

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์เอ็น-อะซิติกกลูโคซามิไนเดสในการตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค <i>Vibrio harveyi</i> ของกุ้งแชบ๊วย
ผู้เขียน	นางสาวอรุณญา คงแก้ว
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2549

### บทคัดย่อ

เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสทำหน้าที่สลายเบตา-กลูแคน ในขณะที่เอนไซม์เอ็น-อะซิติกกลูโคซามิไนเดส (N-acetyl-D-glucosaminidase, NAGase) พบในระบบไคติโนไลติกมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไคตินและเกี่ยวข้องกับกลไกการลอกคราบของครัสเตเชียน เอนไซม์ทั้งสองชนิดพบได้ทั้งในจุลชีพ พืช และสัตว์บางชนิด แต่มีการศึกษาน้อยมากในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เอนไซม์ทั้งสองชนิดในพืชและสัตว์มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค

จากการหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในสารสกัดตับและในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสทำงานได้ดี เมื่อใช้ลามีนารินเป็นสับสเตรท ใน 0.1 M sodium acetate, pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ นาน 20 นาที

ได้ทำให้เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์จากสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 70% โดยโครมาโทกราฟีด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Superdex 200 HR 10/30 แล้วแยกต่อด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบเตรียม พบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ และเอนไซม์นี้ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ เช่นกันซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 58,200 คัดตันในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพและ 74,000 คัดตันจากการทำเจลฟิลเทรชันด้วยคอลัมน์ Superdex 200 เอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 และที่อุณหภูมิ 60 °ซ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 60 °ซ เอนไซม์บริสุทธิ์มีจลนศาสตร์แบบไฮเพอร์โบลา โดยมีค่า  $V_{max}$  และ  $K_m$  ต่อลามีนาริน เป็น 0.625 ไมโครโมล/นาที/มิลลิลิตร และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

พบแอกทิวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase มากในสารสกัดตับและกระเพาะ พบเล็กน้อยในกล้ามเนื้อและในฮีโมลิมพ์ เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่พบมากในตับและกระเพาะน่าจะมึบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารกลูแคนและไคติน

ระดับแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมพ์และสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อก่อโรค *Vibrio harveyi* แบบ active มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 95 % และ 99 % เป็น 2.57 และ 1.97 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl ในทำนองเดียวกันพบระดับแอกทิวิตีของเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมพ์และสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยที่ติดเชื้อ *V. harveyi* มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 95 % และ 99 % เป็น 1.99 และ 1.5 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุม เมื่อนี้ฉีดกุ้งด้วยเชื้อ *V. harveyi* แบบ inactive หรือด้วยเชื้อไม่ก่อโรคในกุ้งแชบ๊วย เช่น *Escherichia coli*, *V. cholerae* และไวรัสที่ทำให้เกิดโรคตัวแดงดวงขาว พบว่าระดับแอกทิวิตีที่จำเพาะของทั้งเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมพ์และสารสกัดตับไม่แตกต่างจากกุ้งชุดควบคุม ผลการทดลองเหล่านี้บ่งชี้ว่าระดับแอกทิวิตีที่จำเพาะของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์ NAGase ที่เพิ่มสูงขึ้นในฮีโมลิมพ์และในตับน่าจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแชบ๊วย นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสน่าจะมึบทบาทเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะความเครียดของกุ้งเพราะพบระดับแอกทิวิตีของเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในฮีโมลิมพ์เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำให้กุ้งแชบ๊วยเกิดความเครียด

<b>Thesis Title</b>	Characterization of $\beta$ -1,3-Glucanase and N-Acetyl Glucosaminidase in Response to Pathogenic <i>Vibrio harveyi</i> of Banana Shrimp ( <i>Penaeus merguensis</i> )
<b>Author</b>	Miss Arunya Kongkaew
<b>Major Program</b>	Biochemistry
<b>Academic Year</b>	2006

### ABSTRACT

$\beta$ -1,3-Glucanases degrade  $\beta$ -glucan while N-acetyl-D-glucosaminidases (NAGase) are present in chitinolytic system of crustaceans which mainly involve in chitin digestion and molting. They are found in many microorganisms, plants and some animals. Both enzymes were rarely reported in invertebrates. In plants and animals, they play role in defense mechanism against pathogenic infection.

Optimal conditions for assay of  $\beta$ -1,3-glucanase activity in 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.

Purification of  $\beta$ -1,3-glucanase from the hepatopancreas extract of banana shrimps was achieved by chromatography on DEAE-Sephacel and Superdex 200 HR 10/30 columns, and subsequently by preparative polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The purified enzyme showed a single protein band in nondenaturing PAGE. In similar, it also showed one protein band with  $M_r$  of 58,200 and 74,000 daltons in SDS-PAGE and determined by gel filtration on Superdex 200 column, respectively. The optimum pH and temperature of the purified enzyme were 5.0 and 60 °C, respectively. It was stable upto 60 °C. The purified enzyme had a hyperbolic kinetic with  $V_{max}$  and  $K_m$  for laminarin values of 0.625  $\mu$ mol/min/ml and 5 mg/ml, respectively.

High specific activities of both  $\beta$ -1,3-glucanase and NAGase were detected in the extract fractions from hepatopancreases and guts whereas traces were found in the muscle

extract and hemolymph of banana shrimps. These results suggest that these enzymes present in hepatopancreases and guts may play roles in degradation of dietary glucan and chitin.  $\beta$ -1,3-Glucanase activities in hemolymph and hepatopancreas extract of banana shrimps infected with active *Vibrio harveyi* were 2.57 and 1.97 folds, respectively. These were significantly higher than that of controls which were injected with 0.85% NaCl. In the similar manner, NAGase activities in hemolymph and hepatopancreas extract of the shrimps infected with *V. harveyi* were 1.99 and 1.50 folds, respectively, which were significantly higher than that of controls. In contrast, specific activities of both  $\beta$ -1,3-glucanase and NAGase in the hemolymph and hepatopancreas extract of banana shrimps injected by their nonpathogenic microorganisms such as *Escherichia coli*, *V. cholerae*, white spot syndrome virus or inactive *V. harveyi*, were not different from that of controls. These results indicate that the increase in  $\beta$ -1,3-glucanase and NAGase activity levels in hemolymph and hepatopancreas may respond to the pathogenic infection as a defense mechanism in banana shrimps. In addition, an increasing in the specific activity of  $\beta$ -1,3-glucanase in hemolymph due to vigorously shaking, indicates that it may play a role in the stress response of banana shrimps.