

## SỰ PHÂN BỐ VÀ ĐIỀU KIỆN XÚC TÁC CỦA $\beta$ -1,3-GLUCANASE Ở ĐỘNG VẬT KHÔNG XƯƠNG SỐNG BIỂN VIỆT NAM

Huỳnh Hoàng Như Khánh<sup>1,\*</sup>, Cao Thị Thúy Hằng<sup>1</sup>, Phạm Đức Thịnh<sup>1</sup>,  
Bùi Minh Lý<sup>1</sup>, Lê Quang Huân<sup>2</sup>, Ngô Thị Duy Ngọc<sup>1</sup>, Phan Thị Hoài Trinh<sup>1</sup>,  
Võ Thị Diệu Trang<sup>1</sup>, Lê Thị Hoa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu và ứng dụng công nghệ Nha Trang, Viện Hàn lâm KHCNVN,  
2 Hùng Vương, Nha Trang, Khánh Hòa

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Hà Nội

\*Email: hhnkhanh@gmail.com

Đến Tòa soạn: 28/3/2014; Chấp nhận đăng: 11/3/2015

### TÓM TẮT

41 mẫu động vật không xương sống biển Việt Nam thuộc nhóm động vật da gai (echinoderms), nhóm hai mảnh vỏ (bivalves) và nhóm chân bụng (gastropods) đã được khảo sát khả năng thủy phân laminaran. Mẫu vật sau khi thu được định danh và giữ ở 4 °C trong quá trình vận chuyển về phòng thí nghiệm. Gan tụy, sợi thủy tinh thể, màng ruột hoặc trứng của chúng được tách ra, đồng nhất trong dung dịch đệm, ly tâm thu dịch chiết thô. Dịch chiết thô sau đó được tiến hành sắc kí trên cột Sephadex G-25 để loại muối và khảo sát hoạt tính enzym. Kết quả nghiên cứu cho thấy  $\beta$ -1,3-glucanase phân bố rộng rãi ở các mẫu khảo sát. Điều kiện xúc tác phản ứng thủy phân của enzym cũng đã được khảo sát ở năm loài có hoạt tính thủy phân cao đối với laminaran là *Conus quercinus*, *Haliotis ovina*, *Perna viridis*, *Tapes literata* và *Turbo chrysotomus*. Các enzym được khảo sát thể hiện pH và nhiệt độ tối ưu khác nhau nhưng phần lớn đều hoạt động tốt ở giới hạn pH 4 - 7 và ở 30 - 40 °C, thời gian thủy phân cũng khác nhau dao động từ 10 - 30 phút.

*Từ khóa:*  $\beta$ -1,3-glucanase, *Conus quercinus*, *Haliotis ovina*, *Perna viridis*, *Tapes literata*, *Turbo chrysotomus*.

### 1. MỞ ĐẦU

$\beta$ -1,3-glucanase (laminaranase) thuộc nhóm O-glycosyl hydrolase, một enzym quan trọng trong quá trình chuyển hóa carbohydrate.  $\beta$ -1,3-glucanase thủy phân liên kết O-glycoside trong các  $\beta$ -1,3-glucan. Enzym này phân bố rộng rãi trong nhiều nhóm sinh vật khác nhau từ nhân sơ đến nhân thật và có liên quan đến nhiều quá trình sinh lý học. Đặc biệt,  $\beta$ -1,3-glucanase còn tham gia vào quá trình phân hủy các polysaccharide.  $\beta$ -1,3-glucanase đóng vai trò quan trọng trong quá trình chuyển hóa thức ăn ở động vật không xương sống biển, chúng được tìm thấy là nguồn cung cấp đa dạng các loại O-glycosyl hydrolase [0]. Năm 2010, chúng tôi đã nghiên cứu sàng lọc hoạt tính O-glycosyl hydrolase của hơn 80 mẫu động vật không xương sống biển Việt

Nam [3]. Một số mẫu trong chúng đã được nghiên cứu tách chiết, tinh sạch và khảo sát đặc tính của enzym thủy phân các polysaccharide như fucoidan, laminaran, polymanuronic acid ... Trong đó,  $\beta$ -1,3-glucanase đã được tinh sạch từ sọt thủy tinh thể của Vẹm xanh *Perna viridis* [1]; enzym thủy phân polymanuronic acid từ gan tụy Ốc bần tay quèo *Lambis* sp. cũng đã được tinh sạch [3]. Các enzym này cũng đã được nghiên cứu đặc tính xúc tác và đặc tính phân tử.

Adachi M. [4] và Albertus J. S. [5] cho rằng hợp chất có hoạt tính sinh học có nguồn gốc từ sinh vật biển đã và đang được tập trung nghiên cứu ngày càng nhiều trong những năm gần đây. Hầu hết các nghiên cứu cho thấy một số polysaccharide từ rong biển như fucoidan, laminaran, alginic acid, polymanuronic acid... có nhiều hoạt tính sinh học như kháng viêm nhiễm, kháng virus, chống đông tụ, kháng u, giải độc, giảm đau... và đã được áp dụng trong các lĩnh vực như y học, dược học, công nghệ thực phẩm.

Cho đến nay, các kết quả nghiên cứu cho thấy cơ chế hoạt động của  $\beta$ -1,3-glucanase thường để cắt liên kết glycoside và tạo thành các oligosaccharide có giá trị về mặt trị liệu. Vì vậy, việc sàng lọc, tìm kiếm, tinh sạch và khảo sát đặc điểm của các enzym có khả năng phân cắt các polysaccharide từ rong biển thành các oligosaccharide, trên cơ sở đó tiếp tục tiến hành nghiên cứu điều chế oligosaccharide có hoạt tính sinh học từ rong biển, phục vụ cho đời sống con người là một hướng nghiên cứu thiết yếu cho khoa học và có giá trị thực tiễn.

Mục tiêu của nghiên cứu này là sàng lọc  $\beta$ -1,3-glucanase từ động vật không xương sống biển Việt Nam và khảo sát một số điều kiện xúc tác của enzym này từ 5 đối tượng có hoạt tính cao là Ốc đụn *Conus quercinus*, Ốc Bào ngư *Haliotis ovina*, Vẹm xanh *Perna viridis*, Nghêu mía *Tapes literata* và Ốc mặt trăng *Turbo chrysolomus*.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Động vật không xương sống biển được thu tại vùng biển Bãi Tiên, Nha Trang vào 2 đợt là tháng 5/2012 và 5/2013, mang về phòng thí nghiệm, sau đó phẫu thuật thu nhận bộ phận gan tụy, sọt thủy tinh thể, màng ruột hoặc trứng để tách chiết enzym.

### 2.2. Hóa chất

Succinic acid, NaOH (Sigma, Mỹ), nhựa Sephadex G-25 (Sigma, Mỹ), thuốc thử Nelson A, B, C (chuẩn bị theo phương pháp Nelson-Somogyi, 1952), glucose (Sigma, Mỹ). Cơ chất laminaran chiết từ rong *Laminaria cichorioides* theo quy trình đã được Zvyagintseva TN *et al.* (1999) công bố [6].

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Tách chiết và thu dịch enzym

Các bước tách chiết và thu nhận dịch chiết enzym được tiến hành ở 4 °C. Gan tụy, sọt thủy tinh thể, màng ruột hoặc trứng của các mẫu nghiên cứu được đông lạnh trong dung dịch đệm succinate natri 0,025 M (pH 5,2) theo tỉ lệ 1 : 3 (m/V). Dịch mẫu sau đó được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 20 phút. Thu hồi phần dịch nổi và tiến hành sắc kí trên cột Sephadex G-25, thu các phân đoạn có hoạt tính và sử dụng chúng để nghiên cứu các điều kiện xúc tác của enzym.

#### 2.3.2. Thủ hoạt tính thủy phân laminaran bằng phương pháp Nelson-Somogyi, 1952 [7]

Hỗn hợp sau phản ứng thủy phân gồm 50  $\mu$ l enzym và 200  $\mu$ l dung dịch laminaran 2 mg/ml (pha trong dung dịch đệm succinate natri 0,025 M (pH 5,2)) được bổ xung 250  $\mu$ l thuốc thử Nelson A-B, đun cách thủy trong 10 phút để dừng phản ứng, bổ xung 250  $\mu$ l thuốc thử Nelson C, lắc đều và bổ xung 2,5 ml H<sub>2</sub>O trước khi xác định độ hấp phụ quang phổ tại bước sóng 660 nm trên máy hấp phụ quang phổ UV/VIS 6405 Jenway (Nhật). Hoạt tính thủy phân polysaccharide được xác định bằng sự tăng lượng đường khử theo phương pháp Nelson-Somogyi, 1952 với glucose được sử dụng làm đường chuẩn. Một đơn vị hoạt độ enzym là lượng enzym cần để chuyển hóa cơ chất tạo thành 1  $\mu$ mol glucose trong 1 phút ở các điều kiện chuẩn.

### 2.3.3. Xác định protein bằng phương pháp Bradford, 1976 [8]

Hỗn hợp phản ứng gồm 20  $\mu$ l enzym và 100  $\mu$ l thuốc thử Bradford được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Sau đó xác định độ hấp phụ quang phổ tại bước sóng 595 nm trên máy hấp phụ quang phổ Cevil CE-1021 (Nhật).

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Sàng lọc khả năng thủy phân laminaran ở động vật không xương sống biển Việt Nam

Việc nghiên cứu sàng lọc hoạt tính thủy phân các polysaccharide rong biển từ các đối tượng sinh vật biển đã được tiến hành tại Viện Nghiên cứu và ứng dụng công nghệ Nha Trang từ năm 2007 đến nay và đã công bố kết quả sàng lọc enzym thủy phân fucoidan từ 45 mẫu vật động vật thân mềm biển thu thập tại một số địa phận của tỉnh Khánh Hòa [9]. Trong kết quả nghiên cứu này, chúng tôi đã sàng lọc hoạt tính enzym  $\beta$ -1,3-glucanase trên 41 mẫu động vật không xương sống biển Việt Nam thuộc các nhóm động vật da gai, nhóm hai mảnh vỏ và nhóm chân bụng, kết quả được thể hiện trên Bảng 1.

*Bảng 1.* Sàng lọc hoạt tính  $\beta$ -1,3-glucanase ở động vật không xương sống biển Việt Nam.

Ngành, lớp, họ	Loài	Cơ quan	Hoạt tính (U/mg)
<b>MOLLUSCA</b>	<i>Chicoreus asianus</i>	GT	0,06
<b>GASTROPODA</b>	<i>Chicoreus brunneus</i>	GT	0
<b>Muricidae</b>	<i>Haustellum haustellum</i>	GT	0,28
<b>Strombidae</b>	<i>Lambis chiragra</i>	GT	0,23
	<i>Lambis lambis</i>	GT	0,05
	<i>Lambis scorpius</i>	GT	0,60
	<i>Strombus aratum</i>	GT	0,19
	<i>Strombus lentiginosus</i>	GT	0,05
	<i>Strombus luhuanus</i>	GT	0,18
<b>Fascioliariidae</b>	<i>Pleuroploca trapezium</i>	GT	0,04
	<i>Rapana rapiformis</i>	GT	0,18

<b>Trochidae</b>	<i>Tectus conus</i>	GT	0,33
	<i>Tectus pyramics</i>	GT	0
<b>Turbinidae</b>	<i>Turbo chrysotomus</i>	GT	0,57
<b>Conidae</b>	<i>Conus betulinus</i>	GT	0
	<i>Conus striatus</i>	GT	0
	<i>Conus quercinus</i>	GT	0,65
	<i>Conus textile</i>	GT	0
	<i>Conus vexillum</i>	GT	0
<b>Ranellidae</b>	<i>Cymatium pyrum</i>	GT	0,38
<b>Ficidae</b>	<i>Ficus gracilis</i>	GT	0,11
<b>Haliotidae</b>	<i>Haliotis ovina</i>	GT	0,71
	<i>Haliotis asinina</i>	GT	0,03
<b>Ovulidae</b>	<i>Orula ovum</i>	GT	0,31
<b>Cassidae</b>	<i>Phalium glaucum</i>	GT	0,16
<b>Terebridae</b>	<i>Terebra maculata</i>	GT	0,24
<b>Bursidae</b>	<i>Tutufa hubo</i>	GT	0,10
	<i>Tutufa rubeta</i>	GT	0
<b>Cyclophoriidae</b>	<i>Serpulorbis sp</i>	GT	0,12
<b>Surpulimorphiidae</b>	<i>Serpularia sp.</i>	GT	0,22
<b>BIVALVIA</b>			
<b>Mytilidae</b>	<i>Perna viridis</i>	TT	0,63
<b>Pteriidae</b>	<i>Pinctada margaritifera</i>	GT	0,09
<b>Veneridae</b>	<i>Tapes literata</i>	TT	0,75
<b>Pinnidae</b>	<i>Pina bicolor</i>	TT	0,22
	<i>Atrina vexillum</i>	TT	0
<b>ECHINODERMATA</b>	<i>Diadema setosum</i>	MR	0,67
<b>Diadematiidae</b>	<i>Diadema setosum</i>	TR	0,09
	<i>Diadema sp.</i>	MR	0,14
<b>Taxopneustidae</b>	<i>Trypneuster gratila</i>	MR	0,38
	<i>Trypneuster gratila</i>	TR	0,26

Ghi chú: GT: gan tụy; TT: thủy tinh thể; MR: màng ruột; TR: trứng

Kết quả nghiên cứu cho thấy  $\beta$ -1,3-glycanase phân bố rộng rãi trong các mẫu động vật không xương sống biển Việt Nam. 62,5% số mẫu được khảo sát có hoạt tính của  $\beta$ -1,3-glycanase (Hình 1).



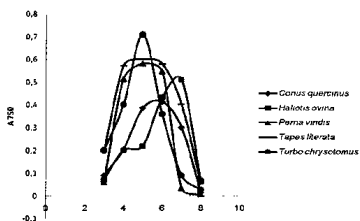
Hình 1. Tỷ lệ số mẫu có hoạt tính  $\beta$ -1,3-glucanase và không có hoạt tính  $\beta$ -1,3-glucanase.

### 3.2. Điều kiện xúc tác của $\beta$ -1,3-glucanase ở một số động vật không xương sống biển Việt Nam

Dựa trên kết quả sàng lọc khả năng thủy phân laminaran ở Bảng 1, chúng tôi đã lựa chọn 5 đối tượng có hoạt tính cao là Ốc đụn *Conus quercinus*, Ốc bào ngư *Haliotis ovina*, Vẹm xanh *Perna viridis*, Nghêu mía *Tapes literata* và Ốc mặt trắng *Turbo chrysolotus* và tiến hành nghiên cứu các điều kiện xúc tác của chúng.

#### 3.2.1. pH tối ưu

Tiến hành khảo sát khả năng hoạt động của các enzym thu được tại các vùng pH 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 và 9. Kết quả nghiên cứu được thể hiện ở Hình 2.



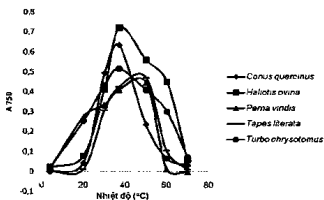
Hình 2. Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính của  $\beta$ -1,3-glucanase.

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi thay đổi pH thì hoạt độ  $\beta$ -1,3-glucanase thay đổi một cách rõ rệt. pH tối ưu cho hoạt động của  $\beta$ -1,3-glucanase từ 5 đối tượng khảo sát cũng có sự khác nhau, Vẹm xanh *Perna viridis*, Nghêu mía *Tapes literata* và Ốc mặt trắng *Turbo chrysolotus* hoạt động tốt nhất ở pH 5 trong khi  $\beta$ -1,3-glucanase chiết từ Ốc đụn *Conus quercinus* và Ốc Bào ngư *Haliotis ovina* lại hoạt động tốt nhất ở pH lần lượt là 6 và 7. Tuy nhiên cả 5 đối tượng đều hoạt động trong khoảng pH từ axit yếu đến trung tính (pH từ 4 đến 7).

#### 3.2.2. Nhiệt độ tối ưu

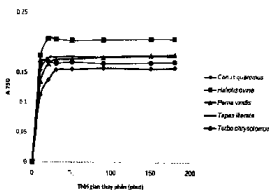
Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của  $\beta$ -1,3-glucanase thể hiện trên Hình 3 cho thấy enzym hoạt động mạnh trong khoảng nhiệt độ tương đối rộng 30 - 50 °C.  $\beta$ -1,3-

glucanase từ Ốc đụn *Conus quercinus*, Ốc bào ngư *Haliotis ovina* và Ốc mặt trắng *Turbo chrysolomus* hoạt động tối ưu ở 37 °C trong khi enzym từ Vẹm xanh *Perna viridis* và Nghêu mùa *Tapes literata* lại hoạt động tối ưu ở 50 °C. Dưới 10 °C hoặc trên 60 °C enzym không hoạt động vì bị mất hoạt tính. Ở nhiệt độ từ 10 - 20 °C, hoạt tính enzym vẫn thể hiện nhưng không cao do enzym bị kìm hãm.



Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của  $\beta$ -1,3-glucanase.

### 3.2.3. Thời gian thủy phân tối ưu



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian thực hiện phản ứng đến hoạt tính của  $\beta$ -1,3-glucanase.

Thời gian của phản ứng là một thông số quan trọng của phản ứng thủy phân bằng enzym. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian thực hiện phản ứng đến hoạt tính của  $\beta$ -1,3-glucanase từ năm đối tượng khảo sát cũng khác nhau (Hình 4). Enzym từ Ốc mặt trắng *Turbo chrysolomus* thể hiện hoạt tính cực đại chỉ sau 10 phút thủy phân trong khi enzym từ Ốc Bào ngư *Haliotis ovina*, Vẹm xanh *Perna viridis* và Nghêu mùa *Tapes literata* là 20 phút và Ốc đụn *Conus quercinus* là 30 phút. Sau các khoảng thời gian này, nếu tiếp tục kéo dài phản ứng, lượng sản phẩm tạo thành vẫn không thay đổi.

## 4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tiến hành sàng lọc hoạt tính thủy phân laminaran trên 41 mẫu động vật không xương sống biển Việt Nam, kết quả chỉ ra rằng  $\beta$ -1,3-glucanase phân bố rộng rãi trong các đối tượng nghiên cứu. 5 đối tượng có hoạt tính enzym cao đã được nghiên cứu

điều kiện xúc tác.  $\beta$ -1,3-glucanase tách chiết từ năm loài là Vẹm xanh *Perna viridis*, Nghêu mía *Tapes literata*, Ốc mặt trắng *Turbo chrysolomus*, Ốc dụn *Comus quercinus* và Ốc Bào ngư *Haliotis ovina* hoạt động trong khoảng pH từ axit yếu đến trung tính (pH 4-7), giới hạn nhiệt độ rộng (30 - 50 °C) và thời gian thủy phân tối ưu trong khoảng 10 - 30 phút.

*Lời cảm ơn.* Kết quả nghiên cứu này được thực hiện bởi sự tài trợ kinh phí từ Chương trình hợp tác giữa Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST) với Phân viện Viễn Đông Viện Hàn lâm Khoa học Nga (FEBRAS), nhiệm vụ VAST.HTQT.NGA.06/13-14 “Nghiên cứu đa dạng sinh học và hóa sinh trong chuyến khảo sát chung Việt Nam – Liên bang Nga lần thứ 4 trên tàu nghiên cứu “Viện sĩ Oparin” trong vùng biển Việt Nam” và nhiệm vụ VAST.HTQT.NGA.10/14-15 “Xúc tác sinh học để biến đổi các polysaccharide từ rong Nâu nhằm thu nhận các phân đoạn và nghiên cứu hoạt tính sinh học của chúng”.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Zakharenko A. M., Kusaykin M. I., Ly B. M., Huyen P. V., Khanh H. H. N., Sova V. V., Zvyagintseva T. N. - Catalytic properties of endo-1,3- $\beta$ -D-glucanase from the Vietnamese edible mussel *Perna viridis*, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **35** (2008) 54-61.
2. Huỳnh Hoàng Như Khanh, Bùi Minh Lý, Lê Quang Huan, Mikhail Kusaykin, Yu V. Dubrovskaya, Cao Thị Thủy Hằng, Phạm Đức Thịnh, Ngô Thị Duy Ngọc - Screening of O-glycoside hydrolase from Vietnam marine invertebrates, *Tạp chí Công nghệ sinh học* **11** (2013) 275-283.
3. Huỳnh Hoàng Như Khánh, Kusaykin M. I., Zakharenko A. M., Bùi Minh Lý, Cao Thị Thủy Hằng, Ngô Thị Duy Ngọc, Phan Thị Hoài Trinh, Võ Thị Diệu Trang, Lê Thị Hoa, Lê Quang Huân, Lê Nhã Uyên - Tinh sạch và khảo sát đặc tính của enzyme thủy phân alginate từ gan tụy Ốc bản tay *Lambis* sp., *Tạp chí Công nghệ sinh học IVA* (2011) 598-595.
4. Adachi M. - New effects of oligosaccharides from brown seaweed, *Fragr. J.* **30** (2002) 73-83.
5. Albertus J.S. - Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products, *Journal of Applied Phycology* **16** (2004) 245-262.
6. Zvyagintseva T. N., Shevchenko N. M., Popivnich I.B., Isakov V. V., Scobun A. S., Sundukova E. V., and Elyakova L. A. - A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds, *Carbohydr. Res.* **322** (1999) 32-39.
7. Nelson T. E. - A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose, *J. Biol. Chem.* **153** (1944) 375-381.
8. Bradford M. M. - A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72** (1976) 248-254.
9. Huỳnh Hoàng Như Khánh, Bùi Minh Lý, Thái Thị Hòa, Cao Thị Thủy Hằng, Lê Mai Hương - Sàng lọc hoạt tính enzyme của động vật thân mềm biển Việt Nam có khả năng phân giải fucoidan và laminaran từ rong Nâu, *Tuyển tập Nghiên cứu biển XVII*, 2010, tr. 178-182.

ABSTRACT

DISTRIBUTION AND CATALYTIC CONDITIONS OF  $\beta$ -1,3-GLUCANASE IN VIETNAM MARINE INVERTEBRATES

Huỳnh Hoàng Như Khanh<sup>1,\*</sup>, Cao Thị Thủy Hằng<sup>1</sup>, Phạm Đức Thịnh<sup>1</sup>, Bùi Minh Ly<sup>1</sup>,  
Le Quang Huan<sup>2</sup>, Ngô Thị Duy Ngọc<sup>1</sup>, Phan Thị Hoài Trinh<sup>1</sup>, Võ Thị Diêu Trang<sup>1</sup>, Lê Thị Hoa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nhatrang Institute of Technology Research and Application, VAST,  
2 Hung Vuong, Nha Trang, Khanh Hoa

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, VAST, 18 Hoang Quoc Viet, Ha Noi

\*Email: hhnkhanh@gmail.com

The distribution of  $\beta$ -1,3-glucanase in 41 species of marine invertebrates in Vietnam including echinoderms, bivalves and gastropods was studied. After collection, species names of the invertebrates were identified and samples were kept at 4 °C during transferring to the laboratory. The hepatopancreas, crystalline stalks, mesentery or eggs were separated, homogenised in succinic buffer and concentrated to obtain a crude extract. The crude extracts were applied on a Sephadex G-25 column (1.2 × 20 cm) to remove some small molecules, then enzymological activity was screened with laminaran. The results showed that  $\beta$ -1,3-glucanase were widespread in the animals analyzed. Catalysis conditions of enzyme were also studied in 5 species which had high activity with laminaran, it were *Conus quercinus*, *Haliotis ovina*, *Perna viridis*, *Tapes literata* and *Turbo chrysotomus*. These enzymes had different pH optimum and temperature optimum, but almost had high activity in pH range of 4 - 7 and at temperatures of 30 - 40 °C. The time for hydrolysis was also various in range from 10 to 30 minutes.

*Keywords:*  $\beta$ -1,3-glucanase, *Conus quercinus*, *Haliotis ovina*, *Perna viridis*, *Tapes literata* and *Turbo chrysotomus*.