

หัวข้อวิทยานิพนธ์	เอนไซม์ที่มีศักยภาพในการต้านเชื้อราจากแคลลัสของมะรุม	
ผู้เขียน	นางสาวณัชชา ดวงอินตา	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ.ดร.ลลิตา แสงค์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ดร.นพกาญจน์ จันทร์เดช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ของเอนไซม์ที่ต้านเชื้อราเช่น ไคตินเนสและกลูคาเนสจากมะรุม โดยการสกัดมะรุมด้วยโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 5.6 พบว่าสารสกัดหยาบในรากมะรุมสดไม่มีแอกติวิตีของไคตินเนส แต่ในแคลลัสจากรากมะรุมพบแอกติวิตี เมื่อตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0-80 ที่ 0.026 ± 0.008 ไมโครยูนิตต่อมิลลิกรัม ไม่พบแอกติวิตีของกลูคาเนสในมะรุมสด แต่สามารถตรวจพบในสารสกัดหยาบ สารสกัดที่ตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0-80 และสารสกัดสุดท้ายของแคลลัสรากมะรุมมีแอกติวิตีที่ 0.043 ± 0.009 , 0.008 ± 0.000 และ 0.002 ± 0.002 ไมโครยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ แอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่สกัดจากแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงรากมะรุม มีแอกติวิตีสูงกว่ารากมะรุมในธรรมชาติ ดังนั้นจึงได้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส และทำการศึกษาเอนไซม์ที่มีฤทธิ์การต้านเชื้อราต่อไป

การเพาะเลี้ยงเมล็ดมะรุบบนอาหารกึ่งแข็ง MS (Murahinge & Skoog) พีเอช 5.8 เป็นเวลา 6 สัปดาห์จะได้ต้นกล้ามะรุม จากนั้นนำส่วนใบ ลำต้น และราก มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.1×0.1 เซนติเมตร เลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็ง MS ที่เติม 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid) ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 3.0 และ 7.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10-13 สัปดาห์พบว่า อาหารที่เติม 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ดีที่สุด

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ที่แคลลัสสร้างขึ้นจากการเหนี่ยวนำด้วยตัวเหนี่ยวนำ ได้แก่ ไคโตซาน เมทิลแอสโคโนต และกรดซาลิซิลิก ทำที่ความเข้มข้นต่างๆ (10.0, 15.0, 30.0 และ 45.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเหลวพร้อมเขย่าตลอดเวลาที่ 90 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยการตรวจหา แอกติวิตีของเอนไซม์ทำโดยใช้โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 5.6 ที่อุณหภูมิ 25

องศาเซลเซียส แคลลัสจากรากมีแอกติวิตีจำเพาะของไคตินเนสเมื่อไม่มีการเหนี่ยวนำที่ 1.217 ± 0.216 พิโคยูนิตต่อไมโครกรัม ส่วนแคลลัสใบแสดงแอกติวิตีจำเพาะของไคตินเนสสูงสุดที่ 0.721 ± 0.055 , 1.586 ± 0.706 และ 0.606 ± 0.143 พิโคยูนิตต่อไมโครกรัม เมื่อเหนี่ยวนำด้วย กรดซาลิซิลิก เมทิลแอสโมเนต และไคโตซานที่ความเข้มข้น 45.0, 30.0 และ 15.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แคลลัสจากรากมีแอกติวิตีจำเพาะของกลูคาเนสที่ 0.074 ± 0.012 และ 0.448 ± 0.039 ไมโครลิตรต่อไมโครกรัม เมื่อเหนี่ยวนำด้วย 10.0 และ 15.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของเมทิลแอสโมเนต และไคโตซานตามลำดับ แคลลัสจากใบมีแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.010 ± 0.004 ไมโครยูนิตต่อไมโครกรัม ที่ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของเมทิลแอสโมเนต และ 0.013 ± 0.004 ไมโครยูนิตต่อไมโครกรัมของ 15.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเหนี่ยวนำด้วยไคโตซาน แอกติวิตีของเอนไซม์ที่ศึกษาในแคลลัสจากลำต้นไม่ถูกระงับโดยการเหนี่ยวนำด้วยตัวเหนี่ยวนำ โดยตรวจไม่พบแอกติวิตีของโปรติเอสในแคลลัสทั้งหมดในสภาวะที่ทำการทดลองนี้ได้ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เมทิลแอสโมเนตและ ไคโตซานสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราจากแคลลัสมะรุมาได้ อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กรดซาลิซิลิกมีผลต่อการผลิตเอนไซม์น้อยมาก แคลลัสที่ได้จากทั้งลำต้น ราก และใบแสดงแอกติวิตีของไคตินเนสและกลูคาเนสในแคลลัสจากรากและใบเท่านั้น แคลลัสจากใบซึ่งมีแอกติวิตีสูงกว่าจึงถูกนำมาเหนี่ยวนำด้วยเมทิลแอสโมเนต (10.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ ไคโตซาน (10.0 และ 15.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 6 วัน เมื่อเก็บแคลลัสที่มีการเหนี่ยวนำมาสกัดที่เวลาต่างกัน แอกติวิตีจำเพาะของไคตินเนสและกลูคาเนสพบได้สูงสุด เมื่อเหนี่ยวนำด้วยเมทิลแอสโมเนตที่ 10.0 และ 30.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เป็นเวลา 3 วัน

เมทิลแอสโมเนตสามารถเพิ่มแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ได้สูงกว่าไคโตซาน การเพิ่มความสามารถการผลิตไคตินเนสและกลูคาเนสโดยตัวเหนี่ยวนำเป็นหนึ่งทางเลือกที่สามารถได้เอนไซม์เพื่อการประยุกต์ต่อไป

Thesis Title	Potential Anti-fungal Enzymes from Drumstick Tree Callus (<i>Moringa oleifera</i> Lam.)	
Author	Miss Wanutchaya Duanginta	
Degree	Master of Science (Biotechnology)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Lalida Shank	Advisor
	Dr. Nopakarn Chandet	Co-advisor

ABSTRACT

The root of *Moringa oleifera* (drumstick tree) was selected for the investigation of anti-fungal enzymatic activity of chitinase and glucanase. Natural root and root-derived calli were extracted with 0.02 M sodium acetate buffer, pH 5.6. Results showed that activity of chitinase was not detectable in native root of drumstick tree, but was detected in root-derived calli in 0-80% sat. protein precipitate at 0.026 ± 0.008 μ u/mg. Glucanase activity in native root was also undetectable, but observed in crude extract of root-derived calli, 0-80% sat. protein precipitate and supernatant at 0.043 ± 0.009 , 0.008 ± 0.000 and 0.002 ± 0.002 mu/mg, respectively. The specific activity of the enzymes from root-derived calli were found higher than that from native root of drumstick tree. The calli were cultured for future screening of anti-fungal enzymes.

The seeds of moringa were used to produce seedlings for the moringa callus culture. Seedling of drumstick tree was produced by culturing on MS (Murashige & Skoog) agar medium at pH 5.8 for 6 weeks. The leaf, shoot and root segments of the seedling were cultured separately on MS agar medium containing 0.5, 1.0, 3.0 and 7.0 mg/L of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxy acetic acid). The callus culture was harvested at 10-13 weeks after subculturing in MS medium containing 1.0 mg/mL of 2,4-D.

The enzymatic production in calli was studied in the elicited callus culture with elicitors including chitosan, methyl jasmonate and salicylic acid at various concentrations (10.0, 15.0, 30.0 and 45.0 mg/mL) in MS suspension with constant shaking at 90 rpm for 48 hr. The activity screening was performed using 0.02 M sodium

acetate buffer, pH 5.6 at 25 °C. Root derived calli showed the specific activity without elicitation at 1.217 ± 0.216 pu/μg. Leaf-derived calli showed the highest chitinase specific activity of 0.721 ± 0.055 , 1.586 ± 0.706 and 0.606 ± 0.143 pu/μg when elicited with salicylic acid, methyl jasmonate and chitosan at 45.0, 30.0 and 15.0 mg/mL, respectively. Root-derived calli exhibited glucanase specific activity at 0.074 ± 0.012 and 0.448 ± 0.039 pu/μg for 10.0 and 15.0 mg/mL of methyl jasmonate and chitosan, respectively, while leaf-derived calli showed 0.010 ± 0.004 pu/μg at 10.0 mg/mL of methyl jasmonate and 0.013 ± 0.004 pu/μg at 15.0 mg/mL for chitosan elicitation. Production of all studied enzymes in shoot-derived calli was not affected by elicitors. Protease activity was not detectable in all callus culture at these conditions. This investigation revealed that methyl jasmonate and chitosan significantly enhanced the production of anti-fungal enzymes in callus culture of drumstick tree, while salicylic acid only slightly affected such production. All callus culture derived from shoot, root and leaf showed high activity of chitinase and glucanase in root and leaf-derived calli. The leaf-derived calli with higher activity were elicited by methyl jasmonate (10.0 and 30.0 mg/mL) and chitosan (10.0 and 15.0 mg/mL) for 6 days. The calli were collected and extracted at different times of elicitation. The specific activity of chitinase and glucanase were the highest at 10.0 and 30.0 mg/mL of methyl jasmonate, respectively, on the third day.

The methyl jasmonate was able to enhance the specific activity better than chitosan. The enhancement of chitinase and glucanase production by elicitors is an alternative mean to obtain the enzymes for future applications.