

ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคโตซานสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู

มานะ ขาวเมฆ^{1*}

Received : April 29, 2022

Revised : August 26, 2022

Accepted : August 30, 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคโตซานสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ด้วยอะซิเตดบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5 พบว่า ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคโตซานสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูที่ใช้เวลาย่อย 0.5 ชั่วโมง มีปริมาณร้อยละรวมโมเลกุลขนาดใหญ่ของ (GlcN)₈, (GlcN)₇, (GlcN)₆, (GlcN)₅ และ (GlcN)₄ เท่ากับ 94.56 จะมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium salani*, *Phytophthora parasitica* และ *Sclerotium rolfsii* ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาย่อย 1 ชั่วโมง จะมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราได้ดีทั้ง 4 สายพันธุ์ ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

คำสำคัญ: ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ ต้นอ่อนก้ามปู ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา เอนไซม์ไคโตซานส

¹ รองศาสตราจารย์สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี อีเมล: mana@vru.ac.th

* ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล: mana@vru.ac.th

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CHITOSAN OLIGOSACCHARIDES PRODUCED BY CHITOSANASE EXTRACTED FROM SEEDLINGS OF *SAMANCA SAMAN* (JACQ) MERR.

Mana Kaomek^{1*}

Abstract

This research aimed to study the antifungal activity of chitosan oligosaccharides produced by chitosanase extracted from two weeks seedlings of *Samanca saman* (Jacq) Merr. with 0.1 molar acetate buffer at pH 4.5. It was found that the chitosan oligosaccharides obtained by hydrolysis of 1 percent by weight per volume of chitosan at 0.5 hour containing a percentage of total large molecules of (GlcN)₈, (GlcN)₇, (GlcN)₆, (GlcN)₅, and (GlcN)₄ at 94.56 was most effective at completely (100 percent) inhibiting the growth of all four strains of fungi were *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium salani*, *Phytophthora parasitica* and *Sclerotium rolfsii* at a concentration of 5 mg/ml while chitosan oligosaccharides from the incubation time at 1 hour were effective at completely inhibiting the growth of all four strains at a concentration of 10 mg/ml.

Keywords: Chitosan oligosaccharides, *Samanca saman* (Jacq) Merr. Seedlings, Antifungal activity, Chitosanase

¹ Associate Professor of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under the Royal Patronage, e-mail: mana@vru.ac.th

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

บทนำ

เอนไซม์ไคโตซานเนสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของไคโตซานด้วยน้ำ ได้ผลิตผลเป็นกลูโคซามีน (GlcN) และไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ของกลูโคซามีนขนาด 2-10 โมเลกุล ((GlcN)₂ - (GlcN)₁₀) เอนไซม์ไคโตซานเนสพบได้ในสิ่งมีชีวิตจำพวกยีสต์ เชื้อรา แบคทีเรีย และพืช (Xiayun et al., 2012) และมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไคโตซานเนสในด้านอุตสาหกรรมการเกษตรและเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น ใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย เชื้อรา และแมลง (Chernin et al., 1997) เอนไซม์ไคโตซานเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด จากการสกัดเอนไซม์ไคโตซานเนสของพืชไทยจำนวน 32 ชนิด (มานะ ขาวเมฆ, 2562ก)

ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอแซคคาไรด์ของกลูโคซามีนตั้งแต่ 2-10 โมเลกุล เชื่อมต่อดัวยพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของกลูโคซามีนและกลูโคซามีน ซึ่งเป็นสายน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยสลายไคโตซานด้วยปฏิกิริยาเคมีโดยใช้กรดหรือการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคโตซานเนส ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์นำมาใช้เป็นสารลดคอเลสเตอรอลและไขมันในเส้นเลือด ควบคุมการปล่อยตัวยาสำคัญ และสารต้านโรคไขข้ออักเสบ (Coelho et al., 2010) ใช้เป็นสารยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา (Baureithel et al., 1994; Shibuya et al., 1993) ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ละลายน้ำได้ดีและมีประสิทธิภาพการดูดซึมดีกว่าไคโตซาน ดังนั้น ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์จึงมีมูลค่าสูงกว่าไคโตซานมาก ไคโตซานยังไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากนักเนื่องจากปกติจะอยู่ในรูปพอลิเมอร์ ดังนั้นต้องมีการเปลี่ยนไคโตซานที่อยู่ในรูปพอลิเมอร์ให้เป็นไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไคโตซานเนส ซึ่งพืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโตซานเนสสูงจะเปลี่ยนไคโตซานเป็นไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดี

ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคโตซานเนสจากพืชสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดี เช่น งานวิจัยของ Lievens et al. (2009) ศึกษาการยับยั้งเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* ที่ก่อโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ พบว่า ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดี นอกจากนี้ไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ยังสามารถต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดี เช่น งานวิจัยของมานะ ขาวเมฆ (2562ข) ศึกษาการย่อยไคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์ไคโตซานเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง จะมีไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์โมเลกุลขนาดใหญ่ของไคโตเตโตรส ((GlcN)₄) ไคโตเพนโตส ((GlcN)₅) และไคโตเฮกซอส ((GlcN)₆) มากกว่าโมเลกุลขนาดเล็กของกลูโคซามีน ((GlcN)₁) ไคโตไบโอส ((GlcN)₂) และไคโตไตรโอส ((GlcN)₃) โดยมีไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ของกลูโคซามีน ไคโตไบโอส ไคโตไตรโอส ไคโตเตโตรส ไคโตเพนโตส และไคโตเฮกซอส ร้อยละ 3.41, 18.11, 10.03, 22.64, 20.17 และ 25.64 ตามลำดับ และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐานบิวทิลไฮดรอกซีโทลูอิน (BHT) โดยมีค่า EC₅₀ ของไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์เท่ากับ 11.75 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าค่า EC₅₀ ของสารมาตรฐาน BHT ที่มีค่าเท่ากับ 16.60 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และจากงานวิจัยของมานะ ขาวเมฆ (2563) ศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ

โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์โคโตซานสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ พบว่าโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ใช้เวลา 0.5 ชั่วโมง มีปริมาณร้อยละรวมโมเลกุลขนาดใหญ่ของ (GlcN)₄, (GlcN)₅, (GlcN)₆, (GlcN)₇ และ (GlcN)₈ เท่ากับ 94.99 จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ดีที่สุดทั้ง 8 สายพันธุ์คือ แบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วย *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบประกอบด้วย *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Vibrio parahaemolyticus* โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 0.39/0.39, 0.78/0.78, 0.39/0.39, 0.39/0.39, 0.39/0.78, 0.39/0.39, 0.78/1.56/ และ 0.78/0.78 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากงานวิจัยของ Yamada et al. (1993) พบว่าโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาด 6-8 หน่วยสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่ความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และจากงานวิจัยของ Aziz et al. (2006) ศึกษาการยับยั้งเชื้อราของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์สามารถยับยั้งเชื้อรา *Plasmopara viticola* และ *Botrytis cinerea* ด้วยความเข้มข้น 200 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจนำโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์โคโตซานสที่ผลิตจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูง ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและต้านอนุมูลอิสระได้ดีมาใช้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์โคโตซานสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สกัดเอนไซม์โคโตซานสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ด้วยวิธีของ Pillai et al. (2009) โดยชั่งต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ น้ำหนัก 10 กรัม ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ บดให้ละเอียดและเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์เข้มข้น 0.017 กรัม และพอลิไวนิลพอลิไพโรลิโดน 0.5 กรัม ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 25,000 g เป็นเวลา 30 นาที จะได้สารสกัดเอนไซม์โคโตซานส

2. หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โคโตซานสด้วยวิธีของ Tolaimate et al. (2003) โดยปิเปตสารสกัดเอนไซม์โคโตซานส 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายโคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำของผสมมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 3 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ Schales' Reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดเป็นเวลา 15 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคซามีน (1 หน่วยเอนไซม์ (Unit) เท่ากับ 1 ไมโครโมลกลูโคซามีนต่อเวลา 1 นาทีต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ทำ 3 ซ้ำ

3. หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry et al. (1951) โดยปิเปตสารสกัดเอนไซม์โคโตซานเอส 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 เติมสารละลายผสมคอปเปอร์ซัลเฟต 2.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งไว้ 10 นาที เติมสารละลายโพลีนเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งไว้ 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin; BSA) ทำ 3 ซ้ำ

4. เตรียมโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีของ Miller (1959) โดยผสมโคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 800 ไมโครลิตรกับสารสกัดเอนไซม์โคโตซานเอส 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมงนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที และนำของผสมปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ ทำ 3 ซ้ำ

5. หาปริมาณร้อยละของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ (COS) ด้วยวิธีของ Koga et al. (1998) โดยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC)

5.1 นำสารมาตรฐานกลูโคซามีนและโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2-8 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 นำพื้นที่ใต้พีคและค่าความเข้มข้นสารมาตรฐานกลูโคซามีนและโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์สร้างกราฟมาตรฐาน ทำ 3 ซ้ำ

5.2 นำสารโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้รับการย่อยของเอนไซม์โคโตซานเอส มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และหาปริมาณร้อยละโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ ทำ 3 ซ้ำ

6. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยวิธีของ Harsha et al. (2014) โดยเตรียมอาหาร PDA แล้วผสมโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการบ่ม 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง ในอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้น 1.25, 2.50, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นำชิ้นวุ้นที่ได้จากการใช้ Cork Borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยรอบโคโลนีเชื้อราก่อโรคพืช 4 สายพันธุ์ คือ *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium salani*, *Phytophthora parasitica* และ *Sclerotium rolfsii* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ที่มีอายุ 7 วัน วางลงบนผิวหน้าอาหารที่ผสมโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ ตรวจสอบโดยวัดรัศมีของโคโลนีเชื้อราในงานทดสอบและงานควบคุม คำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใย (% Inhibition) จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{R1-R2}{R1} \times 100$$

โดย R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในงานควบคุม

โดย R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในงานทดสอบ

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าสถิติความแปรปรวน (ANOVA) หาค่า F-test เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมทางสถิติ

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โคโตซานเนส

เอนไซม์โคโตซานเนสที่สกัดจากต้นอ้อแกมปูอายุ 2 สัปดาห์ ด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตดบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 22.7649 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.9219 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อนำค่ากิจกรรมและปริมาณโปรตีนมาคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โคโตซานเนสมีค่าเท่ากับ 24.6935 ยูนิต/มิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โคโตซานเนสจากต้นอ้อแกมปูอายุ 2 สัปดาห์ มีค่าสูงกว่าเอนไซม์โคโตซานเนสจากแหล่งอื่นๆ เช่น เอนไซม์โคโตซานเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Strain CK4 มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.8076 ยูนิต/มิลลิกรัม (Yoon et al., 2001) เอนไซม์โคโตซานเนสจากแบคทีเรีย *Paenibacillus fukunensis* มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1.08 ยูนิต/มิลลิกรัม (Kimoto et al., 2007) และเอนไซม์โคโตซานเนสจาก *Bacillus* sp. Strain KCTC 0377BP มีค่ากิจกรรมจำเพาะ 0.9010 ยูนิต/มิลลิกรัม (Yeon, et al., 2004) ดังนั้น เอนไซม์โคโตซานเนสจากพืชมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์โคโตซานเนสจากแบคทีเรียและเชื้อรา เนื่องจากเอนไซม์โคโตซานเนสจากพืชส่วนใหญ่จะเป็นชนิดภายในที่เอนไซม์มีการตัดพันธะเบตา 1,4 ของโคโตซานได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เป็นโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่หลากหลาย จึงสามารถจับกับโครงสร้างโคโตซานได้ดีกว่า

2. การหาปริมาณร้อยละของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์

โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยเอนไซม์โคโตซานเนสที่สกัดจากต้นอ้อแกมปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5, 1, 2 และ 4 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่อง HPLC และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคซามินและโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2-8 โมเลกุล พบว่า ปริมาณของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยในช่วงเวลา 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มีกลูโคซามิน (GlcN)₁ โคโตไบโอส (GlcN)₂ โคโตไตรออส (GlcN)₃ โคโตเตตราออส (GlcN)₄ โคโตเพนโตส (GlcN)₅ โคโตเฮกโซส (GlcN)₆ โคโตเฮปโตส (GlcN)₇ และโคโตออกโตส (GlcN)₈ ร้อยละ 1.18-27.36, 1.49-26.07, 2.27-24.21, 1.97-7.01, 2.88-9.14, 3.45-23.16, 4.02-26.14 และ 6.04-29.11 ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 โดยปริมาณของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ (GlcN)₈, (GlcN)₇, (GlcN)₆, (GlcN)₅ และ (GlcN)₄ เมื่อใช้เวลาในการย่อยน้อย (0.5 ชั่วโมง) จะมีปริมาณมาก คือ 29.11, 26.14, 23.16, 9.14 และ 7.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จะลดลงเมื่อใช้เวลาในการย่อยมากขึ้น ในขณะที่โมเลกุลขนาดเล็กของ (GlcN)₃, (GlcN)₂ และ (GlcN)₁ เพิ่มขึ้น เมื่อนำปริมาณร้อยละของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ (GlcN)₈, (GlcN)₇, (GlcN)₆, (GlcN)₅ และ (GlcN)₄ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง รวมกันจะได้เท่ากับ 94.56 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yan et al. (2007) สกัดเอนไซม์โคโตซานเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas* CUY8 แล้วนำมาย่อยโคโตซานด้วยเวลา 0.5 ชั่วโมง พบว่า จะมีปริมาณของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ (GlcN)₈, (GlcN)₇ และ (GlcN)₆ มาก

เอนไซม์โคโตซานเนสที่สกัดจากต้นอ้อแกมปูอายุ 2 สัปดาห์เป็นแบบชนิดภายในที่มีการตัดพันธะเบตา 1,4 ของโมเลกุลโคโตซานได้เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ของ (GlcN)₈, (GlcN)₇, (GlcN)₆,

(GlcN)₅ และ (GlcN)₄ และเมื่อเพิ่มเวลาในการย่อยมากขึ้น ทำให้เอนไซม์โคโตซานสลาย (GlcN)₈ ไปเป็น (GlcN)₇ กับ (GlcN)₁, (GlcN)₆ กับ (GlcN)₂, (GlcN)₅ กับ (GlcN)₃, (GlcN)₄ กับ (GlcN)₄ โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ของ (GlcN)₇ ถูกย่อยเป็น (GlcN)₆ กับ (GlcN)₁, (GlcN)₅ กับ (GlcN)₂, (GlcN)₄ กับ (GlcN)₃ โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ของ (GlcN)₅ ถูกย่อยเป็น (GlcN)₄ กับ (GlcN)₁, (GlcN)₃ กับ (GlcN)₂, โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ของ (GlcN)₄ ถูกย่อยเป็น (GlcN)₃ กับ (GlcN)₁, (GlcN)₂ กับ (GlcN)₂

ตารางที่ 1 ปริมาณร้อยละของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดที่ได้จากการย่อยโคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร กับเอนไซม์โคโตซานสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้ระยะเวลาในการย่อยต่างกัน

เวลาที่ใช้ ย่อย (ชั่วโมง)	ปริมาณร้อยละของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์							
	(GlcN) ₁	(GlcN) ₂	(GlcN) ₃	(GlcN) ₄	(GlcN) ₅	(GlcN) ₆	(GlcN) ₇	(GlcN) ₈
0.5	1.18±0.01	1.49±0.02	2.27±0.01	7.01±0.03	9.14±0.02	23.16±0.01	26.14±0.02	29.11±0.01
1	13.83±0.02	11.99±0.01	10.01±0.02	6.09±0.02	8.54±0.03	14.11±0.02	15.21±0.01	19.22±0.03
2	25.71±0.03	22.29±0.02	16.34±0.03	3.24±0.01	4.98±0.01	6.59±0.02	8.98±0.03	9.87±0.02
4	27.36±0.02	26.07±0.03	24.21±0.02	1.97±0.01	2.88±0.02	3.45±0.03	4.02±0.03	6.04±0.02

3. ผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

เมื่อนำโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรด้วยเอนไซม์โคโตซานสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้ระยะเวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา พบว่า โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม และโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการย่อย 1 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *C. gloeosporioides*, *F. salani*, *P. parasitica* และ *S. rolfii* ร้อยละ 100 สำหรับโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides*, *F. salani*, *P. parasitica* และ *S. rolfii* ได้ร้อยละ 73.40-100, 75.60-100, 70.40-100 และ 72.60-100 ตามลำดับ โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการย่อย 1 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides*, *F. salani*, *P. parasitica* และ *S. rolfii* ได้ร้อยละ 54.40-100, 56.40-100, 51.80-100 และ 52.60-100 ตามลำดับ โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการย่อย 2 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides*, *F. salani*, *P. parasitica* และ *S. rolfii* ได้ร้อยละ 35.80-72.40, 37.40-74.00, 33.40-70.80 และ 34.00-71.40 ตามลำดับ และโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาในการย่อย 4 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides*, *F. salani*, *P. parasitica* และ *S. rolfii* ได้ร้อยละ 33.80-65.80, 35.40-68.40, 32.80-61.00 และ 32.80-63.80 ตามลำดับ

ดังตารางที่ 2 สารละลายบัฟเฟอร์ในจานควบคุมไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งเชื้อราของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์โคโตซานเอสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์

เวลาที่ใช้อยู่ (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น ของ COS (mg/ml)	ร้อยละการยับยั้งเชื้อรา			
		<i>C. gloeosporioides</i>	<i>F. salani</i>	<i>P. parasitica</i>	<i>S. rolfsii</i>
0.5	1.25	73.40±0.01	75.60±0.01	70.40±0.01	72.60±0.01
	2.5	93.00±0.02	96.80±0.03	90.80±0.03	91.80±0.02
	5	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
	10	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
1	1.25	54.40±0.01	56.40±0.02	51.80±0.01	52.40±0.01
	2.5	65.60±0.01	68.80±0.02	61.80±0.01	64.40±0.02
	5	85.40±0.02	89.80±0.01	82.40±0.02	83.40±0.02
	10	100±0.00	100±0.00	100±0.00	100±0.00
2	1.25	35.80±0.02	37.40±0.01	33.40±0.01	34.00±0.01
	2.5	41.40±0.02	43.40±0.02	39.40±0.02	40.80±0.3
	5	50.00±0.01	52.80±0.02	48.40±0.02	48.80±0.02
	10	72.40±0.01	74.00±0.03	70.80±0.02	71.40±0.01
4	1.25	33.80±0.03	35.40±0.02	32.80±0.03	32.80±0.01
	2.5	39.80±0.01	41.80±0.01	37.40±0.02	39.00±0.02
	5	47.40±0.01	49.80±0.01	45.80±0.02	46.40±0.02
	10	65.80±0.02	68.40±0.02	61.00±0.01	63.80±0.01

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากแหล่งที่ต่างกัน ผลการยับยั้งเชื้อราที่ใช้ทดสอบจะแตกต่างกันตามชนิดของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์จากโคโตซานเอสที่สกัดจากต้นก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่ของโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ของโคโตออกโตส โคโตเฮปโตส โคโตเฮกโซส และโคโตเพนโตส มากกว่าเวลาในการย่อย 1, 2 และ 4 ชั่วโมง จึงยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lievens et al. (2009) ที่พบว่า โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์โมเลกุลขนาดใหญ่ที่เป็นโคโตเฮปโตสและโคโตเฮกโซสจะมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา เนื่องจากโมเลกุลขนาดใหญ่ของโคโตเฮปโตสและโคโตเฮกโซสซึ่งมีกลุ่มของอะมิโน (Amino Group) ที่เป็นประจุบวกจะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ ดีเอ็นเอ เอ็มอาร์เอ็นเอ

และเส้นใยของเชื้อราที่มีประจุเป็นลบ ทำให้สารในเซลล์ของเชื้อราไหลออกมาภายนอก เชื้อราก็ไม่สามารถเจริญเติบโตได้และจะตายในที่สุด (Hadwiger & Loschke, 1981; Leuba & Stossel, 1986)

สรุป

โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยโคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรด้วยเอนไซม์โคโตซานเนส ที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูที่มีอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาในการย่อย 0.5 ชั่วโมง จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่ของ (GlcN)₈, (GlcN)₇, (GlcN)₆, (GlcN)₅ และ (GlcN)₄ มากกว่าโมเลกุลขนาดเล็กของ (GlcN)₃, (GlcN)₂ และ (GlcN)₁ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *C. gloeosporioides*, *F. salani*, *P. parasitica* และ *S. rolfsii* ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้เวลาในการย่อย 1 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *C. gloeosporioides*, *F. salani*, *P. parasitica* และ *S. rolfsii* ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม และโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดีกว่าโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก โดยโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ (GlcN)₈, (GlcN)₇, (GlcN)₆ และ (GlcN)₅ สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด โคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์โมเลกุลขนาดใหญ่ซึ่งเป็นโคโตออกโตส โคโตเฮปโตส โคโตเฮกโซส และโคโตเพนโตสจะมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา

ข้อเสนอแนะ

นำผลผลิตโคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของโคโตออกโตส โคโตเฮปโตส โคโตเฮกโซส และโคโตเพนโตสไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคของพืช

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์ของศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ และทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

เอกสารอ้างอิง

มานะ ขาวเมฆ. (2562). การตรวจหา คุณลักษณะ และการยับยั้งเชื้อราของโคโตซานจากพืชไทย. วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 14(1), 1-10.

- มานะ ขาวเมฆ. (2562). การต้านอนุมูลอิสระของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยโคโตซานจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข.6 และข้าวฟ่าง เคว 630. **วารสารวิจัยและพัฒนาวลัยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 14(3), 62-71.
- มานะ ขาวเมฆ. (2563).ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของโคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคว 630 ที่ผลิตโดยเอนไซม์โคติเนส. **วารสารวิจัยและพัฒนาวลัยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี**, 15(2), 119-130.
- Aziz, A., Trostel-Aziz, P., Dhucq, L., Jeandet, P., Couderchet, M., & Vernet, G. (2006). Chitosan Oligomers and Copper Sulfate Induce Grapevine Defense Reactions and Resistance to Gray Mold and Downy Mildew. **Phytopathology**, 96(11), 1188-1194.
- 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.
- 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.
- Harsha, T. S., Prashanth, M. S., Sandeepa, K. H., Sharath H. V. & Prashith, K. T. R. (2014). Antifungal Activity of Leaf Extract of Three Citrus Plants against *Colletotrichum capsici*. **Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation**, 3(4), 368-370.
- Hadwiger, L. A. & Loschke, D. C. (1981). Molecular Communication in Host-parasite Interactions: Hexosamine Polymers (Chitosan) as Regulator Compounds in Race-specific and other Interactions. **Phytopathology**, 71, 756-762.
- Kimoto, H., Kusaoke, H., Yamamoto, I., Fujii, Y., Onodera, T. & Takketo, A. (2002). Biochemical and Genetic Properties of *Paenibacillus* Glycosyl Hydrolase Having Chitosanase Activity and Discoidin Domain. **The Journal of Biological Chemistry**, 277(17), 14695-14702.
- 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.

- Leuba, J. L. & Stossel, P. (1986). **Chitosan and other Polyamines: Antifungal Activity and Interaction with Biological membranes**. Pages 215-222 in: Chitin in Nature and Technology. Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. & Gooday, G. W. eds. Plenum Press, New York.
- 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., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193, 256-257.
- Miller, G. C. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Estimation of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, 31, 426-428.
- 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.
- 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.
- 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.
- Xiayun, J., Chen, D., & Chen, L. (2012). Purification, Characterization and Action Mode of a Chitosanase from *Streptomyces roseolus* Induced by Chitin. **Journal of Carbohydrate Polymers**, 121, 1-9.
- Yamada, A., Shibuya, N. & Kodama, O. (1993). Induction of Phytoalexin Formation in Suspension-cultured Rice by N-Acetyl-Chitooligosaccharides. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 57(3), 405-409.
- Yan, W., Peigen, Z., Jianxing, Y., Xiaorong, P., Pingping, W., Weiqing, L. & Shendan, T. (2007). Antimicrobial Effect of Chitooligosaccharides Produced by Chitosanase from *Pseudomonas* CUY8. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, 16(1), 174-177.
- 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.C., Kim, H. Y., Kim, H. K., Hong, B. S., Shin, D. H. & Cho, H. Y. (2001). Thermostable Chitosanase from *Bacillus* sp. Strain CK4: Its Purification, Characterization and Reaction Patterns. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 65(4), 802-809.