ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสและไคติเนสจากตับของกุ้งแชบ๊วยปกติและภาวะติดเชื้อ *Vibrio harveyi*
ผู้เขียน	นายพงษธร ล้ำเลิศกิตติกุล
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2548

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสที่พบในครัสเตเชียนเป็นเอนไซม์ในระบบไคติโนไลติกที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไคตินและเกี่ยวข้องกับการลอกคราบ เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสที่พบในจุลชีพหลายชนิด พืช และสัตว์ มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยคาร์โบไฮเดรท การผสมพันธุ์หรือการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค

จากการหาภาวะที่เหมาะสมในการวัดแอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนสในสารสกัดตับกุ้งแชบ๊วย พบว่า เอนไซม์ไคติเนสทำงานได้ดี เมื่อใช้ colloidal chitin เป็นสับสเตรท ใน 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ นาน 2.5 ชั่วโมง

ได้ทำให้เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสบริสุทธิ์จากสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วย โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-200 แล้วแยกต่อด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเตรียม 2 ครั้ง พบว่า เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสบริสุทธิ์ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 60,900 ดัลตัน เมื่อย้อมแบบซิลเวอร์และแบบแอคทิวิทีในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ และเอนไซม์นี้ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ เช่นกัน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 104,000 ดัลตัน ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสบริสุทธิ์ ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 และที่อุณหภูมิ

50 °ซ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 50 °ซ เอนไซม์บริสุทธิ์มีจลนศาสตร์แบบไฮเพอร์โบลา โดยมีค่า V_{max} และ K_m ต่อ *p*-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide เป็น 110.86 ไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

พบแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสและเอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสมากในสารสกัดตับและกระเพาะ พบเล็กน้อยในฮีโมลิมฟ์ เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่พบมากในตับและกระเพาะน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารอาหารไคตินของกุ้งแชบ๊วย

ระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสในฮีโมลิมฟ์และสารสกัดตับของกุ้งแชบ๊วยที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็น 2.13 และ 1.50 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วย 0.85% NaCl ซึ่งต่างจากเอนไซม์ไคติเนสที่มีระดับแอคทิวิทีในฮีโมลิมฟ์และสารสกัดตับไม่แตกต่างกันระหว่างกุ้งทั้ง 2 ชุด บ่งชี้ว่าระดับของเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสที่เพิ่มสูงขึ้นในในฮีโมลิมฟ์และในตับ น่าจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแชบ๊วย

Thesis Title	Characterization of N-Acetyl Glucosaminidase and Chitinase from Hepatopancreas of Healthy and *Vibrio harveyi* Infected Banana Prawn (*Penaeus merguiensis*)
Author	Mr. Pongsathorn Lamlertkittikurn
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2005

Abstract

N-acetyl-D-glucosaminidases (NAGase) and chitinase are present in chitinolytic system of crustaceans. They mainly involve in chitin digestion and molting. NAGase are also found in many microorganisms, plants and animals. They play some roles in carbohydrate digestion, fertilization or defense against pathogenic infection.

Optimal conditions for assay of chitinase activity in hepatopancreas extract were by using colloidal chitin as a substrate in 0.1 M Tris-HCl, pH 6.0 and incubation at 45 °C for 2.5 hours.

Purification of NAGase from hepatopancreas extract of banana prawns was achieved by chromatography on DEAE-Sephacel and Sephadex G-200 columns and subsequently by double preparative polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The purified enzyme showed a single protein band by either silver or activity staining in nondenaturing PAGE with a M_r of 60,900 Daltons. Similarly, it also showed one protein band with M_r of 104,000 Daltons in SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for the activity of the purified enzyme were 6.0 and 50 °C, respectively. It was stable upto 50 °C. The purified

enzyme had a hyperbolic kinetic with V_{max} and K_m for *p*-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide values of 110.86 μmol/min/mg protein and 10 mM, respectively.

High specific activities of both chitinase and NAGase were detected in the extract fractions from hepatopancreases and guts whereas traces were found in hemolymph of banana prawns. These results suggest that these enzymes present in hepatopancreases and guts may play roles in dietary chitin degradation. NAGase activities in hemolymph and hepatopancreas extract of banana prawns infected with *Vibrio harveyi* were increased by 2.13 and 1.50 folds, respectively, significantly higher than that of controls which were injected with 0.85% NaCl. In contrast, chitin activities in hemolymph and hepatopancreas extract were not different in both groups of prawns. These results indicate that the increase in NAGase activity levels in hemolymph and hepatopancreas may respond to the pathogenic infection as a defense mechanism in banana prawns.