ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนพืช

Antifungal Activity of Chitinase from Seedlings of Plants

ปรานอม ขาวเมฆ[1] และมานะ ขาวเมฆ[2*]

Pranorm Khaomek[1] and Mana Kaomek[2*]

[1]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต

[2]คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ผู้นิพนธ์หลัก (Corresponding Author) E-mail: mana@vru.ac.th

Received: May 28,2022 Revised: June 14,2022 Accepted: June 24,2022

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไคติเนสเป็นเอนไซม์ย่อยพันธะเบตา 1,4 ไกโคซิดิกของไคติน เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดแต่เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากพืชมีความสามารถในการย่อยไคตินได้ดี เช่น เอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ที่สกัดด้วยอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พบว่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 10.8981, 9.7842, 8.3487 และ 7.4132 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ โดยเอนไซม์ไคติเนสจากก้ามปูมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด รองมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้างฟ่าง เคยู 630 ตามลำดับ เอนไซม์ไคติเนสจากก้ามปูมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดทั้ง 6 สายพันธุ์คือ *Fusarium moniliforme, Geotrichum candidum, Mucor rouxii*, *Penicillium marneffei*, *Sporotrichum pulverulentum* และ *Trichoderma reesei* ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เอนไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราได้ดีทั้ง 6 สายพันธุ์ ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.0 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อรา, เอนไซม์ไคติเนส, ต้นอ่อนพืช

Abstract

Chitinase was enzyme that hydrolyze the β-1 ,4 glycosidics bond of chitin. Chitinase was found in many living organisms. However, chitinase extracted from plants had good ability to digest chitin, such as chitinase from *Samanca saman* (Jacq) Merr.,

Leucaena leucocephala de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630. Therefore, this research was to study the antifungal activity of chitinase from seedlings of *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 of two weeks seedlings with extracted of 0.1 molar acetate buffer. It was found that specific enzyme activity of 10.8981, 9.7842, 8.3487 and 7.4132, U/mg were observed in *Samanca saman* (Jacq) Merr., *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630, respectively. The chitinase from *Samanca saman* (Jacq) Merr. had the highest specific activity, followed by *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630, respectively. The chitinase from *Samanca saman* (Jacq) Merr. had the most effective, completely inhibiting the growth of all six strains including *Fusarium moniliforme, Geotrichum candidum, Mucor rouxii, Penicillium marneffei, Sporotrichum pulverulentum* and *Trichoderma reesei* at a concentration of 0.25 μg/μl. The chitinase from *Leucaena leucocephala* de wit, *Oryza sativa* RD. 6 and *Sorghum vulgare* KU 630 effectively inhibited the growth of all six strains at a concentration of 0.5, 1.0 and 1.0 μg/μl, respectively.

Keywords: Antifungal Activity, Chitinase, Plants seedlings

บทนำ

เอนไซม์ไคติเนสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิก (β-1,4-glycosidic) ของไคตินด้วยน้ำได้ผลผลิตเป็นเอนอะซิติลกลูโคซามีน (N-Acetylglucosamine, GlcNAc) และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Chitooligosacharide) ที่มีความยาวขนาด 2-10 โมเลกุล เอนไซม์ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ มีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพและด้านอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น ใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย เชื้อรา และแมลง (Chernin et al, 1997) เอนไซม์ไคติเนสแบ่งเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการย่อยไคติน คือ เอกโซไคติเนส (Exochitinase) และเอนโดไคติเนส (Endochitinase) (Bade & Hickey, 1988) ซึ่งจะย่อยพันธะไกลโคซิดิกที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และคาร์บอนตำแหน่งที่ 4ของโมเลกุลเอนอะซิติลกลูโคซามีนที่อยู่ติดกัน โดยเอกโซไคติเนสจะย่อยสายไคตินทางด้านปลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นไคโตไบโอส (Chitobiose) ส่วนเอนโดไคติเนสจะย่อยพันธะไกลโคซิดิกภายในของไคติน (Jeuniaux, 1966) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิด คือ ไคโตไบโอส (Chitobiose) ไคโตไตรโอส (Chitotriose) หรือ ไคโตเตโตรส (Chitotetrose) (Roberts &

Selitrennikoff, 1988; Bassler et.al., 1991; Matic et al., 2014) เอนโดไคติเนสสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี เพราะจะจับกับไคตินที่ผนังเซลล์เชื้อราได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไคติเนสที่ได้จากพืชมีขนาดอยู่ในช่วงน้ำหนัก 25-40 กิโลดาลตัน (Malik, 2019)

จากรายงานการวิจัยเชื้อราที่เป็นศัตรูพืชและก่อให้เกิดปัญหาต่อการเกษตรกรรมของประเทศไทย มีทั้งความเสียหายต่อผลผลิตและการปนเปื้อนของสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดเชื้อรา ซึ่งก่อให้เกิดผลร้ายทั้งต่อสิ่งแวดล้อม สุขภาพของประชากร และเศรษฐกิจ จึงมีการแก้ปัญหาโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราของเกษตรกรรม การส่งเสริมและพัฒนาการเกษตรอินทรีย์ของประเทศให้ก้าวหน้า การใช้เอนไซม์ซึ่งเป็นสารชีววัตถุที่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อราหรือยับยั้งการงอกของสปอร์ในการควบคุมและกำจัดเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในพืชหลายประเภท เช่น *Fusarium moniliforme* สาเหตุโรคถอดฝักดาบในข้าว *Geotrichum candidum* สาเหตุโรคผลหรือใบเน่าของผลไม้ *Mucor rouxii* โรคผลลำไยเน่าเสีย *Penicillium marneffei* สาเหตุโรคบนผักและผลไม้ *Sporotrichum pulverulentum* สาเหตุโรครากและโคนเน่าของผลไม้ และ *Trichoderma reesei* สาเหตุโรคใบเหี่ยวของผลไม้ เอนไซม์ที่สำคัญคือ เอนไซม์ไคติเนส ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ เพราะเส้นใยของเชื้อรามีไคตินเป็นโครงสร้างหลัก เอนไซม์ไคติเนสสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายตั้งแต่เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และพืช โดยเฉพาะในพืชตระกูลถั่วและสัตว์บางประเภท มีผลการวิจัยเป็นจำนวนมากที่แสดงถึงความสามารถของเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดได้จากแหล่งต่าง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืชชนิดต่าง ๆ หลายประเภท โดยผลจากงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าเอนไซม์ไคติเนสจากพืชและแบคทีเรียมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดี (Lievens et al., 2009) และจากรายงานการวิจัยของมานะ ขาวเมฆ (2563) ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนส พบว่า เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจนำเอนไซม์ไคติเนสจากก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์

วิธีการวิจัย

1. สกัดเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ตามวิธีของ Kaomek (Kaomek, 2021) โดยใช้ต้นอ่อนพืชอายุ 2 สัปดาห์ 10 กรัม บดและเติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีฟีนิลเมธิลซัลโฟนิล

ฟลูออไรด์เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และพอลิไวนิลพอลิไพโรลิโดนเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปั่นเหวี่ยงที่ 25,000 g 30 นาที จะได้สารสกัดเอนไซม์ไคติเนส

2. หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ตามวิธีของของตามวิธีของ Kaomek (Kaomek, 2021) โดยปิเปตสารสกัดเอนไซม์ไคติเนส 200 ไมโครลิตร ผสมกับไคตินในรูปคอยลอยด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำของผสมปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตสารละลายใส 500 ไมโครลิตร มาเติมโซเดียมเตตระบอเรตเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 3 นาที เติมสารละลายพาราไดเมธิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ 0 .1 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานเอนอะซิติลกลูโคซามีน

3. หาปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ตามวิธีของ Kaomek (Kaomek, 2021) โดยปิเปตสารสกัดเอนไซม์ไคติเนส 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 500 ไมโครลิตร ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 4.5 เติมสารละลายผสมคอปเปอร์ซัลเฟต 2.5 มิลลิลิตรเขย่าตั้งไว้ 10 นาที เติมสารละลายโฟลินเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าและตั้งไว้ 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน

4. ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโขงเชื้อราด้วยวิธีของ Tripathi และ Dubey (Tripathi & Dubey, 2004) โดยตัดเชื้อราก่อโรคจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ *Fusarium moniliforme, Geotrichum candidum, Mucor rouxii*, *Penicillium marneffei*, *Sporotrichum pulverulentum* และ *Trichoderma reesei* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร นำมาวางไว้กลางจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร PDA จานละสายพันธุ์บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน วางกระดาษกรองรูปวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร รอบเชื้อราที่เลี้ยงไว้ 4 จุด โดยจุดที่ 1, 2, 3, และ 4 คือ เอนไซม์ไคติเนสเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.05 และ 0.10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร อย่างละ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 5 ซ้ำ สังเกตการณ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราโดยวัดรัศมีของโคโลนีเชื้อราของแต่ละจุดในจานทดสอบเปรียบเทียบกับจานควบคุมที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรแทนเอนไซม์ คำนวณหาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใย (% Inhibition) จากสูตร

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

โดย R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในจานควบคุม

โดย R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราในจานทดสอบ

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. การหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนส

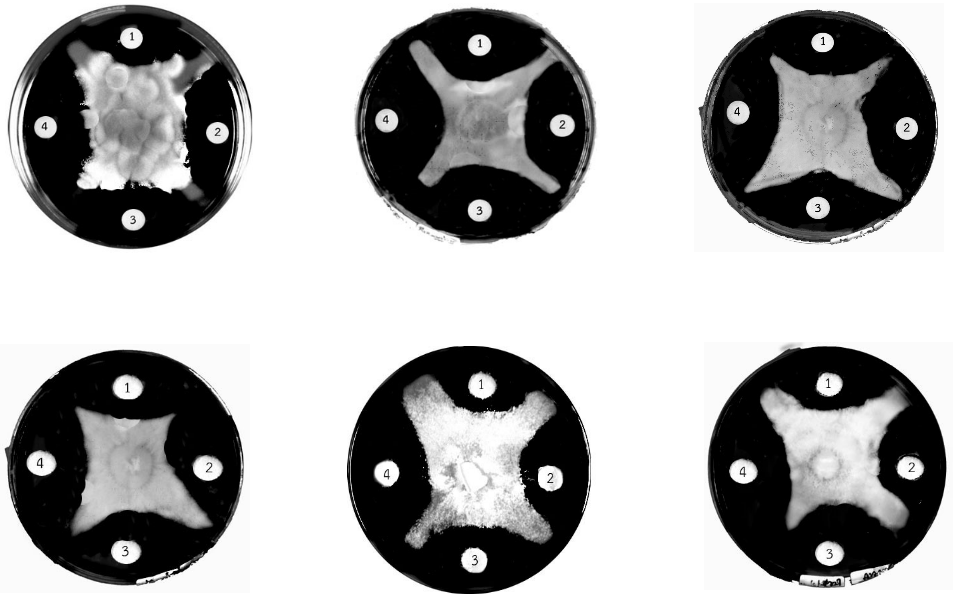
เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ ด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 10.6038, 9.7715, 8.2560 และ 7.3747 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.9730, 0.9987, 0.9889 และ 0.9948 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำค่ากิจกรรมและค่าปริมาณโปรตีนมาหาค่ากิจกรรมจำเพาะได้เท่ากับ 10.8981, 9.7842, 8.3487 และ 7.4132 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนส ก้ามปูมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด รองลงมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ตามลำดับ เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์ไคติเนสจากพืชชนิดอื่นและแหล่งอื่น เช่น Fernandez และคณะ (Fernandez et al., 2009) สกัดเอนไซม์ไคติเนสจากผลองุ่น *Vitis vinifera* พบว่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 5.60 ยูนิต/มิลลิกรัม Taira และคณะ (Taira et al., 2005) สกัดเอนไซม์ไคติเนสจากใบสับปะรด *Ananas comosus* พบว่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 2.77 ยูนิต/มิลลิกรัม Senol และคณะ (Senol et al, 2014) สกัดเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Strain KCTC0377BP พบว่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 1.9582 ยูนิต/มิลลิกรัม Neetu และคณะ (Neetu et al, 2005) สกัดเอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรีย *Enterobacter* sp. พบว่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 0.1750 ยูนิต/มิลลิกรัม Keith และ Mark (Keith and Mark, 1984) สกัดเอนไซม์ไคติเนสจากยีสต์ *Candida albicans* พบว่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 0.0758 ยูนิต/มิลลิกรัม Yong และคณะ (Yong et al, 2017) สกัดเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อรา *Paenibacillus fukunensis* พบว่า มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนสเท่ากับ 0.0122 ยูนิต/มิลลิกรัม ดังนั้นพืชที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงจะยับยั้งเชื้อราได้ดี เพราะผนังเซลล์ของเชื้อรามีไคตินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งเอนไซม์ไคติเนสที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงจะย่อยได้ดีกว่าเอนไซม์ไคตินเสจากแบคทีเรียและมีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า เพราะ เอนไซม์ไคติเนสจากพืชจะเป็นแบบมีการสลายพันธะไกลโคซิดิกแบบภายภายใน แต่เอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียจะสกัดได้ปริมาณมาก ๆ เพราะสามารถเลี้ยงแบคทีเรียได้ปริมาณมากและแบคทีเรียเจริญเติบโตได้เร็วกว่า

2. ศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคติเนส

เมื่อนำเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ เข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาทดสอบความสามารถในการยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ คือ *Fusarium moniliforme, Geotrichum candidum, Mucor rouxii, Penicillium marneffei, Sporotrichum pulverulentum* และ *Trichoderma reesei* พบว่า

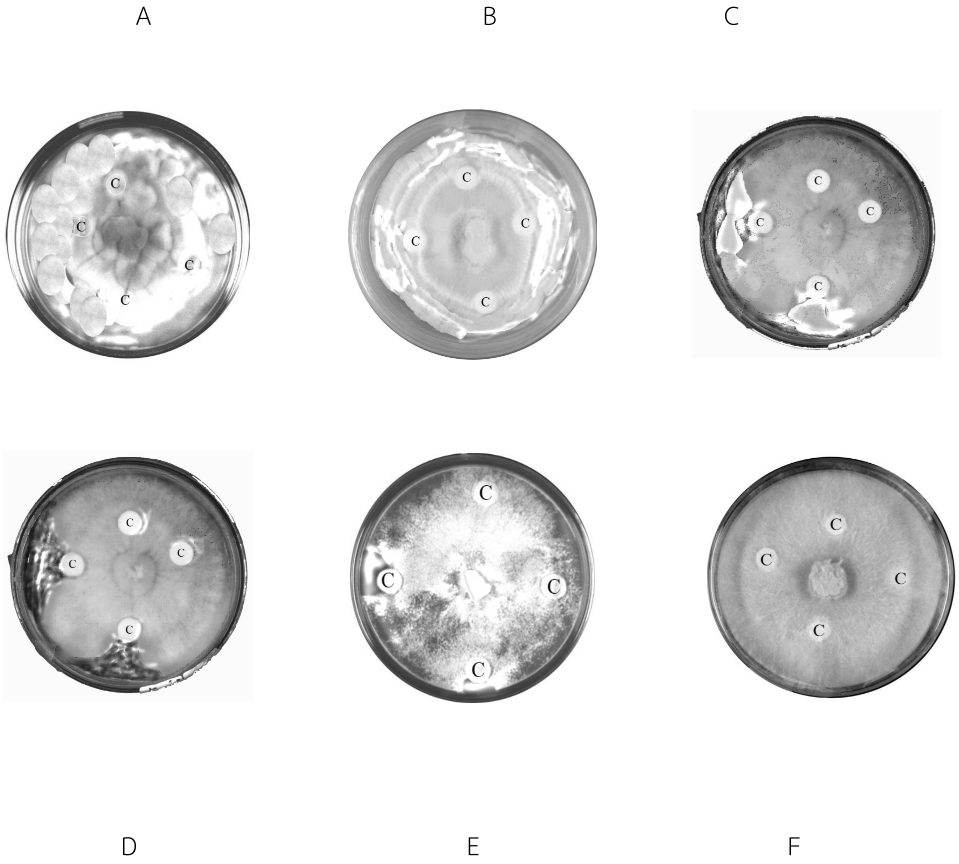
เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *F. moniliforme, G. candidum, M. rouxii*, *P. marneffei*, *S. pulverulentum* และ *T. reesei* ได้ร้อยละ 93.20-100, 96.60-100, 90.80-100, 95.40-100, 91.80-111 และ 92.60-100 ตามลำดับ เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *F. moniliforme, G. candidum, M. rouxii, P. marneffei, S. pulverulentum* และ *T. reesei* ได้ร้อยละ 86.20-100, 88.40-100, 83.40-100, 89.80-100, 88.00-100 และ 83.60-100 ตามลำดับ เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนข้าว กข. 6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *F. moniliforme, G. candidum, M. rouxii*, *P. marneffei*, *S. pulverulentum* และ *T. reesei* ได้ร้อยละ 72.40-100, 74.00-100, 71.80-100, 75.40-100, 73.80-100 และ 69.40-100 ตามลำดับ เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนข้าวฟ่าง เคยู 630 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *F. moniliforme, G. candidum, M. rouxii, P. marneffei*, *S. pulverulentum* และ *T. reesei* ได้ร้อยละ 71.20-100, 73.40-100, 70.60-100, 74.80-100, 72.60-100 และ 34.00-71.40 ตามลำดับ ดังภาพที่ 1, 2 และตารางที่ 1

A B C



D E F

ภาพที่ 1 ตัวอย่างการยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ หมายเลข 1 = 0.125, 2 = 0.25, 3 = 0.5 และ 4 = 1.0 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร A = *Fusarium moniliforme,* B = *Geotrichum candidum, C* = *Mucor rouxii,* D = *Penicillium marneffei*, E= *Sporotrichum pulverulentum,* F = *Trichoderma reesei*



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตของเชื้อราในจานควบคุม C คือสารละลายบัฟเฟอร์ในจานควบคุม A = *Fusarium moniliforme*, B = *Geotrichum candidum*, *C* = *Mucor rouxii*, D = *Penicillium marneffei*, E= *Sporotrichum pulverulentum*, F = *Trichoderma reesei*

ตารางที่ 1 ร้อยละการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยเอนไซม์ไคติเนสความเข้มข้นต่าง ๆ ที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์

ต้นอ่อนพืชที่สกัดไคติเนส	ความเข้มข้นของไคติเนส (μg/μl)	ร้อยละการยับยั้งเชื้อรา					
		FM	GC	MR	PM	SP	TR
ก้ามปู	0.125	93.20	96.60	90.80	95.40	91.80	92.60
	0.25	100	100	100	100	100	100
	0.5	100	100	100	100	100	100
	1.0	100	100	100	100	100	100
กระถินบ้าน	0.125	86.20	88.40	83.40	89.80	88.00	83.60
	0.25	93.40	95.80	91.20	96.20	92.40	91.80
	0.5	100	100	100	100	100	100
	1.0	100	100	100	100	100	100
ข้าว กข. 6	0.125	72.40	74.00	71.80	75.40	73.80	69.40
	0.25	85.20	86.60	83.80	88.20	84.20	83.80
	0.5	94.20	96.20	92.80	97.20	93.60	92.40
	1.0	100	100	100	100	100	100
ข้าวฟ่าง เคยู 630	0.125	71.20	73.40	70.60	74.80	72.60	69.20
	0.25	84.20	85.60	82.20	87.60	83.40	82.20
	0.5	93.60	95.60	91.40	96.20	92.40	91.20
	1.0	100	100	100	100	100	100

โดย FM = *Fusarium moniliforme*, GC = *Geotrichum candidum*, MR = Mucor rouxii,
PM = *Penicillium marneffei*, SP = *Sporotrichum pulverulentum*, TR = *Trichoderma reesei*

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่ได้จากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข.6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 อายุ 2 สัปดาห์ พบว่า ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 6 ชนิด จะแตกต่างกันตามชนิดของพืชและความเข้มข้นของเอนไซม์ไคติเนส โดยเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร รองมาเป็นเอนไซม์ไคติเนสที่

สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 6 สายพันธุ์ ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งดีกว่าเอนไซมไคติเนสที่สกัดได้จากแหล่งอื่นๆ เช่น งานวิจัยของ Maria และคณะ (Maria et al., 2012). ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อราจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ *Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Fusarium culmorum, Fusarium oxysporum, Fusarium solani* และ *Rhizoctonia solani* ด้วยเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากเชื้อรา *Aspergillus niger* LOCK 62 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 3 สายพันธุ์ คือ *Fusarium culmorum, Fusarium solani, Rhizoctonia solani* โดยใช้เอนไซม์เข้มข้น 30 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราเท่ากับร้อยละ 46.40-75.60 Melchers และคณะ (Melchers et al., 1994) ศึกษาการยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากใบยาสูบ *Nicotiana tabacum* พบว่า เอนไซม์ไคติเนสมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสายพันธุ์ *Alternaria radicina* ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Broglie และคณะ (Broglie et al., 1991) ศึกษาการยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นถั่ว *Proteus vulgaris* พบว่า เอนไซม์ไคติเนสมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสายพันธุ์ *Rhizoctonia salani* ที่ความเข้มข้น 16 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Walden และคณะ (Walden et al., 1987) ศึกษาการยับยั้งเชื้อราของเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* และ *Pseudomonas stutzer* พบว่า เอนไซม์ไคติเนสมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสายพันธุ์ *Trichoderma reesei* ที่ความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร Mandana และคณะ (Mandana et al., 2011) ศึกษาการยับยั้งเชื้อรา 7 สายพันธุ์ คือ *Alternaria raphani, Alternaria brassicicola, Bipolaris sp, Fusarium graminearum, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum* และ *Trichoderma reesei* ของเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* B4A พบว่า เอนไซม์ไคติเนสมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา 4 สายพันธุ์ คือ *Alternaria raphani, Alternaria brassicicola, Bipolaris sp* และ *Rhizoctonia solani* ที่ความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราร้อยละ 48.20-67.80 ดังนั้น เอนไซม์ไคติเนสจากพืชสามารถยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีกว่าเอนไซม์ไคติเนสจากแหล่งอื่น โดยเฉพาะเอนไซม์จากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ที่ใช้ความเข้นข้นต่ำและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา เพราะ เอนไซม์ไคติเนสจากพืชจะมีโครงสร้างแบบภายใน (Endo Type) ซึ่งจะจับกับไคตินที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อราได้ดีกว่าเอนไซม์จากแหล่งอื่น ดังนั้นเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ ควรนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคพืชต่าง ๆ

สรุปผลการวิจัย

เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปูอายุ 2 สัปดาห์ มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุดคือ เท่ากับ 10.8981 รองมาเป็นกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้างฟ่าง เคยู 630 โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 9.7842, 8.3487 และ 7.4132 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนก้ามปู มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุดทั้ง 6 สายพันธุ์ *Fusarium moniliforme, Geotrichum candidum, Mucor rouxii*, *Penicillium marneffei*, *Sporotrichum pulverulentum* และ *Trichoderma reesei* ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เอนไซม์ไคติเนสจากกระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราได้ดีทั้ง 6 สายพันธุ์ ร้อยละ 100 ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 1.0 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

มานะ ขาวเมฆ. (2563). ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนส. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 15* (2), 119-130.

Bade, M. L. & Hickey, K. (1988). Classification of Enzymes Hydrolyzing Chitins. In: Gudmund S-B, Anthonson T and Sandford P. *International Conference on Chitin and Chitosan (4th: 1988: Trundheim) London*: Elseveir Appl Sci, 835 p.

Bassler, B. L., Yu, C., Lee, Y. C. & Roseman, S. (1991). Chitin Utilization by Marine Bacteria: Degradation and Catabolism of Chitin Oligosaccharides by *Vibrio Furnissii*. *Journal of Biological Chemistry, 266*(36), 24276-24286.

Broglie, k., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J. & Broglie, R. (1991). Transgenic Plants with Enhanced Resistance to the Fungal Pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, *254*(5035), 1194-1197.

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.

Fernandez, C. C., Romero, I., Goni, O., Escribano, M. I., Merodio, C. & Sanchez, T. B. (2009). Characterization of an Antifungal and Cryoprotective Class I Chitinase from Table Grape Berries (*Vitis vinifera* Cv. Cardinal), *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*(19), 8893–8900.

Jeuniaux, C. (1966). Chitinase. In: Colowick, S. P., Kaplan, N. O. (ed). *Method of Enzymology, 8*, 645-650.

Kaomek, M. (2021). Antioxidant Activity of Chitooligosaccharides Produced by Chitinase Extracted from two Weeks Seedlings of *Samanca saman* (Jacq) Merr. *Journal of Applied Research on Science and Technology, 20*(2), 114-123.

Keith, B. B. & Mark, H. (1984). The Detection and Analysis of Chitinase Activity from the Yeast Form of *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology, 130*(7), 1857-1861.

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.

Malik, A. (2019). Purification and Properties of Plant Chitinases: A review. *Journal of Food Biochemistry, 43*(3), 1-11.

Mandana, Z., Saeed, A., Hossein, Z., Alireza, S., Morteza, D., Kambiz, A. N., Ahmad, G. & Abbasali, M. (2011). Characterization of a Chitinase with Antifungal Activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *Brazilian Journal of Microbiology, 42*(3), 1017–1029.

Maria, S.B. & Urszula, J. (2012). Production of Antifungal Chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and Its Potential Role in the Biological Control. *Current Microbiology, 65*(6), 666-672.

Matic, S., Spadaro, D., Garibaldi, A. & Gullino, L. M. (2014). Antagonistic Yeast and Thermotherapy as Seed Treatments to Control *Fusarium fujikuroi* on Rice. *Biological Control, 73*, 59-67.

Melchers, L. S., Apotheker-de, M. G., Knaap, J. A., POnstein, A. S., Sela-Buurlage, M. B., Bol, J. F., Cornelissen, B. J., Elzen, P. J. & Linthorst, H. J. (1994). A New Class of Tobacco CHitinase Homologus to bacterial Exo-chitinase Displays Antifungal Activity. *Plant Journal, 5*(4), 469-480.

Neetu, D., Rupinder, T., Ram, P. T. & Gurinder, S. H. (2005). Chitinase from *Enterobacter sp.* NRG4: Its Purification, Characterization and Reaction Pattern. *Microbial Biotechnology, 8*(2), 8-17.

Roberts, W. K. & Selitrennikoff, C. P. (1988). Plant and Bacterial Chitinases differ in Antifungal Activity. *Journal of General Microbiology, 134*(1), 169-176.

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. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, *13*(1), 1-7.

Taira, T., Toma, N. & Ishihara, M. (2005). Purification, Characterization and Antifungal Activity of Chitinases from Pineapple (*Ananas comosus*) Leaf. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 69*(1), 189-196.

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*(3), 317-321.

Walden, K. R. & Claude, P. S. (1987). Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. *Journal of General Microbiology, 134*(1), 169-176.

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.