถ้าเป็นสารพวก non-polar substance เชื่อว่าแรงที่ใช้กันกับโปรตีนนั้นเป็นวันเดอร์วาลล์ และแรงระหว่างหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ส่วนสารพวก polar substance ใช้แรงระหว่างไอออน (ionic interaction) และหรือพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond)

6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป และ ประสิทธิ์ โพธิปักษ์ (2518) ได้ศึกษาการรีดและคุณภาพน้ำเชื้ออสุจิกระบือปลักไทยเพื่อการผสมเทียม โดยทำการเก็บตัวอย่าง 11 ครั้ง จากพ่อพันธุ์กระบือปลักไทยจำนวน 4 ตัว ในจังหวัดนครนายก และสุรินทร์ พบว่าลักษณะของน้ำเชื้อจะมีลักษณะข้น มีสีขาวครีม ปริมาตรประมาณ 0.7 – 2.5 มิลลิลิตร มีพีเอชเท่ากับ 7 อสุจิมีความเข้มข้น 320 – 1225 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอสุจิมีชีวิตประมาณ 98.1 – 99.9% ปาริฉัตร สุขโต และคณะ (2527) ทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเชื้อพ่อกระบือปลัก โดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์กระบือปลัก 4 ตัว ในช่วงเวลา 1 ปี ตั้งแต่ 1 มกราคม 2524 ถึง 31 ธันวาคม 2524 เฉลี่ยรีดเก็บน้ำเชื้อแต่ละตัว 1 – 2 สัปดาห์ต่อครั้ง รวม 172 ครั้ง เพื่อศึกษาอิทธิพลของสภาพภูมิอากาศในแต่ละฤดูกาลว่าที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ โดยพบว่าสภาพภูมิอากาศแต่ละฤดูกาลไม่มีอิทธิพลต่อปริมาตรและความเข้มข้นของน้ำเชื้อพ่อกระบือปลัก โดยในช่วงที่มีอากาศเย็นอุณหภูมิค่อนข้างต่ำคุณภาพน้ำเชื้อจะดีกว่าช่วงอากาศร้อน ค่าเฉลี่ยของคุณภาพน้ำเชื้อ มีปริมาตร 2.44 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 1184.5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร อสุจิที่มีชีวิต 81.31% ปรีชา ลาภมาก (2545) ตรวจหาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนอสุจิวัวด้วยวิธี Imunoperoxidase และวิธี Immunofluorescence พบว่ามีแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมากที่บริเวณส่วนท้ายอะโครโซม middle piece และส่วนหางตอนต้น สิทธิศักดิ์ ทองรอง (2545) ตรวจหาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิหอยขม *Filopaludina martensi* ด้วยวิธี Immunofluorescence และวิธี Immunoperoxidase พบกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิหอยขมทั่วทั้งเซลล์ วุฒิไกร นิ่มละมูล (2546) ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำเชื้อวัว (*Bos indicus*) ด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western analysis พบว่ามีแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสทั้งในพลาสมาของน้ำอสุจิและเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ โดยมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันคือประมาณ 54 kDa อรทัย รอดสวัสดิ์ (2547) ศึกษารูปแบบไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำเชื้อของวัวด้วยเทคนิค Isoelectric focusing พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของวัวมีจำนวนไอโซฟอร์มประมาณ 6-12 ไอโซฟอร์ม ในช่วงค่าพีไอ 6.7-8.1 และไอโซฟอร์มที่มีพีคสูงสุดที่ค่าพีไอ 7.58 ส่วนแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิมีจำนวนไอโซฟอร์มประมาณ 5-10 ไอโซฟอร์ม ในช่วงค่าพีไอ 5.3-7.6 และไอโซฟอร์มที่มีพีคสูงสุดอยู่ที่พีไอ 7.55 พรรณี วงษ์สงคราม (2548) ศึกษารูปแบบไอโซฟอร์มของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดส

ในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก (*Bubalus bubalis* L.) ด้วยเทคนิค Isoelectric focusing พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลักมีจำนวนไอโซฟอร์มทั้งหมด 12 ไอโซฟอร์ม ในช่วงค่าพีไอ 6.48-9.32 และไอโซฟอร์มที่มีพีคสูงสุดอยู่ที่ค่าพีไอ 7.49 สราวุธ แก้วศรี (2548) ตรวจหาตำแหน่งของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากส่วนอิพิดิมิสของวัว (Bovine epididymis sperm α-L-fucosidase) ด้วยวิธี Immunoperoxidase โดยใช้แอนติบอดีปฐมภูมิที่สร้างในแพะจากการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่สกัดจากตับมนุษย์ (goat anti human liver α-L-fucosidase antibody) และแอนติบอดีทุติยภูมิที่สร้างในกระต่ายซึ่งที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส [(rabbit anti goat horseradish peroxidase conjugated (HRP)] ทำการตรวจหาสัญญาณสีน้ำตาลอิฐที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับซับสเตรท 3, 3 diaminobenzidine (DAB) พบว่ามีแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมากบริเวณส่วนท้ายของหัว (posterior head region) ส่วนอิเควทอเรียล (equatorial segment) และส่วนหาง (tail) สิทธิศักดิ์ จันทรัตน์ (2547) ตรวจหาแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสเบื้องต้นในน้ำเชื้อของ กระบือปลักด้วยวิธี Dot blot และหาสภาวะที่เหมาะสมของแอนติบอดีและซับสเตรทด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western analysis พบว่าเกิดแถบโปรตีนของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสทั้งในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและพลาสมาของน้ำอสุจิที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 61 kDa ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของแอนติบอดีปฐมภูมิและแอนติบอดีทุติยภูมิ คือ อัตราส่วนเจือจาง 1: 50,000 และ 1:250,000 ตามลำดับ โดยใช้น้ำยา advance enhancechemiluminescence (advance ECL) เป็นซับสเตรท หลังจากนั้นสิทธิศักดิ์ จันทรัตน์ (2548) ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำเชื้อของกระบือปลักพบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในผนังเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของกระบือปลักและพลาสมาของน้ำอสุจิสามารถทำงานได้ดีที่พีเอชค่อนข้างกว้าง คือ ตั้งแต่พีเอช 3-6 โดยพีเอชที่เหมาะสมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในผนังเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของกระบือปลัก คือ พีเอช 6.36 และในพลาสมาของน้ำอสุจิของกระบือปลัก คือ พีเอช 6.37 อภิพร สุวรรณไตรย์ (2548) ศึกษาสัณฐานวิทยาของอสุจิและแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในหอยขมพบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจากเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิและเนื้อเยื่อแผ่นเท้ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56 kDa นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องโดยชาวต่างชาติซึ่งได้แก่ Jauhiainen and Vanha – Perttula (1986) ทำการศึกษากิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในอวัยวะระบบสืบพันธุ์รวมไปถึงในพลาสมาของน้ำอสุจิของวัวพบว่ากิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมีความจำเพาะสูงสุดพบในอิพิดิไดมิส และพบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเนื้อเยื่อของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ส่วนใหญ่มี 2 รูปแบบ แต่พบว่าในพลาสมาของน้ำอสุจิ เซลล์อสุจิ และอิพิดิไดมิสส่วน cauda พบเฉพาะรูปแบบ ที่ 1 เท่านั้น หลังจากนั้น Kretz *et al.* (1992) ศึกษายีนที่ควบคุมการสร้างแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสพบว่ากระบวนการสร้าง

แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในมนุษย์ถูกควบคุมโดยยีนที่มีตำแหน่งอยู่แขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 1 (1p34.1-1p36.1) มีลักษณะเป็นยีนเดี่ยว นอกจากนี้พบว่ายังมีซูโดยีนอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 ที่มีลำดับเบสเหมือนกับยีนฟูโคซิเดส ถึงร้อยละ80 แต่ไม่มีส่วนที่อ่านรหัสได้ ผลของการขาดเอนไซม์ทำให้เกิดโรคฟูโคซิโดซีสซึ่งเป็นโรคทางพันธุกรรมที่หายากทำให้มีการสะสมน้ำตาลฟูโคสซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารชีวโมเลกุล ต่อมา Clark *et al.* (1995) พบว่าการจับกันของโซนาเพลลูซิดาและอสุจิเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญที่ทำให้เกิดการปฏิสนธิในหนูถีบจักร โดยโซนาเพลลูซิดาโปรตีน 3 (ZP3) มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวรับ (receptor) ของอสุจิ และชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอคชั่น (acrosome reaction) โดยสามารถนำการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างอสุจิและโซนาเพลลูซิดามาทำนายการเป็นหมันของผู้หญิงเพราะไข่ผิดปกติได้ โดยการใช้ specific anti-ZP3 antiserum สามารถระบุโครงสร้างที่ผิดปกติของ protein backbone ของ ZP3 ได้ทำให้ทราบได้ว่าไข่มีความผิดปกติ Daulat *et al.* (1998) พบว่าปฏิสัมพันธ์ระหว่างไข่และอสุจิเป็นแบบจำเพาะซึ่งเริ่มต้นโดยการจับกันของ complementray molecules ซึ่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ (receptor) และที่โซนาเพลลูซิดา (ligand) แล้วชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอคชันโดยมีการปลดปล่อย glycohydrolase และ protease เพื่อย่อยโซนาเพลลูซิดาที่ห่อหุ้มไข่ Suarez *et al.* (1998) ศึกษากระบวนการเคลื่อนที่ของอสุจิของวัวผ่านท่อนำไข่พบว่าขณะอสุจิเคลื่อนที่ผ่านท่อนำไข่อสุจิจะถูกจับชั่วคราวด้วยผนังด้านในของท่อนำไข่จนกระทั่งไข่ของเพศเมียสุกเต็มที่และเกิดการตกไข่อสุจิจึงจะถูกปล่อยให้เคลื่อนที่เข้าไปผสมกับไข่ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ป้องกันการปฏิสนธิด้วยอสุจิหลายตัว กลไกที่สำคัญในกระบวนการจับกันของอสุจิกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่อาศัยการจดจำน้ำตาลบนอิพิธีเลียมคล้ายเลคติน (lectin – like epithelium) การจับกันของอสุจิจะถูกยับยั้งโดยฟูคอยดินซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลฟูโคสซัลเฟตหรือน้ำตาลฟูโคส เมื่อให้แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสจับที่บริเวณอิพิธีเลียมจะสามารถป้องกันการจับกันกับอิพิธีเลียมของอสุจิได้แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลฟูโคสเกี่ยวข้องกับการจับกันของอสุจิกับอิพิธีเลียมเนื่องจากที่บริเวณอิพิธีเลียมมีไกลโคโปรตีนหรือไกลโคลิพิดเกาะอยู่และตำแหน่งการจับของอสุจิจะอยู่ที่บริเวณอะโครโซมซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงการจับเมื่อเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มอสุจิ (capacitation) และอะโครโซมรีแอ็กชัน (acrosome reaction) ก่อนเกิดกระบวนการปฏิสนธิ จากรายงานของ Veeramachaneni *et al.* (1998) พบว่าสุนัขที่ขาดกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสมีอาการป่วยเป็นโรคฟูโคซิโดซีสโดยพบว่าจะมีปริมาณอสุจิลดลง เกิดความผิดปกติบริเวณอะโครโซมของอสุจิ เซลล์อสุจิไม่สามารถพัฒนาจนเป็น mature spermatozoa และพบว่าในพลาสมาของน้ำอสุจิสุนัขที่มีเซลล์อสุจิจำนวนประมาณ 72.6 ล้านตัว มีเพียง 3-5 % เท่านั้นที่อสุจิสามารถเคลื่อนที่ได้ Alhadeff *et al.* (1999) ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในน้ำเชื้อของมนุษย์ด้วยวิธี Immunocytochemical พบแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ

บริเวณส่วนท้ายของอะโครโซม เมื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิและเซลล์อสุจิพบว่า กิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่พบในพลาสมาของน้ำอสุจิมีกิจกรรมมากกว่าที่พบในเซลล์อสุจิ โดยแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิสามารถทำงานได้ดีที่พีเอชค่อนข้างกว้าง คือมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.8 – 7.0 ในขณะที่แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเซลล์อสุจิสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่ค่อนข้างแคบกว่า คือประมาณ 3.4 – 4.0 การศึกษาด้วยวิธี Isoelectric focusing พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิมีจำนวนไอโซฟอร์ม 3 – 6 ไอโซฟอร์ม ในช่วงค่าพีไอ 5 – 7 ในขณะที่แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเซลล์อสุจิพบเพียง 2 ไอโซฟอร์ม ในช่วงค่าพีไอ 5.2 – 7.0 และการศึกษาด้วยวิธี Western analysis พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56 kDa ในขณะที่แอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเซลล์อสุจิมีขนาดประมาณ 51 kDa ต่อมาในรายงานการวิจัยของ Matsumoto *et al.* (2002) ที่ศึกษาบทบาทของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่มีต่อกระบวนการจับกันของอสุจิและไข่ในสัตว์พวกเพรียงหัวหอม (ascidian) (*Halocynthia roretzi*) (HrFuc'ase) พบว่าในกระบวนการจับกันและการเชื่อมกันของเซลล์สืบพันธุ์จะอาศัยการจดจำคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มอสุจิ เช่น เลคติน (lectin) ไกลโคซิลทรานสเฟอร์เรส (glycosyltransferase) และไกลโคไซด์ (glycosides) รีเซปเตอร์จะมีความจำเพาะกับไกลโคโปรตีนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของไข่ รีเซปเตอร์เป็นส่วนที่กำหนดความจำเพาะของการจับกันได้ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ โดยในเพรียงหัวหอมพวก *Ciona intestinalis* พบว่าไกลโคโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์ไข่สามารถจับกับอสุจิใน *Halocynthia roretzi* พบว่าน้ำตาลแอลฟา-แอล-ฟูโคซิล (α-L-fucosyl) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการจับกันของเซลล์สืบพันธุ์ โดยน้ำตาลแอลฟา-แอล-ฟูโคซิลที่ต่ออยู่บริเวณปลายของสายไกลโคโปรตีนมีความสำคัญต่อการเป็น sperm receptor และพบว่ากระบวนการนี้จะถูกยับยั้งได้หากใส่ซับสเตรทที่เป็นฟูโคซิเดสสังเคราะห์ (synthetic fucosidase substrate) เช่น p-Nitrophenyl หรือ 4-Methylumbelliferyl เป็นต้น ส่วนใน *Phallucia mammilata* และ ascidian อื่น ๆ พบว่า N-acetyl-glucosamine มีหน้าที่เป็นรีเซปเตอร์เหมือนกัน กิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสใน *Ciona intestinalis* และ *Halocynthia roretzi* จะสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เหมาะสมประมาณ 4 โดยเอนไซม์จะมีการรวมตัวกับซับสเตรทกลายเป็นสารประกอบคอมเพล็กเหมือนเลคติน การวิเคราะห์หาลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ HrFuc'ase โดยใช้ cDNA ที่แยกจากเซลล์อัณฑะของ *Halocynthia roretzi* พบว่ามีลำดับของกรดอะมิโนที่มีความเหมือน (homology) กับแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสของมนุษย์ หนู และ *Dictiosterium* 57' ถึงร้อยละ 47.7, 47.4 และ 37.6 ตามลำดับ หลังจากนั้นมีรายงานการวิจัยโดย Khunsook *et al.* (2002) ที่พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของมนุษย์เป็นโปรตีนที่พาดผ่านเยื่อหุ้มอสุจิ

เพียงครั้งเดียว (single pass transmembrane protein) พบอยู่บริเวณส่วนท้ายของหัวอสุจิ โดยในการวิจัยดังกล่าวสามารถสกัดเอนไซม์ออกจากเยื่อหุ้มอสุจิและทำให้มีความบริสุทธิ์ได้ถึง 8,600 เท่า และจากการศึกษาลักษณะเฉพาะด้วยวิธี Isoelectric focusing พบไอโซฟอร์มที่เด่นชัดจำนวน 2 ไอโซฟอร์มและในพลาสมาของน้ำอสุจิมีประมาณ 3-6 ไอโซฟอร์ม ผลจากการศึกษาด้วยวิธี Western analysis พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีน้ำหนักโมเลกุล 51 kDa และในพลาสมาของน้ำอสุจิมีน้ำหนักโมเลกุล 56 kDa เมื่อทดสอบทางจลนพลศาสตร์ (kinetics) พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีพีเอชที่เหมาะสมในสภาวะเป็นกลางในช่วงพีเอช 6.8–7.3 มีค่า Michaelis-Menten constant (K_m) เท่ากับ 0.08 mM และค่า Maximum velocity (V_{max}) เท่ากับ 6.8 μmol/min/mg protein ส่วนในพลาสมาของน้ำอสุจิมีพีเอชที่เหมาะสมในสภาวะเป็นกลางในช่วงพีเอช 4.0–4.5 มีค่า Michaelis-Menten constant (K_m) เท่ากับ 0.06 mM และมีค่า Maximum velocity (V_{max}) เท่ากับ 92 μmol/min/mg protein การศึกษาด้วยวิธี Lectin blotting พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสบนเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีน้ำตาลแมนโนส (mannose) เป็นองค์ประกอบทำให้มีคุณสมบัติเป็นกลางซึ่งแตกต่างจากแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในพลาสมาของน้ำอสุจิที่มีกรดเซียลิกเป็นองค์ประกอบจึงมีคุณสมบัติเป็นกรดและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56-57 kDa ล่าสุดมีรายงานการวิจัยโดย Chao *et al.* (2006) ที่ศึกษาลักษณะเฉพาะของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเนื้อเยื่อมะเร็งตับระยะเริ่มแรกซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ถึง 74 เท่า พบว่ามีกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเนื้อเยื่อมะเร็งตับแต่ไม่พบกิจกรรมของแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเนื้อเยื่อใกล้เคียง ผลจากการศึกษาด้วยวิธี SDS- PAGE และ Western analysis พบว่าแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสในเนื้อเยื่อมะเร็งตับระยะเริ่มแรกมีน้ำหนักโมเลกุล 55 kDa ซึ่งแตกต่างจากแอลฟา-แอล-ฟูโคซิเดสที่พบในอวัยวะอื่น ๆ ของมนุษย์