Thesis Title	Characterization of Protease and β-N-acetylglucosaminidase Produced from Chalkbrood Pathogen
Author	Mr. Teerayut Theantana
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Panuwan Chantawannakul — Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong — Member
	Prof. Dr. John F. Peberdy — Member

ABSTRACT

Cuticle degrading enzymes are usually reported to have a role in fungal entomopathogenicity. Insect cuticle could be degraded by cuticle degrading enzymes in cooperation with other enzymes such as proteolytic, chitinolytic and lipolytic. From these reason, enzymic profiles produced by *Ascosphaera apis*, a pathogen causing chalkbrood disease in honey bee larvae were observed by API ZYM kit and agar plate method. Nine isolates of *A. apis* produced 11 extracellular enzymes (i.e. protease, β-N-acetylglucosaminidase, alkaline phosphatase, esterase, esterase lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β-glucosidase and α-mannosidase). Two main enzymes (protease and β-N-acetylglucosaminidase) that might play roles in penetration of cuticle in bee larval gut are chosen to further study. All isolates of *A. apis* gave highest proteolytic enzymes in sterile germination medium after 11 day-incubation at 30º C. Phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) and 1,10-phenanthroline could inhibit protease activity which remained activity about 6.5 and 54.3 % respectively. The fungal pathogen only *A. apis* HL-5-2 produced highest yield of β-N-acetylglucosaminidase when it was grown in enrichment culture medium containing 0.2% colloidal chitin for 14 days at 30 ºC. ß-N-acetylglucosaminidase purification were done by using ammonium sulphate precipitation, ion exchange (DEAE-sepharose) and gel filtration (sephacryl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

S-200 HR) column chromatography. After ion-exchange chromatography step ß-N-acetylglucosaminidase had specific activity and recovery yield about 43.06 and 8.34 % respectively. ß-N-acetylglucosaminidase was a monomer with molecular weight of 55 kDa which had pH and temperature optimum in the range of 5.0 to 6.0 and 35 to 45 ºC respectively. Several types of cationic compounds reduced ß-N-acetylglucosaminidase activity about 1-3% (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Na^{+} and Li^{+}) and had significantly decrease about 50.31 and 91.08% by Cu^{2+} and Zn^{2+} respectively. The enzyme was stable at 30 ºC and pH 5.0.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์เบต้า-เอ็น-อะเซทิลกลูโคซามินิเดสที่ผลิตจากเชื้อก่อโรคชอล์คบรูด

ผู้เขียน นายธีระยุทธ เตียนธนา

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการปรึกษาวิทยานิพนธ์
ผศ.ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร ประธานกรรมการ
รศ.ดร. สายสมร ลำยอง กรรมการ
Prof. Dr. John F. Peberdy กรรมการ

บทคัดย่อ

เอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายคิวติเคิลมีบทบาทในการทำให้เชื้อรามีความสามารถในการเข้าก่อโรคในแมลงหลายๆชนิด นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่นๆ อันได้แก่ เอนไซม์กลุ่มย่อยโปรตีน, กลุ่มย่อยไคตินและกลุ่มย่อยไขมันทำงานร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายคิวติเคิล ด้วยสาเหตุนี้จึงได้ทำการตรวจสอบแบบแผนการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *Ascosphaera apis* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคชอล์คบรูดในตัวตัวอ่อนผึ้งพันธุ์ โดยการใช้ชุดตรวจ API ZYM kit และวิธี agar plate method พบว่าเชื้อรา *A. apis* ทั้ง 9 ไอโซเลท มีการผลิตเอนไซม์ที่เหมือนกัน 11 ชนิด ได้แก่ protease, β-N-acetylglucosaminidase, alkaline phosphatase, esterase, esterase lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β-glucosidase และ α-mannosidase จากเอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าวโปรติเอส (protease) และ β-N-acetylglucosaminidase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในขั้นตอนการแทงทะลุผ่านโครงสร้างคิวติเคิลในทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้ง จึงเลือกเอนไซม์ดังกล่าวมาทำการทดสอบ โดยพบว่าเชื้อรา *A. apis* ทุกไอโซเลทให้ค่าการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส สูงสุดในอาหาร sterile germination medium ในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ^{O}C เป็นเวลา 11 วัน และพบว่า phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) และ 1,10-phenanthroline สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสโดยเหลือค่าการทำงาน 6.5 และ 54.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ามีเพียงเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท HL-5-2 เท่านั้นที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถผลิตเอนไซม์ β-N-acetylglucosaminidase ได้สูงสุดในอาหาร enrichment culture ที่ผสม colloidal chitin 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ^{O}C เป็นเวลา 14 วัน การศึกษาการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ β-N-acetylglucosaminidase ได้ใช้เทคนิคการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, การทำบริสุทธิ์ด้วยการทำคอลัมน์โครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE-sepharose) และ คอลัมน์โครมาโทรกราฟีแบบ gel filtration (sephacryl S-200 HR) โดยเอนไซม์ β-N-acetylglucosaminidase ที่ได้จากขั้นตอน ion-exchange มีค่า specific activity และเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่เหลือ ที่ 43.06 และ 8.34 ตามลำดับ β-N-acetylglucosaminidase ที่แยกได้มีมวลโมเลกุลประมาณ 55 kDa และสามารถทำงานได้ดีที่ช่วงพีเอช 5.0 - 6.0 และที่ช่วงอุณหภูมิ 35 – 45 ^{O}C นอกจากนี้พบว่าแคทไอออน เช่น Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Na^{+} และ Li^{+} มีผลในการลดการทำงานของเอนไซม์ลง 1 ถึง 3 เปอร์เซ็นต์ และ Cu^{2+} and Zn^{2+} สามารถลดการทำงานของเอนไซม์ลงอย่างชัดเจนที่ 50.31 และ 91.08 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรมากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 ^{O}C และพีเอช 5.0 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved