ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนส

มานะ ขาวเมฆ[1*]

Received : April 24, 2020
Revised : August 27, 2020
Accepted : August 27, 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนส อายุ 2 สัปดาห์ ด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พบว่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ในช่วง 1.6139-19.8040 ยูนิต/มิลลิกรัม โดยไคติเนสจากก้ามปู มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด รองมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ตามลำดับ พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของไคติเนสที่สกัดจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 มีค่าเท่ากับ 3.5, 4.5, 4.5 และ 3.0 ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของไคติเนสที่สกัดจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 มีค่าเท่ากับ 45, 45, 45 และ 65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของไคติเนสที่สกัดจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ที่ใช้เวลาย่อย 30 นาที มีไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 1-6 ($(GlcNAc)_{1-6}$) และมีโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ เพิ่มขึ้น เมื่อใช้เวลาบ่มเพิ่มเป็น 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ในขณะที่ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ ลดลง โดยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ ($(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$) ที่ใช้เวลาบ่มที่ 30 นาทีของก้ามปูจะมีปริมาณมากที่สุด รองมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ตามลำดับ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา 4 สายพันธุ์ คือ *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Magnaporthe oryzae* และ *Setosphaeria oryzae* ด้วยความเข้มข้น 5-10 ไมโครกรัม

คำสำคัญ: ไคติเนส ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

[1] รองศาสตราจารย์สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

** ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: mana@vru.ac.th*

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CHITOOLIGOSACCHARIDES FROM *SAMANCA SAMAN* (JACQ) MERR., *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* DE WIT, *ORYZA SATIVA* RD. 6 AND *SORGHUM VULGARE* KU 630 PRODUCED BY CHITINASE

Mana Kaomek[1*]

Abstract

This research was aimed to study the antifungal activity of chitooligosaccharides from two weeks seedlings, *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 produced by chitinase with 0.1 molar acetate buffer. The specific activity was 1.6139-19.8040 units/mg. The chitinase from *Samanca saman* (Jacq) Merr. had the highest specific activity and decreased from *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630, respectively. The optimum pH was extracted from *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD.6 and *Sorghum vulgare* KU 630 of 3.5, 4.5, 4.5 and 3.0, respectively. The optimum temperature was extracted from *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 of 45, 45, 45 and 65 °C, respectively. Chitooligosaccharides obtained from the digestion of chitinase which extracted from *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 were used for digestion 30 min that had chitooligosaccharides of 1-6 ($(GlcNAc)_{1-6}$). The small molecules of $(GlcNAc)_2$ and $(GlcNAc)_3$ were increased when the incubation time is increased to 1, 2 and 4 hours, while $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ and $(GlcNAc)_6$ were decreased. The large molecules ($(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ and $(GlcNAc)_6$) of *Samanca saman* (Jacq) Merr. were incubated for 30 minutes that had the highest and *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630, respectively. Chitooligosaccharides obtained from chitinase of *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 were able to inhibit 4 species of *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Magnaporthe oryzae* and *Setosphaeria oryzae* that concentrations of 5-10 micrograms.

Keywords: Chitinase, Chitooligosaccharides, Antifungal

---

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

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

บทนำ

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอโนแซคคาไรด์ตั้งแต่ 2-10 โมเลกุล เชื่อมต่อด้วยพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของเอนอะซิติลดีกลูโคซามีนและกลูโคซามีน ซึ่งเป็นสายน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายไคตินและไคโตซานด้วยปฏิกิริยาเคมีโดยใช้กรดหรือการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่มไคติโนไลติกเช่น ไคติเนสและไคโตซาเนส ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์นำมาใช้เป็นสารยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Baureithel et al., 1994; Shibuya et al., 1993) การต้านโรคไขข้ออักเสบ ลดคอเลสเตอรอลและไขมันในเส้นเลือด ควบคุมการปล่อยตัวยาสำคัญ (Coelho et al., 2010) ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ละลายน้ำได้และมีประสิทธิภาพการดูดซึมดีกว่าไคตินและไคโตซาน ดังนั้น ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จึงมีมูลค่าสูงกว่าไคตินและไคโตซานมาก ไคตินและไคโตซานยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากนักเนื่องจากปกติจะอยู่ในรูปพอลิเมอร์ ดังนั้นต้องมีการเปลี่ยนไคตินที่อยู่ในรูปพอลิเมอร์ให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยไคติเนส ซึ่งพืชหลายชนิดมีไคติเนสที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงจะเปลี่ยนไคตินเป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดี

ไคติเนสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของเอนอะซิติลกลูโคซามีน (GlcNAc) ได้ผลผลิตเป็นเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความยาวต่าง ๆ กัน ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะด้านอุตสาหกรรมการเกษตรใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราและแมลงที่เป็นอันตราย (Chernin et al, 1997)

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของไคติเนสและไคโตซาเนสจากจุลินทรีย์สามารถยับยั้งเชื้อราได้ แต่ไคติเนสจากพืชจะผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ ผู้วิจัยจึงศึกษาผลของไคติเนสจากต้นอ่อนพืช 4 ชนิดคือ ก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 สืบเนื่องจากผลการวิจัยของ พัชราวรรณ ป้องกัน และมานะ ขาวเมฆ (2562) พุธิตา ภูมิคอนสาร และมานะ ขาวเมฆ (2561) พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคติเนสที่สกัดจากต้นออ่อนอายุ 2 สัปดาห์จากก้ามปูและข้าวฟ่าง เคยู 630 มีขนาดโมเลกุลเป็นไคโตไตรโอส $(GlcNAc)_3$, ไคโตเตตระโอส $(GlcNAc)_4$ และ ไคโตเพนโตส$(GlcNAc)_5$ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของมูนและคณะ (Moon et al., 2017) ที่สกัดไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* PRNK-1 เมื่อใช้เวลาในการย่อยคอลลอยไอดอลไคตินช่วงสั้นจะมีปริมาณของไคโตเฮกโซสมากที่สุด รองมาเป็นไคโตเพนโตส และไคโตเตตระโอสตามลำดับ ดังนั้นงานวิจัยจึงมุ่งศึกษาการนำไคติเนสจากต้นอ่อนอายุ 2 สัปดาห์ของพืช 4 ชนิดคือ ก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูง มาย่อยคอลลอยด์ไอดอลไคตินเป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ และศึกษาผลของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ต่อฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยไคติเนสจากต้นอ่อนอายุ 2 สัปดาห์ของก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สกัดไคติเนสจากต้นอ่อนของพืช 4 ชนิด ด้วยวิธีของบอลเลอร์และคณะ (Boller et al., 1983) โดยใช้ต้นอ่อนพืชอายุ 2 สัปดาห์ 10 กรัม บดและเติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และพอลิไวนิลพอลิไพโรลิโดน 5 เปอร์เซ็นต์ ปั่นเหวี่ยงที่ 25,000 g 30 นาที จะได้สารสกัดไคติเนส

2. หาค่ากิจกรรมของไคติเนสด้วยวิธีของบอลเลอร์และคณะ (Boller et al., 1983) โดยนำสารสกัดไคติเนส 200 ไมโครลิตร ผสมกับคอยลอยด์ไอดอลไคตินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (Berger et al., 1958) ในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำของผสมปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายใส 500 ไมโครลิตร มาเติม 0.8 โมลาร์โซเดียมเตตระบอเรต ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 3 นาที เติมสารละลายพาราไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีน

3. หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของเลาว์รีและคณะ (Lowry et al., 1951) โดยนำสารสกัดไคติเนสมา 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 ไมโครลิตร ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 เติมสารละลายผสมคอปเปอร์ซัลเฟต 2.5 มิลลิลิตรเขย่าตั้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ โฟลินปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งไว้ 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน

4. ศึกษาผลของพีเอชต่อการเร่งปฏิกิริยาในช่วง 3.0-10 (ช่วงต่าง 0.5) โดยพีเอช 3.0-6.0 ใช้โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5-8.0 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และพีเอช 8.5-10 ใช้ทริสไฮโดรคลอริก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 20 นาที

5. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30-90 องศาเซลเซียส (ช่วงต่าง 5 องศาเซลเซียส) โดยใช้บัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 และ 90 เป็นเวลา 20 นาที

6. หาปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีของโคกะและคณะ (Koga et al., 1998) โดยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) ดังนี้

6.1 นำสารมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2-6 หน่วย เข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้สารเคลื่อนที่เป็น น้ำ : เมทานอล = 60 : 40

อัตราการไหล 1 มิลลิลิตร/นาที คอลัมน์ Shodex Asahipak NH2P-50 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำพื้นที่พีคและค่าความเข้มข้นสารมาตรฐานสร้างกราฟมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

6.2 นำสารไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้การย่อยของไคติเนสจากพืชทั้ง 4 ชนิดมาวิเคราะห์ด้วย HPLC และหาปริมาณร้อยละโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

7. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยวิธีของทรีพาธีและดูเบย์ (Tripathi et al., 2004) โดยตัดเชื้อราและนำมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน วางกระดาษกรองรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร รอบเชื้อราที่เลี้ยงไว้ 4 จุด โดย C คือ อะซิเตตบัฟเฟอร์ สำหรับ 1, 2 และ 3 คือ COS ข้มข้น 5, 10 และ 15 ไมโครกรัม ตามลำดับ ใช้ C, 1, 2 และ 3 อย่างละ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตการณ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

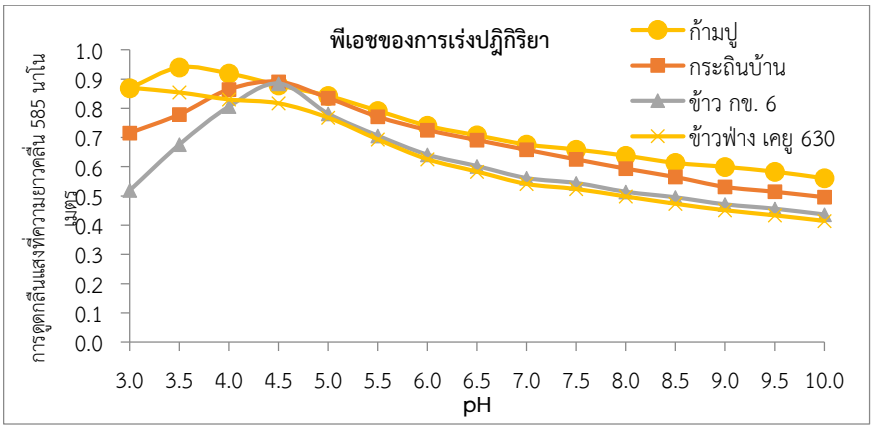
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลการศึกษาค่ากิจกรรมและค่ากิจกรรมจำเพาะของไคติเนส

ผลการศึกษาค่ากิจกรรมของไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ พบว่าค่ากิจกรรม ปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ในระหว่าง 1.9588-19.2687 ยูนิต/มิลลิลิตร 0.1237-14.0220 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 1.6139-19.8040 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีน และกราฟมาตรฐานโปรตีน พบว่าก้ามปูมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดคือ 19.8040 ยูนิต/มิลลิกรัม ส่วนข้าวฟ่าง เคยู 630 มีค่ากิจกรรมจำเพาะน้อยที่สุดคือ 1.6139 ยูนิตมิลลิกรัม พืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะเรียงจากมากไปน้อยคือ ก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 เมื่อเปรียบเทียบไคติเนสที่สกัดได้จากต้นอ่อนก้ามปูและกระถินบ้าน อายุ 2 สัปดาห์มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าจากแหล่งอื่น เช่น ไคติเนสจาก *Bacillus sp.* Strain KCTC0377BP มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 6.9582 ยูนิต/มิลลิกรัม (Senol *et al*., 2014) และไคติเนส จาก *Paenibacillus fukunensis* มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.0122 ยูนิต/มิลลิกรัม (Yong *et al*., 2017) ดังนั้น ไคติเนสจากพืชมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียและเชื้อราบางสายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากไคติเนสจากพืชส่วนใหญ่จะเป็นชนิดภายใน (Endo Type) ที่การสลายพันธะแบบสุ่ม จึงสามารถจับกับโครงสร้างไคตินได้ดีกว่า

2. ผลการศึกษาพีเอชต่อการเร่งปฏิกิริยา

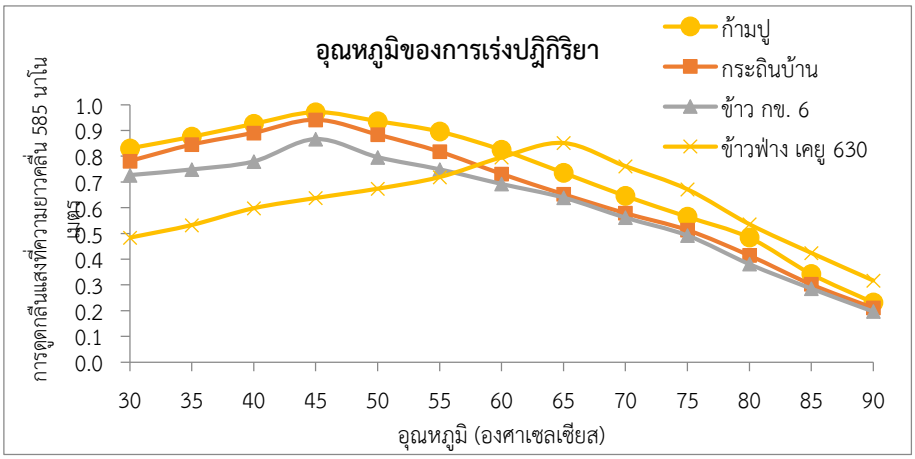
ผลการศึกษาค่าพีเอชต่อการเร่งปฏิกิริยาของไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ในช่วงพีเอช 3.0 ถึง 10.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ไคติเนสจากพืชทั้ง 4 ชนิดสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีที่ในช่วงพีเอช 3.5-4.5 ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กราฟแสดงการเร่งปฏิกิริยาของไคติเนสจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ในช่วง pH 3.0 -10.0

3. ผลการศึกษาระดับอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยา

ผลการศึกษาระดับอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 90 องศาเซลเซียส พบว่า ไคติเนสจากพืชทั้ง 4 ชนิดสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 45-65 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กราฟแสดงการเร่งปฏิกิริยาของไคติเนสจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ในช่วงอุณหภูมิ 30 –90 องศาเซลเซียส

4. ผลการหาปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

เมื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยคอลลอยด์ไอดอลไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยไคติเนสจากต้นก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมงมาวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2–6 โมเลกุล พบว่า ปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นก้ามปูมีเอนอะซิติลกลูโคซามีน (GlcNAc) ไคโตไบโอส $(GlcNAc)_2$ ไคโตไตรโอส $(GlcNAc)_3$ ไคโตเตตระโอส $(GlcNAc)_4$ ไคโตเพนโตส $(GlcNAc)_5$ และไคโตเฮกโซส $(GlcNAc)_6$ ร้อยละ 6.92-18.08, 24.98-40.98, 9.91-16.92, 12.98-25.02, 7.88-18.15 และ 3.15-15.02 ตามลำดับ โดยพบว่ากระถินบ้านมีเอนอะซิติลกลูโคซามีน ไคโตไบโอส ไคโตไตรโอส ไคโตเตตระโอส ไคโตเพนโตส และไคโตเฮกโซสร้อยละ 10.06-16.99, 34.98-44.98, 9.92-17.01, 11.92-20.02, 6.98-15.03 และ 2.11-9.98 ตามลำดับ ข้าว กข. 6 มีเอนอะซิติลกลูโคซามีน ไคโตไบโอส ไคโตไตรโอส ไคโตเตตระโอส ไคโตเพนโตส และไคโตเฮกโซส ร้อยละ 11.92-19.23, 40.77-47.85, 14.92-24.92, 3.92-14.92, 1.92-9.54 และ 2.15-7.92ตามลำดับ และข้าวฟ่าง 630 มีเอนอะซิติลกลูโคซามีน ไคโตไบโอส ไคโตไตรโอส ไคโตเตตระโอส ไคโตเพนโตส และไคโตเฮกโซส ร้อยละ 12.98-21.72, 41.92-50.98, 17.85-22.98, 1.92-11.92, 0.98-7.92 และ 1.40-7.40 ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นพบว่า พืชทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่เป็นปริมาณมากเมื่อใช้เวลาบ่มน้อย และจะลดลงเมื่อใช้เวลาในการบ่มนานขึ้น โดยก้ามปูจะมีร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มากที่สุด รองมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข.6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของมูนและคณะ (Moon *et al*., 2017) ที่สกัดไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* PRNK-1 เมื่อย่อยคอลลอยด์ไอดอลไคตินแล้วหาปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์พบว่า เมื่อใช้เวลาในการบ่มสั้นจะมีปริมาณของไคโตเฮกโซสมากที่สุด รองมาเป็นไคโตเพนโตส และไคโตเตตระโอส ตามลำดับ

5. ผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

เมื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสลายคอลลอยด์ไอดอลไคตินด้วยไคติเนสในระยะเวลาบ่ม 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราพบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 4 สายพันธุ์ คือ *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Magnaporthe oryzae* และ *Setosphaeria oryzae* ที่ความเข้มข้นของไคโอลิโกแซคคาไรด์ 5-10 ไมโครกรัม โดยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสลายคอลลอยด์ไอดอลไคตินด้วยไคติเนสของต้นอ่อนก้ามปูและต้นอ่อนกระถินบ้านยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ร้อยละ 58.87-74.82 และ 50.31-72.91 ตามลำดับ สำหรับไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสลายคอลลอยด์ไอดอลไคตินด้วยไคติเนสจากต้นอ่อนข้าว กข.6 และต้นอ่อนข้าวฟ่าง เคยู 630 ยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม ยกเว้น ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้เวลาบ่ม 4 ชั่วโมง ต้องใช้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ร้อยละ 53.15-75.48 และ 51.22-66.88 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 ถึงตารางที่ 4

ตารางที่ 1 การยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู

เชื้อรา	ระยะเวลาในการบ่ม/ร้อยละการยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปู											
	30 นาที			1 ชั่วโมง			2 ชั่วโมง			4 ชั่วโมง		
	5µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg
Bipolaris oryzae	63.12	68.17	69.24	61.22	65.92	68.67	57.34	61.24	67.89	56.08	59.94	62.48
Curvularia lunata	59.78	61.54	65.71	55.51	59.06	64.19	53.42	56.64	62.23	53.87	56.46	60.21
Magnaporthe oryzae	62.68	65.18	69.26	61.48	64.93	67.24	54.28	61.06	65.87	53.88	59.74	63.81
Setosphaeria oryzae	70.93	72. 19	74.82	67.76	69.51	73.24	62.13	67.76	72.29	62.07	65.71	67.47

ตารางที่ 2 การยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้าน

เชื้อรา	ระยะเวลาในการบ่ม/ร้อยละการยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนกระถินบ้าน											
	30 นาที			1 ชั่วโมง			2 ชั่วโมง			4 ชั่วโมง		
	5µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg
Bipolaris oryzae	62.45	64.71	68.42	59.74	62.31	65.12	50.76	52.67	54.17	50.31	51.26	52.17
Curvularia lunata	57.64	59.48	61.91	54.16	56.04	59.39	52.94	54.43	56.82	51.71	52.17	54.82
Magnaporthe oryzae	58.45	61.17	69.24	57.21	58.92	61.76	54.26	57.71	59.17	53.82	54.28	57.62
Setosphaeria oryzae	69.23	70.95	72.91	66.67	68.14	70.46	61.12	64.37	68.16	60.71	61.17	63.54

ตารางที่ 3 การยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของไคติเนสจากต้นอ่อนข้าว กข.6

เชื้อรา	ระยะเวลาในการบ่ม/ร้อยละการยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนข้าว กข.6											
	30 นาที			1 ชั่วโมง			2 ชั่วโมง			4 ชั่วโมง		
	5µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg
Bipolaris oryzae	64.45	67.71	71.21	62.12	64.49	65.63	59.63	62.91	64.42	0.00	54.17	56.44
Curvularia lunata	58.23	60.49	62.84	54.13	57.16	60.28	51.14	54.16	57.27	0.00	53.15	55.29
Magnaporthe oryzae	65.45	67.31	70.59	60.23	61.21	64.74	57.64	59.81	61.47	0.00	55.29	57.15
Setosphaeria oryzae	67.32	72.54	75.48	61.73	63.75	66.61	58.17	59.17	62.62	0.00	59.42	61.73

ตารางที่ 4 การยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์ต่าง ๆ ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของไคติเนสจากต้นอ่อนข้าวฟ่าง เคยู 630

เชื้อรา	ระยะเวลาในการบ่ม/ร้อยละการยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนข้าวฟ่าง เคยู 630											
	30 นาที			1 ชั่วโมง			2 ชั่วโมง			4 ชั่วโมง		
	5µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg	5 µg	10 µg	15 µg
Bipolaris oryzae	61.88	63.73	66.88	58.06	61.61	64.38	55.37	57.35	61.87	0.00	56.13	59.64
Curvularia lunata	56.65	58.58	61.53	54.54	55.64	60.32	51.15	54.27	57.42	0.00	51.22	54.84
Magnaporthe oryzae	59.22	61.32	65.32	58.33	59.13	62.68	55.64	59.12	61.64	0.00	53.35	57.44
Setosphaeria oryzae	57.32	59.70	61.65	55.22	56.18	61.33	53.14	56.23	57.92	0.00	53.18	57.68

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากแหล่งที่แตกต่างกัน ผลการยับยั้งเชื้อราที่ใช้ทดสอบจะแตกต่างกันตามชนิดของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคติเนสที่สกัดจากต้นก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการบ่ม 30 นาที จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ของไคโตเพนโตสและไคโตเฮกโซสมากกว่าเวลาในการบ่ม 1, 2 และ 4 ชั่วโมง จึงยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของลิเวนส์ (Lievens et al., 2009) ที่พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โมเลกุลขนาดใหญ่ที่เป็นไคโตเฮกโซสและไคโตเฮปโตสจะมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา เนื่องจากไคโตเฮกโซสและไคโตเฮปโตสซึ่งมีประจุบวกจะจับกับผนังเซลล์ของเชื้อราที่มีประจุลบได้ดี

สรุป

1. ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะอยู่ในช่วง 1.6139-19.8040 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยไคติเนสจากก้ามปูมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด รองมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ตามลำดับ

2. พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับ 3.5, 4.5, 4.5 และ 3.0 ตามลำดับ

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับ 45, 45, 45 และ 65 องศาเซลเซียส

4. ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาย่อย 30 นาที จะมีไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 1-6 ($(GlcN)_{1-5}$) และมีโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcN)_2$ และ $(GlcN)_3$ เพิ่มขึ้น เมื่อใช้เวลาบ่มเพิ่มเป็น 1, 2 และ 4

ชั่วโมง ในขณะที่ $(GlcN)_4$, $(GlcN)_5$ และ $(GlcN)_6$ ลดลง โดยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ ($(GlcN)_4$, $(GlcN)_5$ และ $(GlcN)_6$) ที่ใช้เวลาบ่มที่น้อยของก้ามปูจะมีมากที่สุด รองมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ตามลำดับ

5. ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งเป็นไคโตเฮกโซสและไคโตเฮปโตสจะมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา

ข้อเสนอแนะ

นำผลิตผลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดต่าง ๆ ไปประยุกต์ใช้ในเครื่องสำอาง การเร่งการเจริญเติบโตของพืช และใช้ในการผสมอาหารบางชนิด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์ของศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ และทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

เอกสารอ้างอิง

พัชราวรรณ ป้องกัน, และมานะ ขาวเมฆ. (2562). **รูปแบบและฤทธิ์การต้านเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยไคติเนสจากข้าวฟ่าง เคยู 630.** การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 7 บูรณาการ วิจัย และนวัตกรรม เพื่อสร้างเสริมสุขภาพ. 7 มิถุนายน 2562. หน้า 704-711.

พุธิตา ภูมิสาคร, และมานะ ขาวเมฆ. (2561). **การประเมินคุณลักษณะและกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู**. การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏกลุ่มศรีอยุธยา ครั้งที่ 9 วิจัยและนวัตกรรมเพื่อสังคม. 18-19 ตุลาคม 2561. หน้า 472-479.

Baureithel, K., Felix, G. & Boller, T. (1994). Specific, High Affinity Binding of Chitin Fragments Tomato Cells and Membranes, Competitive Inhibition of Binding by Derivatives of Chitooligosaccharides and a Nod Factor of Rhizobium. **Journal of Biological Chemistry**. 269(27), 17931-17938.

Berger, L. R. & Reynold, D. M. (1958). The Chitinase System of a Strain of Griseus. **Biochimica et Biophysica Acta.** 29(3), 522–534.

Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. & Vogeli, U. (1983). Chitinase in Bean Leaves: Induction by Ethylene, Purification, Properties and Possible Function. **Planta.** 157, 22-31.

Chernin, L. S., Fuente, L. D., Sobolev, L. V., Haran, S., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B. & Chet, I. (1997). Molecular Cloning, Structural Analysis, and Expression in *Escherichia coli* of a Chitinase Gene from *Enterobacter Agglomerans*. **Applied and Environmental Microbiology**. 63 (3), 834–839.

Coelho, J. F., Ferreira, P. C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A. C., Gois, J.R. & Gill, M. H. (2010). Drug Delivery System: Advanced Technologies Potentially Applicable in Personalized Treatments. **EPMA Journal.** 1(1), 164-209.

Koga, D., Yoshioka, T. & Arakane, Y. (1998). HPLC Analysis of Anomeric Formation and Cleavage Pattern by Chitinolytic Enzyme. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** 62(8), 1643-1646.

Lievens, B., Houterman, P. M. & Rep, M. (2009). Effector Gene Screening Allows Unambiguous Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici Races and Discrimination from other Formae Specials. **FEMS Microbiology Letters**. 300(2), 201–215.

Lowry, O. H., Rosebrougly, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry.** 193, 256-257.

Moon, C., Seo, D. J., Song, Y. S., Hong, S. H., Choi, S. H. & Jung, W. J. (2017). Antifungal Activity and Patterns of N-acetyl-chitooligosaccharide Degradation via Chitinase Produced from *Serratia marcescens* PRNK-1. **Microbial Pathogenesis**. 113, 218–224.

Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N. & Kotan, R. (2014.) Purification of Chitinase enzymes from *Bacillus subtilis* Bacteria TV-125, Investigation of Kinetic Properties and Antifungal Activity against *Fusarium culmorum*. **Analytical of Clinical Microbiology and Antimicrobials.** 13(1), 3-41.

Shibuya, N., Kaku, H., Kuchitsu, K. & Maliarik, M. J. (1993). Identification of a Novel High-Affinity Binding Site for N-acetylchitooligosaccharide Elicitor in the Plasma Membrane Fraction from Suspension-Cultured Rice Cells. **Federation of European Biochemical Societies**. 329, 75–78.

Tripathi, P. & Dubey, N. K. (2004). Evaluation of some Essential Oils as Botanical Fungitixicants in Management of Post-harvest Rotting of Citrus Fruits World. **Journal of Microbiology and Biotechnology.** 20, 317-321.

Yong, H, K., Seur, K. P., Jin, Y. H. & Young, C. K. (2017). Purification and Characterization of a Major Extracellular Chitinase from a Biocontrol Bacterium, *Paenibacillus elgii* HOA73. **The Plant Pathology Journal.** 33(3), 318-328.