การศึกษาคุณสมบัติของไคติเนสและโปรติเอสที่ผลิตจากราที่มีศักยภาพในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู (*Phenacoccus manihoti*)

Characterization of Chitinase and Protease Production from Potential Entomopathogenic Fungi Against Pink Cassava Mealybug

สุภัทรษร ทับศรี (Supattarasorn Tabsri)* คณิต วิชิตพันธุ์ (Kanit Vichitphan)**
สุกานดา วิชิตพันธุ์ (Sukanda Vichitphan)**

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสที่ผลิตจากราที่สามารถทำลายแมลง เป็นปัจจัยสำคัญในการเข้าทำลายผนังลำตัวของแมลงส่งผลให้แมลงตายในที่สุด จากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสของราที่มีศักยภาพในการทำลายเพลี้ยแป้งสีชมพู 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Aspergillus flavus* L21A, *Beauvaria bassiana* LARTC2 และ KK3A พบว่าราที่มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนส และโปรติเอสสูงสุด ได้แก่ *A. flavus* L21A (3.5 U) และ *B. bassiana* LARTC2 (187.4 U) ในวันที่ 16 และ 12 ตามลำดับ เมื่อนำเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยโครมาโทกราฟีแบบการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-Exchange chromatography) พบว่า เอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4 และ 7 เท่า ตามลำดับ เมื่อนำเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาศึกษาคุณสมบัติบางประการ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสมีค่าสูงกว่า 70% ที่พีเอชในช่วง 4-6 และในช่วง 6-9 ตามลำดับ และยังพบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความเสถียรที่พีเอสในช่วงกว้างโดยไคติเนสมีความเสถียรที่พีเอสช่วง 3-8 ส่วนโปรติเอสมีความเสถียรที่พีเอสช่วง 5-10 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสได้แก่ 60 และ 70°C ตามลำดับ เอนไซม์โปรติเอสมีความเสถียรสูงกว่าไคติเนส โดยสามารถทนได้ถึง 50°C เมื่อเทียบกับ 37°C ของไคติเนส จากการศึกษาผลของไอออนของโลหะและรีเอเจนต์ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่า Ca^{2+} และ β-mercaptoethanol สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส ส่วน Ba^{2+} และ Sodium dodecyl sulfate (SDS) สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์เฉพาะไคติเนสเท่านั้น แต่ 5 mM Hg^{2+} สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสได้อย่างสมบูรณ์ ผลการทดลองที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการนำเอนไซม์ทั้งสองชนิดไปทดสอบการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง

ABSTRACT

Chitinase and protease are two enzymes which exhibit potential virulence factor against insect cuticles and causes the dead of insects. Chitinase and protease produced from three entomopathogenic fungi against pink cassava mealybug which were *Aspergillus flavus* L2 1 A, *Beauvaria bassiana* LARTC2 and KK3A were selected to study. The results showed that *A. flavus* L2 1 A and *B. bassiana* LARTC2 can produce maximum activity of chitinase and protease on 16th and 12th day of the culture growth, respectively. The partial purified chitinase and protease by ion-exchange chromatography exhibit 4 and 7 purification fold, respectively. The chitinase and protease activity higher than 70% was observed between pH 4-6 and pH 6-9, respectively. The broad pH stability was found in both chitinase

** นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

(pH 3-8) and protease activity (5-10). The optimum temperature of chitinase and protease activity was detected at 60 and 70°C, respectively. The protease exhibited the temperature stability higher than chitinase which were 50 and 37°C, respectively. The effect of metal ions and reagents on those partial purified chitinase and protease were also investigated. Both chitinase and protease activity were activated by Ca^{2+} and β-mercaptoethanol. However, only chitinase activity was activated by Ba^{2+} and Sodium dodecyl sulfate (SDS). In contrast, 5 mM Hg^{2+} completely inhibit both chitinase and protease activity. These results are insight to help in experimental design to use chitinase and protease enzyme as virulence enzymes against pink cassava mealybug.

คำสำคัญ: เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ไคติเนส โปรติเอส

Keywords: *Phenacoccus manihoti*, Chitinase, Protease

บทนำ

เพลี้ยแป้งสีชมพู (*Phenacoccus manihoti*) มีการระบาดโดยทั่วไปในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังของประเทศไทย โดยปี พ.ศ. 2551 มีการระบาดของเพลี้ยแป้งชนิดนี้อย่างรุนแรง มีผลเสียหายทางเศรษฐกิจในทุกภาคของพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง ในการป้องกันและกำจัดเพลี้ยแป้งมันสำปะสีชมพูหลังทำได้ยาก เนื่องจากตามลำตัวของเพลี้ยแป้งสีชมพูจะปกคลุมด้วยโปรตีน แป้ง ไคติน และไขมัน เป็นต้น (St. Leger et al., 1986) ทำให้ยากต่อการทำลาย การกำจัดเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูโดยทั่วไปใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัด แต่ปัญหาจากการใช้สารเคมีพวกนี้มีผลมากมาย เช่น แมลงเกิดความต้านทานต่อสารเคมี การแพ้สารเคมีของผู้ใช้ ตลอดจนสัตว์เลี้ยง และเกิดปัญหาสารพิษตกค้างบนพืชผลตลอดจนระบบนิเวศน์สูญเสียไป ด้วยเหตุนี้จึงมีความสนใจใช้เชื้อจุลินทรีย์กำจัดแมลง เพราะจุลินทรีย์หลายชนิดมีประสิทธิภาพสูง ทำลายเฉพาะแมลงศัตรูพืชที่เป็นเป้าหมาย และปลอดภัยต่อผู้ใช้ จุลินทรีย์ที่ได้รับการพัฒนาในกรณีราก่อโรคแมลง มักเป็นที่รู้จักโดยทั่วไปที่ เรียกว่า Entomopathogenic fungi ราในกลุ่มนี้จะมีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงโดยตรง

แมลงมีผนังลำตัวเพื่อช่วยในการปกป้องอวัยวะต่างๆ ที่อยู่ภายในลำตัว และช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำของร่างกาย โดยผนังชั้นนอกของแมลงหลักๆ ประกอบด้วยสารไคติน ประมาณ 40% โปรตีน 20-50% และยังมีองค์ประกอบอื่นๆ เช่น ไขมัน และฟีนอล เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ ไวรัส รวมทั้งรา โดยเฉพาะกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคติน โปรตีน และไขมันได้ เพื่อเชื่อมโยงกับความรุนแรงในการก่อโรคของจุลิทรีย์ก่อโรคในแมลงเนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ทำหน้าที่ในการย่อยผนังลำตัวแมลงก่อนที่จะใช้สารอาหารในตัวแมลงเพื่อการเจริญเติบโต มีรายงานการศึกษาเอนไซม์ที่ผลิตโดยราก่อโรคในแมลง พบว่ามีการผลิต extracellular enzyme ได้แก่ ไคติเนส โปรติเอส และไลเปส เพื่อใช้ย่อยผนังชั้นนอกของแมลง ทำให้เชื้อราสามารถเข้าไป และเพิ่มจำนวนภายในแมลงได้ (Isakac et al., 2005) ดังนั้นการเข้าทำลายแมลงนั้นมีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส

เอนไซม์ไคติเนส (EC 3.2.1.14) ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม hydrolaseโดยจะสลายพันธะ glycosidic มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะ β-1,4-glycosidic ที่เชื่อมต่อกับ N-acetylglucosamine ของไคตินได้เป็น N-acetylglucosamine (GlcNAc) (Henrissat, 1999; Merzendorfer and Zimoch, 2003; Andersen et al., 2005)

เอนไซม์โปรติเอส (EC 3.4.21.40) อยู่ในกลุ่ม hydrolaseโดยจะสลายพันธะเปปไทด์ มีบทบาทในการ

เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์โปรตีน (Protein) เป็นโพลีเปปไทด์ หรือโพลิเมอร์ของกรดอะมิโน (Amino acid) เป็นเปปไทด์ที่สายสั้นลง สามารถพบได้ทั่วไปในพืช สัตว์ และเชื้อจุลินทรีย์ จากความแตกต่างของ active site และรูปแบบของการทำงานเอนไซม์ ซึ่งขึ้นอยู่กับตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ในสาย polypeptide สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลักๆ คือ endopeptidase ซึ่งแยกพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีนที่เกิดจากการรวมตัวของสาย polypeptide และ exopeptidase ซึ่งจะแยกเฉพาะที่ส่วนปลายสุดของกรดอะมิโน หรือทำการย่อย oligopeptides ขนาดเล็ก (Rovensky et al., 2011)

จากรายงานวิจัยของภัทรภา และคณะ (2555) ได้ทำการคัดแยกเชื้อราที่มีศักยภาพในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู โดยได้ราทั้งหมด 30 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อราทั้ง 30 ไอโซเลท ไปทำการทดสอบฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราลงบนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู พบว่า 17 ไอโซเลท มีความสามารถในการก่อโรคกับเพลี้ยแป้งสีชมพู โดยเชื้อราที่สามารถทำให้เพลี้ยแป้งสีชมพูมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง 3 ไอโซเลท ได้แก่ *Aspergillus flavus* L21A, *Beauvaria bassiana* LARTC2 และ KK3A ซึ่งกลไกการเข้าทำลายแมลง มีรายงานวิจัยที่พบว่าความรุนแรงในการก่อโรคของราในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณเอนไซม์โปรติเอส (Protease) และเอนไซม์ไคติเนส (Chitinase) และอธิบายกลไกการทำลายโดยราจะผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยผนังลำตัวแมลงก่อนเพื่อสามารถทะลุผ่านเข้าทางผนังลำตัวแมลง โดยสลายส่วนของเนื้อเยื่อ epidermis ทำให้ germ tube สามารถแทงทะลุผ่านเข้าไปภายในลำตัวของแมลง เส้นใยจะแผ่ขยาย เจริญเติบโต และใช้สารอาหารในลำตัวแมลงเพื่อเจริญเติบโต ทำให้แมลงตาย (ทิพย์วดี, 2535)

จากที่กล่าวมาข้างต้นการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสที่ผลิตจากราที่มีศักยภาพในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจศึกษา โดยข้อมูลที่ได้จะเป็นแนวทางในการอธิบายกลไกการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง และมีความเป็นไปได้ในการใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดในการเพิ่มความรุนแรงในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังนอกเหนือจากการใช้เฉพาะสปอร์ของราอย่างเดียว

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส จากราที่มีศักยภาพในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ราที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 รา *Beauveria bassiana* LARTC2 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร.มาลี ตั้งระเบียบ สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล

1.2 รา *Aspergillus flavus* L.21A และ KK3A สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้จากงานวิจัยของนางสาวภัทรภา พิมพ์พันธ์ นักศึกษามหาบัณฑิตศึกษาภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. การศึกษาการเพาะเลี้ยงราในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ไคติเนส และโปรติเอส

ชะสปอร์ของรา *B. bassiana* LARTC2, *A. flavus* L.21A และ KK3A ด้วย 0.1% Tween 80 นำมาเติมลงในอาหารเหลว Sabouraud's dextrose yeast extract (SDY) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยให้มีความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายไมซีเลียมทั้งหมดลงในอาหารเหลว Basal salt broth ที่มี 2% (w/v) colloidal chitin เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนส และลงในอาหารเหลว Basal salt broth ที่มี 1% (w/v) skim milk powder เพื่อเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ในปริมาตร

200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 rpm เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน เป็นเวลา 22 วัน นำเอาส่วนของเหลวใสซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) มาหากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และโปรติเอส

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

นำสารละลายเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 10 mM *p* - nitrophenyl N – acetyl – β – D - acetylglucosaminide (pNG) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 0.1 M citrate phosphate, pH 6 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม 1.0 M Na_2CO_3 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร คำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ โดยเอนไซม์ 1 ยูนิต (U) หมายถึงกิจกรรมของเอนไซม์ ไคติเนสที่สามารถปลดปล่อย *p*-nitrophenol 1 มิลลิโมล (mmol) ภายใต้สภาวะที่กำหนด

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

นำสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2% (w/v) casein ที่ละลายใน 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.4 M Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับ 0.4 M Na_2CO_3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 1 N folin-ciocateu reagent ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ 1 ยูนิต (U) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรทให้ไปเป็นไทโรซีน 1 ไมโครโมล (μmol) ภายใต้สภาวะที่กำหนด

4. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน

การทำเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange column) ด้วยเครื่อง Fast protein liquid chromatography (FPLC)

4.1 การทำให้เอนไซม์ไคติเนสบริสุทธิ์บางส่วน

โดยใช้คอลัมน์ DEAE sepharose FF ปรับสมดุลคอลัมน์ (equilibrate column)โดย 0.05 M citrate phosphate buffer pH 7.0 ใส่สารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์ จากนั้นชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ด้วย sodium chloride concentration gradient (จาก 0 ถึง 1 M) ใน 0.05 M citrate phosphate, pH 7.0

4.2 การทำให้เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน

โดยใช้คอลัมน์ CM sepharose FF ปรับสมดุลคอลัมน์ โดยใช้ 0.05 M Phosphate buffer, pH 6.0 ใส่สารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์ จากนั้นชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ด้วย sodium chloride concentration gradient (จาก 0 ถึง 1 M) ใน 0.05 M citrate phosphate, pH 7.0

5. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนส

5.1 ศึกษาอิทธิพลของความเป็นกรดด่างต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนส

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไคติเนส และสับสเตรท 10 mM pNG ในสารละลายบัพเฟอร์ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

5.2 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไคติเนสที่ความเป็นกรดด่าง ต่างๆ

เตรียมสารละลายเอนไซม์ในสารละลายบัพเฟอร์ pH 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

นาน 30 นาที วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ที่พีเอช 6 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5.3 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนส

นำสารละลายเอนไซม์ ที่เติม 10 mM pNG บ่มที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40, 50, 60 และ 70 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส

5.4 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไคติเนสที่อุณหภูมิต่างๆ

นำเอาสารละลายเอนไซม์ บ่มที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 10 mM pNG วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ที่พีเอช 6 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอส

6.1 ศึกษาอิทธิพลของความเป็นกรดด่างต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส

เตรียมสารละลายเอนไซม์โปรติเอส และสับสเตรท 2% (w/v) casein ในสารละลายบัพเฟอร์ pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

6.2 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่ความเป็นกรดด่าง ต่างๆ

เตรียมสารละลายเอนไซม์ ในสารละลายบัพเฟอร์ pH 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ที่พีเอช 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6.3 ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส

นำสารละลายเอนไซม์ ที่เติม 2% (w/v) casein บ่มที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40, 50, 60, 70 ,80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

6.4 ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิต่างๆ

นำเอาสารละลายเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 20, 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม 2% (w/v) casein วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ที่พีเอช 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

7. ศึกษาผลของไอออนของโลหะและรีเอเจนต์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และโปรติเอส

นำเอนไซม์ไคติเนสหรือโปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน มาบ่มกับไอออนของโลหะ ได้แก่ Na^{+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}, Ba^{2+} และสารรีเอเจนต์ ได้แก่ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ β-mercaptoethanol ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้ววิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส

8. การคำนวณหากิจกรรมสัมพันธ์ (Relative activity)

Relative activity (%)

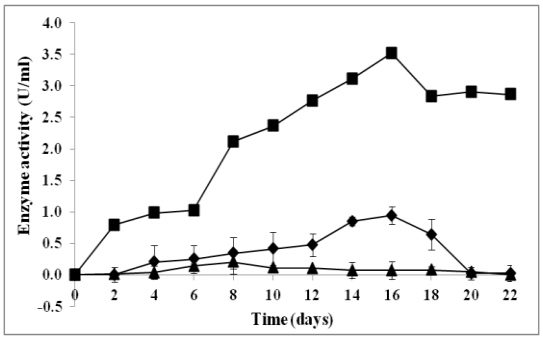
$$= \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์ที่ต้องการทราบ} \times 100}{\text{กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด}}$$

ผลการวิจัย

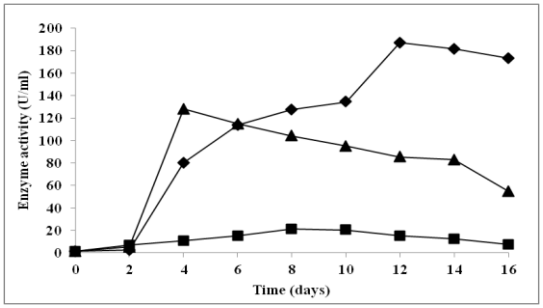
1. การเพาะเลี้ยงราในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ไคติเนส และโปรติเอส และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

จากการนำเอาราที่มีศักยภาพทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Beauvaria bassiana* LARTC2, *Aspergillus flavus* L21 และ KK3A เลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส โดยใช้ 2% (w/v) colloidal chitin และ 1% (w/v) skim milk powder ตามลำดับ ในการเหนี่ยวนำให้มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนส และโปรติเอสเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 วัน

เพื่อการวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และโปรติเอส ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 1 สรุปได้ว่า ในวันที่ 16 รา *B. bassiana* LARTC2 และ รา *A. flavus* L21A ผลิต ไคติเนสสูงที่สุด โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 0.094 U และ 3.5 U ตามลำดับ ส่วนรา KK3A มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.2 U ในวันที่ 8 ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสดังแสดงในภาพที่ 2 สรุปได้ว่ารา *B. bassiana* LARTC2 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 187.4 U ในวันที่ 12 ส่วนรา *A. flavus* L21A มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 21.3 U ในวันที่ 8 และเชื้อรา KK3A มีกิจกรรมเอนไซม์ 128.3 U ในวันที่ 4



ภาพที่ 1 กิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงราทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์ไคติเนส (■ *A. flavus* L21A, ▲ KK3A, ◆ *B. bassiana* LARTC2)



ภาพที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรา ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส (■ *A. flavus* L21A, ▲ KK3A, ◆ *B. bassiana* LARTC2)

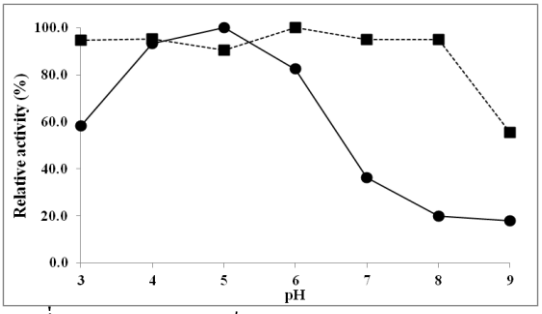
จากผลการผลิตเอนไซม์ไคติเนส และโปรติเอสจากราที่มีศักยภาพในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้คัดเลือก รา *A. flavus* L21A มาใช้ในการผลิตไคติเนส และ *B. bassiana* LARTC2 มาใช้ในการผลิตโปรติเอส เพื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange chromatography) ในการทำให้เอนไซม์ไคติเนส บริสุทธิ์บางส่วน จะใช้คอลัมน์ DEAE sepharose FF ผลการทดลอง พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น และปริมาณโปรตีนลดลงเมื่อเทียบกับ crude extract โดยมีค่า purification fold เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า และการทำให้เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วนจะใช้คอลัมน์ CM Sepharose FF ได้ค่า purification fold เพิ่มขึ้น 7 เท่า

2. คุณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนส

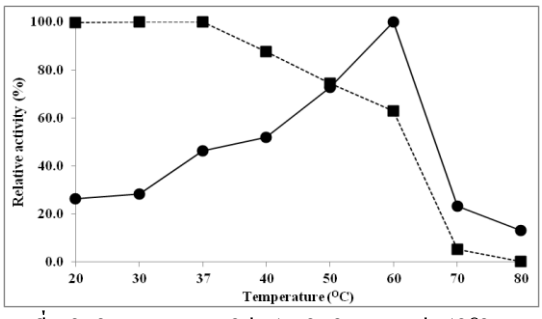
2.1 อิทธิพลของความเป็น กรดด่าง ต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยา และความคงตัวของเอนไซม์ไคติเนส

จากการศึกษาอิทธิพลของความเป็นกรดด่าง ต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนสบริสุทธิ์บางส่วน จากรา *A. flavus* L21A ที่พีเอช 3-9 พบว่า พีเอชต่างกันมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนสดังแสดงในภาพที่ 3 โดยพีเอช 5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด และช่วงพีเอช 4-6 ไคติเนสยังมีกิจกรรมของเอนไซม์สูง 70% จากรายงานของ Farag et al. (2014) พบว่า พีเอช 5 เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตได้จาก *Aspergillus terrus* และจากรายงานของ Mishra et al. (2013) ศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ที่ได้จากรา *B. bassiana* (HQ917687) พบว่า พีเอช 5 เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไคติเนส ความเหมาะสมของพีเอชที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไคติเนสนั้นขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอาหารที่ใช้ในการผลิต, พารามิเตอร์ รวมทั้งสายพันธุ์ของรา (Kang, 1999; Kim et al., 2010; Mustafa and Kaur, 2010) ส่วนการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไคติเนสบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจากรา *A. flavus* L21A พบว่า มีความคงตัวที่ช่วงพีเอช 3-8 (ภาพที่ 3) จากการทดลองพบว่าในช่วงพีเอชที่สูงหรือต่ำมากกิจกรรมเอนไซม์ และความเสถียรของเอนไซม์ลดลงอาจเป็นผลมาจากการที่

โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปโดยเฉพาะบริเวณตัวเร่งหรืออาจมีประจุบนโปรตีนเปลี่ยนแปลงจนไม่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา



ภาพที่ 3 อิทธิพลของความเป็นกรดด่างต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยา และความคงตัวของเอนไซม์ไคติเนสบริสุทธิ์บางส่วน จากรา *A. flavus* L21A (-●-Optimum pH, -■-Stability pH)



ภาพที่ 4 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยา และความคงตัวของเอนไซม์ไคติเนสบริสุทธิ์บางส่วน จากรา *A. flavus* L21A (-●-Optimum pH, -■-Stability pH)

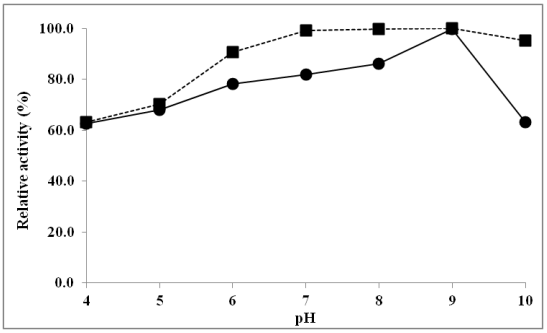
2.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาและความคงตัวของเอนไซม์ไคติเนส

จากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไคติเนสบริสุทธิ์บางส่วนที่ผลิตจากรา *A. flavus* L21A ที่อุณหภูมิ 20 - 70 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4 พบว่าอุณหภูมิที่ต่างกันมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนส อุณหภูมิที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไคติเนสบริสุทธิ์บางส่วน พบว่า มีความคงตัวที่ช่วงอุณหภูมิ 30 – 50 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า 70% จากรายงานวิจัยของ Xia et al. (1997) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตโดยรา *Aspergillus sp.* F-817 และจากรา *A. fumigatus* YJ-407 อยู่ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และยังสอดคล้องกับรายงานของ De-hui et al. (2011) พบว่าอุณภูมิ 60 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตได้จาก *Bacillus sp.* HU1

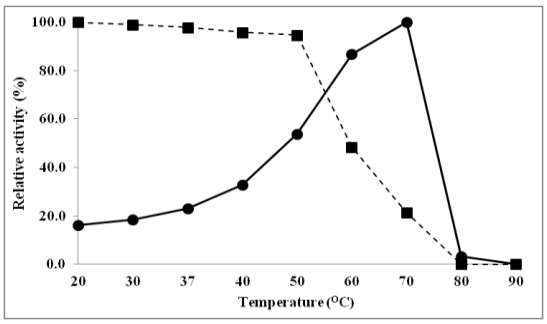
3. คุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอส

3.1 อิทธิพลความเป็นกรดด่างต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยา และความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส

จากการศึกษาอิทธิพลของความเป็นกรดด่าง ต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน ผลิตจากรา *B. bassiana* LARTC2 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 5 พีเอชที่ต่างกันมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส โดยค่าพีเอช 9 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด และในช่วงพีเอช 6-9 เอนไซม์ยังมีกิจกรรมมากกว่า 70% Namrata et al. (2011) รายงานว่าพีเอช 9 เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากรา *Aspergillus tamari* EF661565.1 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสมีความเหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอชเป็นด่าง กรณีเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากรา *Aspergillus fumigates* พีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์โปรติเอส พีเอช 8 (Hernandez et al., 2011) ส่วนการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน พบว่า มีความคงตัวที่ช่วงพีเอช 5-10 (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 อิทธิพลของความเป็นกรดด่างต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยา และความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน จากรา *B. bassiana* LARTC2 (-●- Optimum pH, -■- Stability pH)



ภาพที่ 6 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาและความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วนจากรา *B. bassiana* LARTC2 (-●- Optimum pH, -■- Stability pH)

3.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยา และความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน

จากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน จากรา *B. bassiana* LARTC2 ที่อุณหภูมิ 20-90 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่ต่างกันมีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอส สูงสุดที่ 70 องศาเซลเซียส และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 70% อยู่ในช่วง 60-70 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6) Bin et al. (2009) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Hirsutella rhossiliensis* OWVT-1 มีความเหมาะสมที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และจากรา *B. bassiana* CG432 อุณหภูมิที่เหมาะสม 60 องศาเซลเซียส (Ito et al., 2007) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงได้ และการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส จากรา *B. bassiana* LARTC2 พบว่า มีความคงตัวที่ 20-50 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6)

4. การศึกษาผลของไอออนของโลหะและรีเอเจนต์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส

4.1 ผลของไอออนของโลหะและรีเอเจนต์ต่อกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส

จากการศึกษาผลของไอออนของโลหะทั้ง 12 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ต่อกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสบริสุทธิ์บางส่วน ผลการทดลองในตารางที่ 1 พบว่า ไอออนของ Na^{+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+} และ K^{+} มีผลเพียงเล็กน้อยต่อกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส ส่วน Fe^{2+} มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ 36.5% แต่ Hg^{2+}นั้นยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสทั้งหมด ส่วน Ca^{2+} และ Ba^{2+} กระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และจากการศึกษาผลของรีเอเจนต์ที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส พบว่า EDTA ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ส่วน SDS และ β-mercaptoethanol กระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส จากรายงานของ Maria et al. (2012) ศึกษาผลของไอออนของโลหะที่มีผลต่อเอนไซม์ไคติเนสจากรา *Aspergillus niger* LOCK 62 พบว่า ไอออนของโลหะที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนส คือ Mg^{2+} กับ Ca^{2+} ส่วน Hg^{2+} และ Pb^{2+} มีการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 1 ผลของไอออนของโลหะ และรีเอเจนต์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสบริสุทธิ์บางส่วน โดยรา *A. flavus* L21A

ไอออนโลหะ (5mM)	Relative activity (%)	ไอออนโลหะ (5mM)	Relative activity (%)
No metals	100.0	Fe^{2+}	36.5
Na^{+}	98.2	Hg^{2+}	0.0
Ca^{2+}	101.1	Mn^{2+}	97.9
Cd^{2+}	66.7	Mg^{2+}	93.0
Co^{2+}	90.7	K^{+}	90.6
Cu^{2+}	99.1	Ba^{2+}	105.6
Zn^{2+}	97.7		

รีเอเจนต์ (5mM)	Relative activity(%)
EDTA	95.6
SDS	102.5
β-ME	108.0

ตารางที่ 2 ผลของไอออนของโลหะ และรีเอเจนต์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน โดยรา *B. bassiana* LARTC2

ไอออนโลหะ (5 mM)	Relative activity (%)	ไอออนโลหะ (5mM)	Relative activity (%)
No metals	100.0	Fe^{2+}	74.4
Na^{+}	98.7	Hg^{2+}	0.0
Ca^{2+}	101.4	Mn^{2+}	88.4
Cd^{2+}	81.3	Mg^{2+}	98.2
Co^{2+}	81.6	K^{+}	94.2
Cu^{2+}	76.8	Ba^{2+}	96.6
Zn^{2+}	77.4		

รีเอเจนต์ (5 mM)	Relative activity (%)
EDTA	93.2
SDS	82.3
β-ME	110.2

4.2 ผลของไอออนของโลหะต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

จากการศึกษาผลของไอออนโลหะทั้ง 12 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 พบว่า ไอออน Na^{+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, K^{+} และ Ba^{2+} มีผลยับยั้งเพียงเล็กน้อยต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส แต่ Hg^{2+} มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสโดยสมบูรณ์ และ Ca^{2+} มีผลต่อการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และจากการศึกษาผลของรีเอเจนต์ที่มีต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส พบว่า EDTA และ SDS มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วนเพียงเล็กน้อย ส่วน β-mercaptoethanol มีผลต่อการกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จากรายงานของ Kim et al. (2003) พบว่า β-mercaptoethanol มีผลต่อการกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากรา *A. niger* LOCK62 เนื่องจาก mercaptoethanol มีหมู่ sulfyhdryl ที่ไปจับบน active site แล้วทำให้เอนไซม์จับกับซับสเตรทได้ดีขึ้น

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส พบว่า รา *A. flavus* L21A ผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้สูงสุด และ รา *B. bassiana* LARTC2 ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด และจากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ไคติเนส และโปรติเอส สามารถเร่งปฏิกิริยา และมีความเสถียรในสภาวะกรดด่างในช่วงที่กว้าง และเอนไซม์โปรติเอสมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง กรณีไอออนของโลหะมีเฉพาะ Hg^{2+} เท่านั้นที่มีการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสโดยสมบูรณ์ ด้วยคุณสมบัติของเอนไซม์ทั้งสองชนิดดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีศักยภาพในการนำไปทดลองใช้ร่วมกับสปอร์ของราเพื่อเพิ่มความรุนแรงในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

ทิพย์วดี อรรถธรรม. โรควิทยาของแมลง เอกสารทางวิชาการ. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม: [ม.ป.พ.]; 2535.

ภัทรภา พิมพ์พันธ์. การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยแป้งสีชมพู (*Phenacoccus manihoti*) ในมันสำปะหลัง. งานประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย ครั้งที่ 2; 30 สิงหาคม - 1 กันยายน 2555; ณ ห้องประชุมเอนกประสงค์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิทยาเขตหนองคาย: หนองคาย; 2555.

Andersen TR, Hessen DO, Elser JJ. and Urabe J. Metabolic stoichiometry and the fate of excess carbon and nutrients in consumers. J. Amer 2005; 165: 1–15.

Bin Wanga, XiaoyingLiu, WenpingWu, Xingzhong Liu. and Shidong Li. Purification, characterization, and genecloning of an alkaline serine protease from a highly virulent strain of the nematode endoparasitic fungus *Hirsutella rhossiliensis* . J. Microbiol. Res 2009; 164: 665-673.

De-hui Dai, Wei-lian Hu, Guang-rong Huang. and Wei Li. Purification and characterization of a novel extracellular chitinase from thermophilic *Bacillus sp.* Hu1. Afr. J. Biotechnol 2011; 10(13): 2476-2485.

Farag, M. Aida, Al-Nusarie, S. and Taghreed. Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terrus*. Afr. J. Biotechnol 2014; 13(14) : 1567-1578.

Henrissat B. Classification of chitinase modules. Chitin and Chitinases, Burkhauser Basel Switzerland, 1999; 137–156.

Herandez-Martaneza R, Gutirrez-Sanchezb G, Bergmannb CW, Loera-Corrala O, Rojo-Dom nguezc A, Huerta-Ochoaa S, Regalado-Gonz lezc C. and Prado-Barragna LA. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigates*. Proc. Biochem 2011; 46: 2001–2006.

Isakac M, Kittakoop P, Kirtikara K, Hywel-Jones NL. and Thebtaranonth Y. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. acc. chem. res. 2005; 38: 813–823.

Ito Eliana Tiemi, Geni Varéa-Pereira, Dalva Tomoe Miyagui, Maria Helena Pimenta Pinotti, Pedro Manoel Oliveira Janeiro Neves. Production of extracellular protease by a brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. Braz. arch. biol. technol 2007; 50 : 217-223.

Kang, S.W, E. H, K, Lee, J.S. and Kim, S.W. Over-production of -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass. Biotechnol 1999; 21: 647 650.

Kim, JS. and Je, YH. A novel biopesticide production: attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. Appl. Microbiol. Biotechnol 2010; 87: 1639 1648.

Kim Kyoung-Ja, Yang Yong-Joon. and Kim Jong-Gi. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. J. Biochem. Mol. Biol 2003; 36(2) : 185-189.

Maria SB. and Urszula J. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its potential role in the biological Control. Curr Microbiol 2012; 65:666–672.

Merzendorfer H. and Zimoch L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. J. Exp. Biol 2003; 206: 4393–4412.

Mishra, S, Kumar, P. and Malik, A. Effect of process parameters on the enzyme activity of a novel *Beauveria bassiana* isolate. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci 2013; 2(9): 49-56.

Mustafa, U. and Kaur, G. Studies on extracellular enzyme production in *Beauveria bassiana* isolates. Int. J .Biotechnol. Biochem 2010; 6: 701-713.

Namrata Sharmal and Kantishree De. Production, purification and crystallization of an alkaline protease from *Aspergillus tamari* [EF661565.1]. Agric. Biol. J. N. Am. 2011; 2(7): 1135-1142.

Nawani NN, Kapadnis BP. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. Proc. Biochem 2005; 40: 651-660.

Rovensky J, Stancikova M, Svik K, Bauerova K. and Jurcovicova J. The effects of β-glucan isolated from *Pleurotus ostreatus* on methotrexate treatment in rats with adjuvant arthritis. J. Rheumatol 2011; 507-511.

St. Leger J, Cooperr M. and Charnleay K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. J. Invert. Pathol. 1986; 47, 295-302.

Xia Guoqing, Dong Zhiyang, Miao Xuexia and Jia Xincheng. Some properties of the chitinase from *Aspergillus sp.* F-817. Agric. Biol. J. N. Am 1997; 5(1): 79-82.