

เอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายคิวติเคิลมีบทบาทในการทำให้เชื้อราที่มีความสามารถในการเข้าก่อโรคในแมลงหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่นๆ อันได้แก่ เอนไซม์กลุ่มย่อยโปรตีน, กลุ่มย่อยไคตินและกลุ่มย่อยไขมันทำงานร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายคิวติเคิล ด้วยสาเหตุนี้จึงได้ทำการตรวจสอบแบบแผนการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *Ascospaera apis* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคชอล์ค-บรูคในตัวตัวอ่อนผึ้งพันธุ์ โดยการใช้ชุดตรวจ API ZYM kit และวิธี agar plate method พบว่าเชื้อรา *A. apis* ทั้ง 9 ไอโซเลท มีการผลิตเอนไซม์ที่เหมือนกัน 11 ชนิด ได้แก่ protease,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, alkaline phosphatase, esterase, esterase lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -glucosidase และ  $\alpha$ -mannosidase จากเอนไซม์ในกลุ่มดังกล่าวโปรติเอส (protease) และ  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในขั้นตอนการแทงทะลุผ่าน โครงสร้างคิวติเคิลในทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้ง จึงเลือกเอนไซม์ดังกล่าวมาทำการทดสอบ โดยพบว่าเชื้อรา *A. apis* ทุกไอโซเลทให้ค่าการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส สูงสุดในอาหาร sterile germination medium ในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °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 เท่านั้นที่สามารถผลิตเอนไซม์  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ได้สูงสุดในอาหาร enrichment culture ที่ผสม colloidal chitin 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 14 วัน การศึกษาการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ได้ใช้เทคนิคการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, การทำบริสุทธิ์ด้วยการทำคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (DEAE-sepharose) และ คอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบ gel filtration (sephacryl S-200 HR) โดยเอนไซม์  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ที่ได้จากขั้นตอน ion-exchange มีค่า specific activity และเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่เหลือ ที่ 43.06 และ 8.34 ตามลำดับ  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase ที่แยกได้มีมวลโมเลกุลประมาณ 55 kDa และสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.0 - 6.0 และในช่วงอุณหภูมิ 35 - 45 °C นอกจากนี้พบว่าแคทไอออน เช่น  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  และ  $\text{Li}^+$  มีผลในการลดการทำงานของเอนไซม์ลง 1 ถึง 3 เปอร์เซ็นต์ และ  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  สามารถลดการทำงานของเอนไซม์ลงอย่างชัดเจนที่ 50.31 และ 91.08 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรมากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °C และพีเอช 5.0 ตามลำดับ

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,  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase, alkaline phosphatase, esterase, esterase lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -mannosidase). Two main enzymes (protease and  $\beta$ -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 30° 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  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase when it was grown in enrichment culture medium containing 0.2% colloidal chitin for 14 days at 30 °C.  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase purification were done by using ammonium sulphate precipitation, ion exchange (DEAE-sepharose) and gel filtration (sephacryl S-200 HR) column chromatography. After ion-exchange chromatography step  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase had specific activity and recovery yield about 43.06 and 8.34 % respectively.  $\beta$ -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 °C respectively. Several types of cationic compounds reduced  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase activity about 1-3% ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Li}^+$ ) and had significantly decrease about 50.31 and 91.08% by  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  respectively. The enzyme was stable at 30 °C and pH 5.0.