ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสใน

ฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย

ผู้เขียน นางสาวสุวรรณา ผลใหม่

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2546

## บทคัดย่อ

เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสเป็นเอนไซม์ที่พบในพืช สัตว์และจุลชีพ หลายชนิด ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยคาร์โบไฮเดรท การลอกคราบ การผสม พันธุ์และการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค

จากการทำให้เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสบริสุทธิ์จากซีรัมของกุ้ง แชบ๊วย โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-200 แล้วแยกต่อ ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเตรียม 2 ครั้ง พบว่า เอนไซม์เอ็น-อะซิ ติลกลูโคซามินิเดสบริสุทธิ์ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 72,500 ดัล ตันเมื่อย้อมแบบซิลเวอร์และแบบแอคทิวิทีในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ไม่แปลงสภาพ และมีน้ำหนักโมเลกุล 97,700 และ 107,000 ดัลตัน ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ ไม่ด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพและจากการทำเจลฟิลเทรซันด้วยคอลัมน์ Superdex 200 ตามลำดับ เอนไซม์บริสุทธิ์ทำงานได้ดีที่สุดใน pH 5.0 และที่อุณหภูมิ 55 ° มีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 50 ° เอนไซม์บริสุทธิ์มีความจำเพาะต่อ p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide โดยมีค่า K<sub>m</sub> และ V<sub>max</sub> เท่ากับ 3.48 มิลลิโมลาร์ และ 5.58 ไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

พบแอคทิวิที่จำเพาะของเอนไซม์ในซีรัมและในสารสกัดจากรังไข่ ตับ และ กล้ามเนื้อของกุ้งแชบ๊วย สารสกัดตับมีแอคทิวิที่จำเพาะของเอนไซม์สูงสุดซึ่งน่าจะมี บทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยสารอาหารของกุ้ง แต่ระดับแอคทิวิทีของตัวอย่างเหล่านี้ไม่ แปรผันตามพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ นอกจากนี้ระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสในซีรัมของกุ้งแชบ๊วยที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อ Vibrio harveyi มี ค่าสูงกว่ากุ้งที่ไม่ติดเชื้อก่อโรค 1.55 เท่า บ่งชี้ว่าเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสน่า จะเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรค Thesis Title Characterization of N-Acetyl Glucosaminidase in Hemolymph

of Banana Prawn (Penaeus merguiensis)

Author Miss Suwanna Pholmai

Major Program Biochemistry

Academic Year 2003

## **Abstract**

N-acetyl-D-glucosaminidases (NAGase) are found in many plants, animals and microorganisms. They play some roles in carbohydrate digestion, molting, fertilization or defense against pathogenic injection.

Purification of NAGase from serum 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<sub>r</sub> of 72,500 Daltons. Its had M<sub>r</sub> of 97,700 and 107,000 Daltons when determined by SDS-PAGE and gel filtration on Superdex 200 column, respectively. The optimum pH and temperature of the purified enzyme were 5.0 and 55 °C, respectively. It was stable upto 50 °C. The purified enzyme was specific to *p*-nitrophenyl-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide with K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> values of 3.48 mM and 5.58  $\mu$ mol/min/mg protein, respectively.

NAGase activity was detected in hemolymph and the extract fractions from ovaries, hepatopancreases and muscles of female banana

prawns at various stages of ovarian development. Hepatopancreas fractions showed the highest specific activity among the other samples. Enzyme specific activity of all samples was independent of stages of ovarian development. These results suggest that NAGase is not involved in ovarian maturation of banana prawns. Moreover, NAGase activity in hemolymph of banana prawns infected with *Vibrio harveyi* was 1.55 folds higher than that of controls which were injected with 0.85% NaCl . These results indicate that the increase in enzyme activity level in hemolymph may respond to the pathogenic infection as a defense mechanism in banana prawns.