การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์เอ็น-อะซิติล กลูโคซามินิเดสจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย

Purification and Characterization of N-Acetyl Glucosaminidase from Hemolymph of Banana Prawn (*Penaeus merguiensis*)

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

รายงานฉบับสมบูรณ์

ที่ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณคณะวิทยาศาสตร์

ประจำปี 2548-2549

บทคัดย่อ

เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสที่พบในครัสเตเซียนเป็นเอนไซม์หนึ่งในระบบไคติโนไลติก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไคตินและเกี่ยวข้องกับการลอกคราบ เอนไซม์นี้ยังพบในจุลชีพ พืช และสัตว์หลายชนิด มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการย่อยคาร์โบไฮเดรท การผสมพันธุ์หรือการป้องกันตนเองจากเชื้อก่อโรค

ในงานวิจัยนี้ ได้ทำให้เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย โดยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และคอลัมน์ Sephadex G-200 แล้วแยกต่อด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบเตรียม 2 ครั้ง พบว่า เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสบริสุทธิ์ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ เมื่อย้อมแบบซิลเวอร์และแบบแอคทิวิทีในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ และเอนไซม์นี้ปรากฏแถบโปรตีน 1 แถบ เช่นกัน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 97,700 ดัลตัน ในโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ และมีน้ำหนักโมเลกุล 107,000 ดัลตัน เมื่อหาโดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน เอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสบริสุทธิ์ ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 และที่อุณหภูมิ 55 °ซ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิถึง 50 °ซ เอนไซม์บริสุทธิ์มีจลนศาสตร์แบบไฮเพอร์โบลา โดยมีค่า V_{max} และ K_m ต่อ *p*-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide เป็น 5.58 ไมโครโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน และ 3.48 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

พบแอคทิวิทีจำเพาะของเอนไซม์ NAGase ในฮีโมลิมฟ์และในสารสกัดจากตับและรังไข่ของแม่กุ้งแชบ๊วยที่มีพัฒนาการเจริญระยะต่าง ๆ แต่ระดับแอคทิวิทีของตัวอย่างเหล่านี้ไม่แปรผันตามพัฒนาการเจริญพันธุ์ของรังไข่ บ่งชี้ว่าเอนไซม์ NAGase ไม่น่ามีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ของรังไข่ นอกจากนี้ ระดับแอคทิวิทีของเอนไซม์เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยที่กระตุ้นให้มีการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* มีค่าสูงกว่าของกุ้งชุดควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำเกลือ 1.50-2.13 เท่า ในขณะที่แอคทิวิทีของเอนไซม์ไคติเนสในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งทั้ง 2 กลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน บ่งชี้ว่าแอคทิวิทีของเอนไซม์ NAGase ที่เพิ่มขึ้นน่าจะมีบทบาทตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคของกุ้งแชบ๊วย

Abstract

N-acetyl-D-glucosaminidases (NAGase) 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.

In this study, purification of NAGase from the hemolymph of banana shrimps was achieved by chromatography on DEAE-Sephacel and Sephadex G-200 columns and subsequently by double preparative polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Purified enzyme had a M_r of 107,000 kDa detemined by gel filtration. It showed a single protein band by either silver or activity staining in nondenaturing PAGE. In similar, purified enzyme also showed one protein band with M_r of 97,700 Da in SDS-PAGE. The optimum pH and temperature of the purified enzyme were 5.0 and 55 °C, respectively. It was stable up to 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 5.58 μmol/min/mg protein and 3.48 mM, respectively.

NAGase activity was detected in hemolymph and the extract fractions from ovaries and hepatopancreases of female banana prawns at various stages of ovarian development. 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 1.50-2.13 folds higher than that of controls which were injected with 0.85% NaCl. In contrast, chitinase activities in hemolymph were not different in both groups of prawns. These results indicate that the increase in activity level of NAGase in hemolymph may respond to the pathogenic infection as a defense mechanism in banana prawns.