



การศึกษสมบัติของเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามิเนส

ในฮีโมลิมพ์ของกุ้งแชบ๊วย

Characterization of N-Acetyl Glucosaminidase in Hemolymph  
of Banana Prawn (*Penaeus merguensis*)

สุวรรณา ผลใหม่

Suwanna Pholmai

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biochemistry

Prince of Songkla University

2547

๑

เลขทง	XL244. M33 ค.45 2547 ค.1
Bib Key	341001
	27 พ.ค. 2547

(1)

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาสมบัติของเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามิเนสใน ฮีโมลิมพ์ของกิ้งก่าบ๊วย
ผู้เขียน	นางสาวสุวรรณา ผลใหม่
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2546

### บทคัดย่อ

เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามิเนสเป็นเอนไซม์ที่พบในพืช สัตว์และจุลชีพหลายชนิด ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยคาร์โบไฮเดรต การลอกคราบ การผสมพันธุ์และการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค

จากการทำให้เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามิเนสบริสุทธิ์จากซีรัมของกิ้งก่าบ๊วย โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-200 แล้วแยกต่อด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเตรียม 2 ครั้ง พบว่า เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามิเนสบริสุทธิ์ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 72,500 ดัลตันเมื่อย้อมแบบซิลเวอร์และแบบแอดทิวทีในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ และมีน้ำหนักโมเลกุล 97,700 และ 107,000 ดัลตัน ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพและจากการทำเจลฟิลเทรชันด้วยคอลัมน์ Superdex 200 ตามลำดับ เอนไซม์บริสุทธิ์ทำงานได้ดีที่สุดใน pH 5.0 และที่อุณหภูมิ 55 °C มีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 50 °C เอนไซม์บริสุทธิ์มีความจำเพาะต่อ *p*-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide โดยมีค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  เท่ากับ 3.48 มิลลิโมลาร์ และ 5.58 ไมโครโมล/นาทึ่มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

พบแอดทิวทีที่จำเพาะของเอนไซม์ในซีรัมและในสารสกัดจากรังไข่ ตับ และกล้ามเนื้อของกิ้งก่าบ๊วย สารสกัดตับมีแอดทิวทีที่จำเพาะของเอนไซม์สูงสุดซึ่งน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยสารอาหารของกิ้งก่า แต่ระดับแอดทิวทีของตัวอย่างเหล่านี้ไม่

แปรผันตามพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ นอกจากนี้ระดับแอกติวิตีของเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสในซีรัมของกุ้งแช่บ๊วยที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* มีค่าสูงกว่ากุ้งที่ไม่ติดเชื้อก่อโรค 1.55 เท่า บ่งชี้ว่าเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสน่าจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองต่อการติดเชื้อก่อโรค

Thesis Title      Characterization of N-Acetyl Glucosaminidase in Hemolymph  
                         of Banana Prawn (*Penaeus merguensis*)

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  $M_r$  of 72,500 Daltons. Its had  $M_r$  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  $K_m$  and  $V_{max}$  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.