การตรวจหา คุณลักษณะ และการยับยั้งเชื้อราของไคโตซาเนสจากพืชไทย

มานะ ขาวเมฆ[1*]

บทคัดย่อ

การตรวจหาเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชไทยจำนวน 32 ชนิดใน Family Gramineae 21 ตัวอย่าง และ Leguminosae 11 ตัวอย่าง พบไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชทั้ง 32 ตัวอย่าง มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงในช่วงอายุ 2–4 สัปดาห์ โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ในช่วง 2.0812 - 32.9345 ยูนิต/มิลลิกรัม ต้นอ่อนพืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะมากกว่า 10 ยูนิต/มิลลิกรัม มีจำนวน 12 ชนิด เรียงจากมากไปน้อยดังนี้คือ ข้าวสกลนคร ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าว กข6 ข้าวโกชิฮิการิ ข้าวปทุมธานี 1 ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 ข้าวเหนียวดำ ข้าวเหลืองประทิว 123 ข้าวสุพรรณบุรี 1 ข้าวสุพรรณบุรี 90 ข้าวสุพรรณบุรี 60 และข้าว กข8 โดยไคโตซาเนสที่สกัดจากข้าวสกลนคร อายุ 2 สัปดาห์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดคือเท่ากับ 32.9345 ยูนิต/มิลลิกรัม และสีเสียดแก่นมีค่ากิจกรรมจำเพาะต่ำสุดคือ 2.0812 ยูนิต/มิลลิกรัม พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของไคโตซาเนสของต้นอ่อนพืชทั้ง 32 ชนิด อยู่ในช่วง 3.5 - 6.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 40 – 60 องศาเซลเซียส

การยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชทั้ง 32 ชนิด พบว่า ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืช ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงจะมีความสามารถในการยับยั้งชนิดของเชื้อราได้มากกว่า และใช้ไคโตซาเนสปริมาณน้อยกว่าในการยับยั้งเชื้อรา โดยไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืช 12 ชนิด ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่า 10 ยูนิต/มิลลิกรัม สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 7 ชนิดจาก 8 ชนิด โดยใช้ไคโตซาเนสในการยับยั้งเชื้อราปริมาณ 10 - 15 ไมโครกรัม

คำสำคัญ : การตรวจหา คุณลักษณะ การยับยั้งเชื้อรา ไคโตซาเนส พืชไทย

[1] สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์จังหวัดปทุมธานี

** ผู้นิพนธ์หลัก e-mail: mana@vru.ac.th*

SCREENING, CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL OF CHITOSANASE FROM THAI PLANTS

Mana Kaomek[1*]

Abstract

To screening of chitosanase from Thai plants germinated 32 species in 21 Family Gramineae and 11 from Leguminosae. It found chitosanase from 32 plants germinated and were highly specific in the age of 2-4 weeks. Specific activity were 2.0812 - 32.9345 units/mg. There are 12 species that had specific activity more than 10 units/mg that specific activity from most to least are follows as: Sakon Nakhon rice, Khao Dawk Mali 105 rice, RD6 rice, Koshihikari rice, Pathum Thani 1 rice, Niaw San-pah-tawng 1 rice, Leuang Pratew 123 rice, Suphan Buri 1 rice, Suphan Buri 90 rice, Suphan Buri 60 rice, and RD8 rice, respectively. Chitosanase from two weeks of Sakolnakorn rice had the highest specific activity of 32.9345 U/mg and chitosanase from *Acacia catechu* Willd had the lowest activity was 2.0812 U/mg. Chitosanase from 32 plants germinated species had optimal pH and temperature of 3.5 to 6.0 and 40-60 °C, respectively.

Chitosanase from 32 plants germinated species were inhibited fungi. Chitosanase from 12 plants germinated species with high specific activity were able to inhibit 7 species of fungi from 8 species by using chitosanase concentration to inhibit fungi of 10-15 µg.

Keywords : Screening, Characterization, Antifungal, Chitosanase, Thai Plants

[1] *Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage,*

** Corresponding author, e-mail: mana@vru.ac.th*

บทนำ

ไคโตซานเป็นไบโอพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดหนึ่งมีดีกูลโคซามีนเป็นองค์ประกอบ พบในธรรมชาติมีลักษณะเด่นเฉพาะตัว ไคโตซานเตรียมได้จากไคตินที่เป็นโครงสร้างของสัตว์พวก กุ้ง ปู แมลง และเชื้อรา ซึ่งถูกย่อยสลายได้ตามธรรมชาติจึงมีความปลอดภัยในการนำมาใช้กับมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ไม่เกิดการแพ้ ไม่ไวไฟ และไม่เป็นพิษ นอกจากนี้ยังส่งเสริมการเพิ่มปริมาณของสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ในธรรมชาติ (Biomaterials) ไคโตซานเตรียมจากไคตินที่ตัดหมู่อะซิติลของเอ็นอะซิติลกลูโคซามีนเหลือเป็นหมู่อะมิโนของกลูโคซามีน ตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Hayes, et al., 2008) และมีสมบัติละลายได้ในกรดอ่อน ไคโตซานมีสมบัติที่สำคัญหลายประการ เช่น การจับกับไอออนของโลหะได้ดี และการมีฤทธิ์ทางชีวภาพ ปัจจุบันมีการนำไคโตซานมาประยุกต์ใช้จริงทั้งในอุตสาหกรรม เกษตรกรรม การแพทย์ และเภสัชกรรม เช่น สารตกตะกอนในการบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม อุตสาหกรรมเส้นใยสิ่งทอ และการป้องกันแบคทีเรียและเชื้อรา

ไคโตซาเนสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของไคโตซานตรงพันธะระหว่างกลูโคซามีนกับกลูโคซามีน (GlcN-GlcN) กลูโคซามีนกับเอ็นอะซิติลกลูโคซามีน (GlcN – GlcNAc) และ เอ็นอะซิติลกลูโคซามีนกับกลูโคซามีน (GlcNAc–GlcN) แต่ไม่สามารถย่อยสลายพันธะระหว่างเอ็นอะซิติลกลูโคซามีนกับเอ็นอะซิติลกลูโคซามีน (GlcNAc–GlcNAc) เนื่องจาก GlcNAc–GlcNAc มีคุณสมบัติที่จำเพาะในการย่อยด้วยไคติเนสเพราะมีความแตกต่างกันในการทำงานของโครงสร้างระหว่างไคติเนสและไคโตซาเนส(Aam, et al., 2010) ไคโตซาเนสสามารถพบในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น เชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่ผลิตไคโตซาเนสมีความสำคัญในการรักษาความสมดุลของระบบนิเวศ สิ่งมีชีวิตที่มีไคโตซานเป็นองค์ประกอบสามารถผลิตไคโตซาเนสได้ สิ่งมีชีวิตบางชนิดที่ไม่มีไคโตซานเป็นองค์ประกอบแต่สามารถผลิตไคโตซาเนสได้ เช่น แบคทีเรียบางชนิด ไคโตซาเนสและไคติเนสจากพืชที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ไคโตซาเนสมีความสำคัญมากในด้านการเกษตร นอกจากนั้นการหาเอนไซม์จากพืชที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโรคพืช หรือสามารถสลายไคโตซานเป็นเฮกซะเมอร์ (Hexamer) และเฮปตะเมอร์ (Heptamer) ของกลูโคซามีนที่เป็นประโยชน์อย่างมากในการประยุกต์ใช้

การศึกษานี้เป็นการตรวจหาเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชจำนวน 32 ชนิด หาคุณลักษณะ พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของไคโตซาเนสและทดสอบการยับยั้งเชื้อราจำนวน 8 สายพันธุ์ ที่ก่อให้เกิดโรคพืช

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจหาไคโตซาเนสและคุณลักษณะของไคโตซาเนสจากพืชไทยจำนวน 32 ชนิด
2. เพื่อนำสารสกัดไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชไทยจำนวน 32 ชนิดมาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สกัดเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนของพืช 32 ชนิด ที่มีอายุ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยวิธีของพิลไลและคณะ (Pillai, et al., 2009) โดยนำต้นอ่อนพืชอายุต่าง ๆ มาบดในไนโตรเจนเหลว เติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 3.5 ปริมาตร 1:1 ที่มีฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และพอลิไวนิลพอลิไพโรลิดอล 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 25,000 g เป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายของสารสกัดไคโตซาเนส

2. หาค่ากิจกรรมของไคโตซาเนส (Tolaimate, et al, 2003) โดยนำสารสกัดไคโตซาเนส 200 ไมโครลิตรผสมกับสารละลายไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20

นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ Schales'Reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเป็นเวลา 15 นาที ปล่อยให้เย็น นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคซามีน

3. หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของเลาว์รี (Lowry, et al., 1951) โดยนำสารสกัดไคโตซาเนสมา 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 ไมโครลิตร ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 3.5 เติมสารละลายผสมคอปเปอร์ซัลเฟต 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ โฟลินปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนโบไวน์ซีรัมอัลบูมีน (BSA)

4. ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยา (Gomori, 1955)

4.1 ศึกษาค่ากิจกรรมในช่วงพีเอช 3.0-10 (ช่วงต่าง 0.5) โดยพีเอชช่วง 3.0-6.0 ใช้โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ช่วงพีเอช 6.5-8.0 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และช่วงพีเอช 8.5-10 ใช้ทริสไฮโดรคลอริก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

4.2 ศึกษาค่ากิจกรรมที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส (ช่วงต่าง 5 องศาเซลเซียส) โดยใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 4.1) บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70) เป็นเวลา 20 นาที

5. ตัดเชื้อราที่อยู่ในสแลนท์ (Slant) เป็นรูปสี่เหลี่ยมมาเลี้ยงตรงกลางจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน นำเอนไซม์ไคโตซาเนสจากพืช 32 ชนิด มาทดสอบการยับยั้งเชื้อรา โดยนำกระดาษกรองมาตัดเป็นรูปวงกลมวางไว้ในเพลท 4 จุด หยดไคโตซาเนสที่มีความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัม อย่างละ 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงบนกระดาษกรองที่ตัดไว้ 3 จุด และหยดสารละลายบัฟเฟอร์ที่ตัวควบคุม 1 จุด แล้วบ่มที่30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ตรวจเช็คการยับยั้งเชื้อรา

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การตรวจหาเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชไทยจำนวน 32 ชนิด พบว่าต้นอ่อนพืชไทยทั้ง 32 ชนิดมีเอนไซม์ไคโตซาเนส จากการตรวจหาค่ากิจกรรมจำเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงอยู่ในช่วงอายุ 2–4 สัปดาห์ โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ในช่วง 2.0812-32.9345 ยูนิต/มิลลิกรัม ต้นอ่อนพืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะมากกว่า 10 ยูนิต/มิลลิกรัม มี 12 ชนิด เรียงจากมากไปน้อยคือ ข้าวสกลนคร ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าว กข. 6 ข้าวโกชิฮิการิ ข้าวปทุมธานี 1 ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 ข้าวเหนียวดำ ข้าวเหลืองประทิว 123 ข้าวสุพรรณบุรี 1 ข้าวสุพรรณบุรี 90 ข้าวสุพรรณบุรี 60 และข้าว กข. 8 โดยข้าวสกลนครมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดคือ 32.9345 ยูนิต/มิลลิกรัม และสีเสียดแก่นมีค่ากิจกรรมจำเพาะต่ำสุดคือ 2.0812 ยูนิต/มิลลิกรัม พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชทั้ง 32 ชนิด อยู่ในช่วง 3.5 - 6.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 40 – 60 โดยข้าวสกลนครที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดมีพีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 5.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 1

เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมจำเพาะของไคโตซาเนสที่ได้จากต้นอ่อนพืชกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ พบว่า ไคโตซาเนสจากพืชไทยมีค่ากิจกรรมจำเพาะของไคโตซาเนสสูงกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เช่น ไคโตซาเนสจาก *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BPมีค่ากิจกรรมจำเพาะ 0.9010 ยูนิต/มิลลิกรัม (Yeon, et. al., 2004) จาก *Bacillus* sp. StrainCK4 มีค่ากิจกรรมจำเพาะ 0.8120 ยูนิต/มิลลิกรัม (Yoon, et. al., 2001) จาก *Paenibacillus fukuinensis* มีค่ากิจกรรมจำเพาะ 0.8647 ยูนิต/มิลลิกรัม (Fukuda, et. al., 2007)

ตารางที่ 1 ค่ากิจกรรม ปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมจำเพาะ (SP)

ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อทั่วไป	อายุต้นอ่อนที่มี (SP) สูง (สัปดาห์)	ค่ากิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัม)	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)
Family Gramineae				
Oryza sativa L.				
ข้าว กข6	3	28.7636	3.5	45
ข้าว กข7	2	6.1141	4.5	50
ข้าว กข8	2	10.1082	4.0	55
ข้าวขาวดอกมะลิ 105	4	32.5523	5.0	45
ข้าวปทุมธานี 1	2	26.9636	6.0	55
ข้าวสุพรรณบุรี 1	4	18.5376	4.5	50
ข้าวสุพรรณบุรี 60	4	11.5142	5.0	45
ข้าวสุพรรณบุรี 90	4	18.2092	5.0	45
ข้าวสกลนคร	3	32.9345	5.5	50
ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1	2	25.97685	6.0	60
ข้าวเหลืองประทิว 123	2	19.5260	5.5	45
ข้าวเหนียวดำ	2	21.2071	5.0	50
ข้าวโกชิฮิการิ	2	28.2585	5.0	40
Pennisetum americium				
หญ้าไข่มุก KU01	2	8.1465	4.0	45
Sorghum vulgare Pers.				
ข้าวฟ่าง KU439	2	7.3365	4.0	50
ข้าวฟ่าง KU630	2	6.8331	4.5	40
ข้าวฟ่างเลี้ยงสัตว์ KD1	2	7.6312	4.0	40
Triticumaestivum L.				
ข้าวสาลี อินทรี 1	2	4.0564	5.0	45
ข้าวสาลี อินทรี 2	2	4.4403	5.5	40
Zea mays				
ข้าวโพดหวาน สุวรรณ 5	2	3.4923	5.0	50
ข้าวโพดหวาน อินทรี 2	2	7.8821	5.5	40
Family Leguminosae				
*Acacia catechu*Willd.				
สีเสียดแก่น	2	2.0812	4.0	45

ตารางที่ 1 ค่ากิจกรรม ปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมจำเพาะ (ต่อ)

ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อทั่วไป	อายุต้นอ่อนที่มี (SP) สูง (สัปดาห์)	ค่ากิจกรรมจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัม)	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)
*Albizialebbeck*Benth.				
พฤกษ์	2	2.8962	3.5	40
*Albiziaprocera*Benth.				
ถ่อน	2	7.5773	4.0	40
Cassia surattensis (Roxb) Burm. J.				
ทรงบาดาล	2	7.3450	4.5	45
Dalbergiacochinchinensis Pierre				
พยุง	2	6.5889	5.5	50
Leucaenaleucocephala de Wit				
กระถินบ้าน	2	3.7028	5.0	45
กระถินยักษ์	2	2.6841	4.0	50
*Millerttialeucantha*Kurz				
สาธร	2	3.6371	4.5	45
*Peltophorumdasyrr*hachisKurz				
นนทรีทอง	2	2.8962	4.5	40
นนทรีป่า	2	2.1469	3.5	50
Samaneasaman (Jacq) Marrill				
ก้ามปู	2	8.7864	3.5	50

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา 8 ชนิด คือ *Aspergillus oryxae*, *Fusarium monoliforme*, *Geotrichum candidum, Mucor rouxii*, *Penicillium mameffei, Rhizopus oligosporus, Sporotrichum pulverulentum* และ *Tricoderma reesei* ด้วยเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืช 32 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัม พบว่าไคโตซานเนสจากต้นอ่อนพืชแต่ละชนิดสามารถยับยั้งเชื้อราได้ไม่เหมือนกัน โดยต้นอ่อนพืชที่ไคโตซาเนสมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสามารถยับยั้งชนิดของเชื้อราได้ 7 ชนิดจาการทดสอบ 8 ชนิดคือ ข้าว กข6 ข้าว กข8 ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวปทุมธานี 1 ข้าวสุพรรณบุรี 1 ข้าวสุพรรณบุรี 60 ข้าวสุพรรณบุรี 90 ข้าวสกลนคร ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 ข้างเหลืองประทิว 123 ข้าวเหนียวดำ และข้าวโกชิฮิการิ ความเข้มข้นของไคโตซาเนสที่สามารถยับยั้งเชื้อราอยู่ในช่วง 10-15 ไมโครกรัม โดยเชื้อราส่วนใหญ่ที่ไคโตซาเนสสามารถยับยั้งได้ด้วยความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ดังตารางที่ 2 และภาพที่ 1

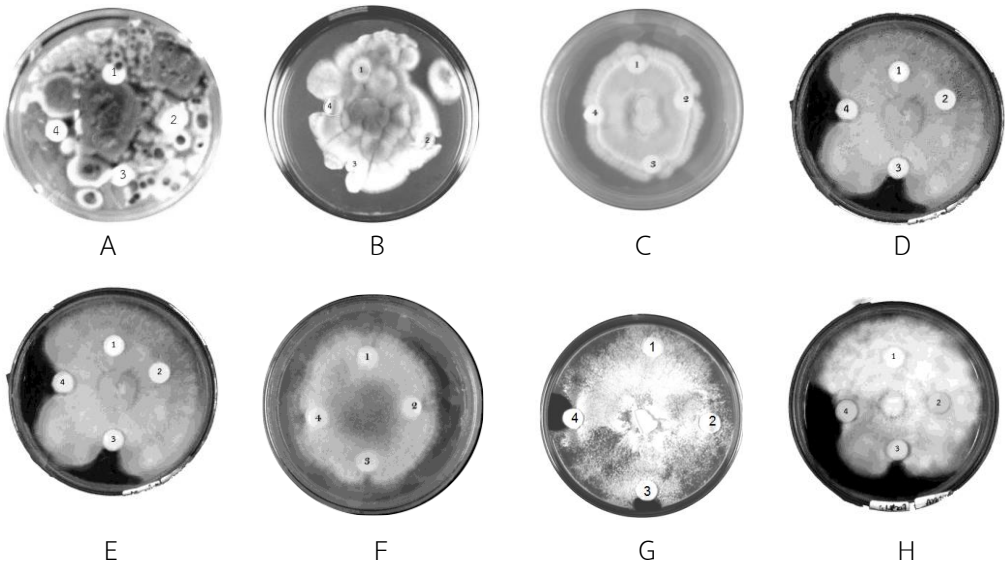
ตารางที่ 2 การยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคโตซาเนสจากพืชแต่ละชนิด

ไคโตซาเนสจากพืช	ชนิดเชื้อรา (ความเข้มข้นในการยับยั้ง; ไมโครกรัม)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ข้าว กข. 6	10 µg	10 µg	10µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	x
ข้าว กข. 7	x	10 µg	10µg	x	10 µg	10 µg	x	x
ข้าว กข. 8	10µg	10 µg	10µg	15 µg	10 µg	10 µg	x	10µg
ข้าวขาวดอกมะลิ 105	10 µg	10 µg	10µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	x
ข้าวปทุมธานี 1	10 µg	10 µg	10µg	10 µg	10 µg	10 µg	x	10 µg
ข้าวสุพรรณบุรี 1	10µg	10 µg	10µg	10 µg	15 µg	10 µg	x	10 µg
ข้าวสุพรรณบุรี 60	10 µg	10µg	10µg	15µg	15µg	10 µg	x	10µg
ข้าวสุพรรณบุรี 90	10 µg	10µg	10µg	10 µg	10 µg	10 µg	x	10µg
ข้าวสกลนคร	10 µg	10 µg	10µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	x
ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1	10 µg	10 µg	10µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	x
ข้าวเหลืองประทิว 123	10 µg	10 µg	x	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	15 µg
ข้าวเหนียวดำ	10 µg	10 µg	10µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	x
ข้าวโกชิฮิการิ	x	10 µg	10µg	10 µg	10 µg	10 µg	10 µg	15µg
หญ้าไข่มุก KU01	10 µg	x	x	x	10 µg	10 µg	x	15µg
ข้าวฟ่าง KU439	10 µg	x	x	x	10 µg	10 µg	x	15µg
ข้าวฟ่าง KU630	10 µg	x	x	x	10 µg	10 µg	x	15µg
ข้าวฟ่างเลี้ยงสัตว์ KD1	x	15 µg	15µg	10 µg	x	10 µg	x	x
ข้าวสาลี อินทรี 1	10 µg	x	x	x	10 µg	10 µg	x	10 µg
ข้าวสาลี อินทรี 2	15 µg	x	x	x	10 µg	10 µg	10 µg	x
ข้าวโพดหวาน สุวรรณ 5	x	15 µg	15 µg	x	x	10 µg	x	15 µg
ข้าวโพดหวาน อินทรี 2	x	15 µg	15 µg	x	x	10 µg	x	15 µg
สีเสียดแก่น	15 µg	15 µg	15 µg	10 µg	x	15 µg	x	x
พฤกษ์	15 µg	15 µg	15 µg	10 µg	x	15 µg	x	x
ถ่อน	x	15 µg	x	x	10 µg	15 µg	x	x
ทรงบาดาล	15 µg	x	x	10 µg	x	15 µg	x	x
พยุง	15 µg	x	15 µg	x	10 µg	15 µg	x	15 µg
กระถินบ้าน	15 µg	15 µg	10 µg	10 µg	10 µg	15 µg	x	x
กระถินยักษ์	15 µg	x	15 µg	10 µg	x	15 µg	15 µg	x

ตารางที่ 2 การยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคโตซาเนสจากพืชแต่ละชนิด (ต่อ)

ไคโตซาเนสจากพืช	ชนิดเชื้อรา (ความเข้มข้นในการยับยั้ง; ไมโครกรัม)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
สาธร	x	15 µg	x	15 µg	x	15 µg	x	15 µg
นนทรีทอง	x	15 µg	x	15 µg	x	15 µg	x	15 µg
นนทรีป่า	x	15 µg	x	15 µg	x	15 µg	x	15 µg
ก้ามปู	x	15 µg	10 µg	15 µg	15 µg	15 µg	15 µg	x

1 = *Aspergillus oryxae* 2 = *Fusarium monoliforme* 3 = *Geotrichum candidum*
4 = *Mucor rouxii* 5= *Penicillium marneffei* 6= *Rhizopus oligosporus*
7 = *Sporotrichum pulverulentum* 8 = *Tricoderma reesei* x = ไม่ยับยั้ง



ภาพที่ 1 ตัวอย่างการยับยั้งเชื้อราทั้ง 8 ชนิดของเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชบางชนิด โดย
A = *Aspergillus oryxae*, B = *Fusarium monoliforme*, C = *Geotrichum candidum,*
D = *Mucor rouxii*, E = *Penicillium marneffei*, F = *Rhizopus oligosporus*,
G = *Sporotrichum pulverulentum* H = *Tricoderma reesei*

สรุป

การศึกษาเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชจำนวน 32 ชนิดใน Family Gramineae 21 ตัวอย่าง และ Leguminosae 11 ตัวอย่าง พบไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชทั้ง 32 ตัวอย่าง มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงในช่วงอายุ 2 – 4 สัปดาห์ โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ในช่วง 2.0812 - 32.9345 ยูนิต/มิลลิกรัม ต้นอ่อนพืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะมากกว่า 10 ยูนิต/มิลลิกรัม มี 12 ชนิดเรียงจากมากไปน้อยคือข้าวสกลนคร ข้าวขาวดอก

มะลิ 105 ข้าว กข. 6 ข้าวโกชิฮิการิ ข้าวปทุมธานี 1 ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 ข้าวเหนียวดำ ข้าวเหลืองประทิว 123 ข้าวสุพรรณบุรี 1 ข้าวสุพรรณบุรี 90 ข้าวสุพรรณบุรี 60 และข้าว กข. 8 ตามลำดับ โดยไคโตซาเนสที่สกัดจากข้าวสกลนคร อายุ 2 สัปดาห์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดคือเท่ากับ 32.9345 ยูนิต/มิลลิกรัม และสีเสียดแก่นมีค่ากิจกรรมจำเพาะต่ำสุดคือ 2.0812 ยูนิต/มิลลิกรัม พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของไคโตซาเนสของต้นอ่อนพืชทั้ง 32 ชนิด อยู่ในช่วง 3.5 - 6.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 40 – 60 องศาเซลเซียส

การยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชพบว่า ต้นอ่อนของพืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะของไคโตซาเนสสูงจะมีความสามารถในการยับยั้งชนิดของเชื้อราได้มากกว่า และใช้ไคโตซาเนสปริมาณน้อยกว่าในการยับยั้งเชื้อรา เช่น ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงจำนวน 12 ชนิด คือ ข้าว กข6 ข้าว กข 8 ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ข้าวปทุมธานี 1 ข้าวสุพรรณบุรี 1 ข้าวสุพรรณบุรี 60 ข้าวสุพรรณบุรี 90 ข้าวสกลนคร ข้าวเหนียวสันป่าตอง 1 ข้าวเหลืองประทิว 123 ข้าวเหนียวดำ และข้าวโกชิฮิการิ สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 7 ชนิดจาก 8 ชนิด โดยเชื้อราส่วนใหญ่ที่ไคโตซาเนสสามารถยับยั้งได้ด้วยความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ตรวจหาเอนไซม์ไคโตซาเนสจากต้นอ่อนพืชไทย 32 ชนิด โดย 12 ชนิด มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูง จึงควรนำไปทดสอบย่อยไคโตซานเป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปประยุกต์ใช้ในยับยั้งเชื้อรา การต้านอนุมูลอิสระต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์ของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จึงขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

Aam, B. B., Heggset, E. B., Norberg, A. L., Sorlie, M., Varum, K. M. & Eijsink, V.G.H. (2010). Production of Chitooligosaccharides and their Potential Applications in Medicine. **Marine Drugs**. 8(5): 1482-1517.

Fukuda, T., Isogawa, D., Takagi, M., Kato-murai, M., Kimoto, H., Kusaoke, H., Ueda, M. & Suye, S. I. (2007). Yeast Cell-Surface Expression of Chitosanase from *Paenibacillus fukuinensis* **Bioscience Biotechnology and Biochemistry.** 71(11): 2845-2847.

Gomori, G. (1955). Preparation of Buffers for Use in Enzymes Studies. **Methodology Enzymology**. 1: 139-146.

Hayes, M., Carney, B., Slater, J. & Bruck, W. (2008). Mining Marine Shellfish Wastes for Bioactive Molecules: Chitin and Chitosan; Part A: Extraction Methods. **Biotechnology Journal.** 3(7), 871-877.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry.** 193: 265-275.

Pillai, C. K. S., Paul, W. & Sharma, C. P. (2009). Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation. **Progress in Polymer Science.** 4(2): 641-678.

Tolaimate, A. , Desbrieres, J. , Rhazi, M. & Alagui, A. (2003). Contribution to the Preparation of Chitins and Chitosan with Controlled Physic- chemical Properties. **Polymer.** 44(26): 7939- 7952.

Yeon, J. C., Eun, J. K., Zhe, P., Young, C. Y., & Yong, C.S. (2004). Purification and Characterization of Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP and Its Application for the Production of Chitosan Oligosaccharides. **Applied and Environmental Microbiology**. 70(8): 439-446.

Yoon, H. G., Kim, H. Y., Kim, H. K., & Hong, B. S. (2001). Thermostable Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain CK4: Its Purification, Characterization, and Reaction Patterns. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 65(4): 802-809.