รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของพืชและจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าและพัฒนานวัตกรรม

2. **โครงการวิจัย** : การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อควบคุมศัตรูพืช
   กิจกรรม : เอ็นไซม์ควบคุมแมลง
   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : ระบุชื่อกิจกรรมย่อยตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก
   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : **Beneficial of chitinase for the control of cutworm**

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ
   สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

   ผู้ร่วมงาน
   นายอิศเรศ เทียนทัด สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
   นางสาววรารัตน์ ศรีประพัฒน์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
   นางสาวจีรภา ปัญญศิริ สังกัด ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

กรมวิชาการเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

การใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ได้ทำการทดลองผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียม 2 ไอโซเลต และบิววาเลีย 1 ไอโซเลต โดยใช้ไคติน 2 ชนิด คือ ชนิด A และ ชนิด B ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB เพื่อชักนำให้ให้เชื้อราผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส เวลาในการเขย่าเชื้อรา 3, 5 และ 7 วัน นำไคติเนสที่อยู่ในรูปของเหลวเข้าเครื่อง Freeze dryer วัดค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสกับหนอนกระทู้ผัก โดยผสมไคติเนสในอาหารเทียมให้กับหนอนกระทู้ผักวัยสองกินเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น เมื่อทำการวัดขนาดลำตัวและชั่งน้ำหนักของหนอนกระทู้ผักหลังจากทำการทดสอบแล้ว 1 สัปดาห์ พบว่า

ขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักจากวิธีควบคุมจะมีขนาดลำตัวที่ใหญ่กว่าและน้ำหนักมากกว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับไคติเนส พบว่าหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะมีเปอร์เซนต์การตายสูงกว่าวิธีควบคุม วิธีที่มีประสิทธิภาพดีคือเอ็นไซม์ที่ผลิตจากเชื้อเมตาไรเซียม ที่เตรียมเชื้อโดยการเขย่า 3 วัน โดยมีความเข้มข้นของไคติน 1 และ 2 % ที่ใช้ผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสเริ่มต้น เมื่อนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผักประสิทธิภาพจะไม่ต่างกัน ดังนั้นในการเตรียมรูปแบบเอ็นไซม์จึงเลือกผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อเมตาไรเซียม โดยใช้ความเข้มข้นของไคติน 1% แล้วผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว ได้แก่ Aluminium silicate และ Kaoline นำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักวัยสอง นำไปหาค่า LC50 ความเข้มข้นของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ทำให้หนอนตาย 50% พบว่าความเข้มข้นของเอ็นไซม์ที่ทดสอบทำให้หนอนตายไม่ถึง 50% ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองครั้งนี้มีข้อจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์ ทำให้ไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์จำนวนมากๆ ได้ จึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มความเข้มข้นของเอ็นไซม์ได้

Abstact :

The useful of chitnase enzyme for cutworm (*Spodoptera litura*) was produced chitinase enzyme from Metarhizium spp 2 isolate and Beauvaria sp 1 isolate. There were 1 and 2 % of 2 chitin : A and B were added in PDB for checking 3, 5 and 5 days for produce chitnase enzyme. Then enzyme was brought in Freeze dryer and activity of enzyme was analyzed. Then enzyme was tested with 2 instar of cutworm. The data of size, weight and motility were statistic analyzed. The results showed that size and weight of cutworms that got enzyme were lower than cutworms from control method. The effective method was chitinse that produced from Metarhizium, added 1% of chitin and checked 3 days. For prepare form of enzyme, Aluminium silicate and Kaoline were added with chitinase. Then LC50 was conducted. The results showed that cutwoms died less that 50%. It probably there was limited of produce enzyme.

6. คำนำ

การศึกษาเอ็นไซน์ไคติเนสได้รับความสนใจมากเนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์ได้กว้างขวาง เอ็นไซม์ไคติเนสสามารถย่อยไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างแมลง โดยมากพบที่เปลือกหุ้ม (cuticle) และ peritrophic membrane ในลำไส้แมลง โดยปกติแมลงจะสร้างเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการลอกคราบ โดยจะสร้างในปริมาณที่พอดีกับความต้องการในขณะนั้น ดังนั้นหากแมลงได้รับเอ็นไซม์นี้ในปริมาณมากเกินความต้องการในช่วงที่ไม่ต้องการเอ็นไซม์ไคติเนสอาจมีผลต่อการเจริญของแมลงและอาจทำให้แมลงตายได้ จึ ง

กรมวิชาการเกษตร

ได้มีการศึกษาการสกัดเอ็นไซม์ไคติเนสจากจุลินทรีย์เพื่อที่จะนำมาใช้ในการควบคุมแมลงอีกทางหนึ่ง นอกเหนือจากการใช้เชื้อจุลินทรีย์โดยตรง ซึ่งอาจจะมีข้อจำกัดในการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในการนำไปใช้และการขยายต่อ

ไคติเนสเป็นเอ็นไซม์ที่ผลิตได้จากเชื้อรา ทั้งเชื้อราเขียว Metarhizium ราขาว Beavaria และราอื่นๆ รวมทั้งผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย และไวรัสที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง (Karthik, 2014) เอ็นไซม์นี้มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น แมลง ไส้เดือนฝอยและเชื้อรา (Sasai and Manocha, 1993) ในแมลงจะมีผลต่อขบวนการลอกคราบโดยกลไกการเข้าทำลายแมลงของเอ็นไซม์ไคติเนสเกิดขึ้นเมื่อแมลงกินชิ้นส่วนของพืชที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสเข้าไปในทางเดินอาหาร เอ็นไซม์ทำลายเยื่อบุผนังทางเดินอาหาร เนื่องจากผนังทางเดินอาหารมีไคติเนสเป็นส่วนประกอบ (ทิพย์วดี, 2549) มีรายงานในการนำไคติเนสไปทดสอบกับแมลงศัตรูพืชหลายชนิด ซึ่งส่วนมากจะเป็นพวกหนอนชนิดต่างๆ พบว่าหนอนที่ได้รับไคติเนสจะไม่เจริญเติบโต ขนาดลำตัว น้ำหนักลดลง เช่นหนอนกระทู้ต่างๆ Spodoptera frugiperda, S. littoralis, S. exigua, หนอนเจาะสมอฝ้าย Heliothis virescens และหนอนกินใบยาสูบ Manduca sexta นอกจากนั้นยังมีผลกับเพลี้ยอ่อน (Myzus pericae) โดยลดการเจริญเติบโตและลดประชากรรุ่นลูกของเพลี้ยอ่อน (Kramer and Muthukrishnan, 1997) ในผีเสื้อข้าวสาร (Corcyra cephalonica) ได้มีการทดสอบเอ็นไซม์ไคติเนสที่สกัดได้จากเชื้อรา เช่น Trichoderma viridae Metharhizium anisopliae พบว่ามีผลในการยับยั้งการกินอาหารและยับยั้งการเจริญเติบโตของผีเสื้อข้าวสาร (Vijayakumar et al., 2017) ในการศึกษาประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสต่อแมลง Wu et al. (2010) ได้ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อ Metarhizium anisopliae ในรูปสารกำจัดแมลงกับหนอนใยผัก (Plutella xylostella) พบว่าหนอนจะลดการกินลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้ Binod et al. (2007) ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อ Trichoderma harianum ต่อหนอนเจาะสมอฝ้าย (Helicoverpa armigera) พบว่าอัตราการกินของหนอนจะน้อยลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้

ในการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส จะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง เช่น pH อุณหภูมิ ไคติน อายุของเชื้อ แล้วยังมีแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เช่น glucosamine N-acetylglucosamine Chitobiose Chitooligosaccaride การสังเคราะห์ extracellular chitinase ใน Metarhizium จะมีกลไกชักนำที่ขึ้นกับ N-acetylglucosamine เชื้อ Metarhizium จะผลิตไคติเนส ช่วงที่เข้าทำลายผนังของแมลง ช่วงนั้นเอ็นไซม์จะมีผลผลิตของไคตินเป็นจำนวนมาก เชื้อราจะเจริญในช่วง pH กว้างๆ ตั้งแต่ 2.5-10.5 การผลิตเอ็นไซม์จะใช้เวลา 20-40 ชั่วโมง (Rustiguel et al., 2012) เนื่องจากเอ็นไซม์จะเสื่อมสภาพได้ง่าย ดังนั้นจึงมีการนำสารปรุงแต่งเข้ามาผสมกับเอ็นไซม์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เอ็นไซม์ให้มีสภาพที่คงทนต่อสิ่งแวดล้อมต่างๆ ได้ดีขึ้น เหมาะที่จะนำไปใช้ในแปลงเกษตรกรได้

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจุลินทรีย์และกรรมวิธีในการผลิตไคติเนสที่เหมาะสมเพื่อพัฒนาเป็นสารชีวภาพในการป้องกันกำจัดแมลงเพื่อให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้ต่อไป

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

7.วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

-ตู้ควบคุมระดับความเย็นที่ 4, และ -20 องศาเซลเซียส

- เครื่อง freeze dry
- เครื่อง centrifuge
- vortex mixer
- water bath
- หม้อนึ่งความดัน
- ไมโครปิเปต ขนาด 2 µl, 20 µl, 200 µl และ 1000 µl
- เครื่อง incubate shaker
- ตู้ laminar flow
- เครื่องกวนสาร
-. ตู้ไมโครเวฟ
- เครื่อง spectrophotometer
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด
- ตู้อบ

สารเคมี

- Potato Dextose Agar
- Potato Dextose Broth
- Chitinase Eassay kit
- Chitin

วิธีการ

1. การศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส

1.1 วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (3x4 +1 กรรมวิธีควบคุม (control)) 4 ซ้ำ

ปัจจัยที่ 1) เชื้อรา 3 ไอโซเลต ได้แก่ เมตาไรเซียม 2 ไอโซเลต บิววาเรีย 1 ไอโซเลต

ปัจจัยที่ 2) ไคตินที่จำหน่ายเป็นการค้า 2 ชนิด ไคติน A (sigma) เพราะเป็นชนิดที่เคยผ่านการทดสอบมาแล้ว และ ไคติน B (Hi media) แบ่งเป็น 4 ระดับ ดังนี้

ไคติน A 1%

ไคติน A 2%

ไคติน B 1%

ไคติน B 2%

กรมวิชาการเกษตร

มีทั้งหมด 13 กรรมวิธีดังนี้

1.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน A 1%

2.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน A 2%

3.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน B 1%

4.เมตาไรเซียม (Birdo) + ไคติน B 2%

5.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน A 1%

6.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน A 2%

7.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน B 1%

8.เมตาไรเซียม (Biotech) + ไคติน B 2%

9.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน A 1%

10.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน A 2%

11.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน B 1%

12.บิวเวอร์เรีย (Biotech) + ไคติน B 2%

13.น้ำกลั่น

1.2 การเตรียมเชื้อราที่สามารถผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส

1.2.1 เตรียมเชื้อราทั้งหมด 3 ตัวอย่าง คือ 1) เชื้อเมตาไรเซียม (สทช- Birdo)
2) เชื้อเมตาไรเซียม (สวทช-Biotech) 3) เชื้อบิววาเรีย (สวทช- Biotech)

1.2.2 นำเชื้อรามาเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

1.2.3 เลือกโคโลนีเดี่ยวมาขยายเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์

1.2.4 นำเชื้อที่บริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ประมาณ 7 วัน จนสร้างสปอร์ เก็บสปอร์ของเชื้อราไว้ในน้ำกลั่น

1.2.5 นับสปอร์ของเชื้อรา ด้วย heamacytometer เตรียม stock ให้ได้ 10^7 สปอร์/มล.

1.2.6 ใส่สปอร์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลต 10^7 สปอร์/ มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB 10 มล. ใน Flask ขนาด 250 มล. แล้วเติม ไคติน ตามกรรมวิธี ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

1.2.7 วัด activity ของเอ็นไซม์ไคติเนสแต่ละตัวอย่าง

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสกับหนอนผีเสื้อ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสทั้ง 12 สูตรโดยเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น ในช่วงการผลิตวันที่ 3, 5, 7 โดยนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก โดยผสมไคติเนสในอาหารเทียมให้กับหนอนกระทู้ผักกิน ใช้หนอน 10 ตัวต่อซ้ำ บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักทุก 24 ชม.

สำนักวิชาการเกษตร

2. การศึกษารูปแบบสารเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ประโยชน์ในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก

2.1. วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 13 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g
2. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม
6. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินAในรูปของเหลว
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g
9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม
12. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินBในรูปของเหลว
13. น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)

2.2 การเตรียมรูปแบบเอ็นไซม์

2.2.1 เลือกสูตรการผลิตไคติเนสที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักจากการทดลองในปีที่ผ่านมา พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก เมตาไรเซียม (1) ผสมกับไคติน A 1% และ เอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก เมตาไรเซียม (1) ผสมกับไคติน B 1% จะมีประสิทธิภาพดีกว่าสูตรอื่นๆ จึงเลือกทั้งสองสูตรนี้มาทำการทดลองต่อไป

2.2.2 เตรียมเอ็นไซม์ในรูปของเหลว โดยเตรียมสารไคติเนส ใส่สปอร์ของเชื้อรา 10^7 สปอร์/มล. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB 100 มล. ใน Flask ขนาด 250 มล. แล้วเติม ไคติน เข้าเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.2.3 เตรียมเอ็นไซม์ในรูปผง โดยทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying)

2.2.4 ผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) Aluminium silicate และ Kaoline เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว

2.2.5 ทำการทดสอบเอ็นไซม์รูปแบบต่างๆ กับหนอนกระทู้ผักวัยสอง

3. การหาค่า Lethal Concentration (LC 50) ของเอ็นไซม์ไคติเนส โดยเลือกรูปแบบที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดกับหนอนกระทู้ผัก

3.1 หาค่า LC 50 โดยทดสอบกับเอ็นไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อให้ทราบค่าความเข้มข้นที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50% โดยดูเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก

กรมวิชาการเกษตร

3.2 วิเคราะห์หาค่า LC 50 เพื่อหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมไปใช้ในการทดลองต่อไป

- เวลาและสถานที่

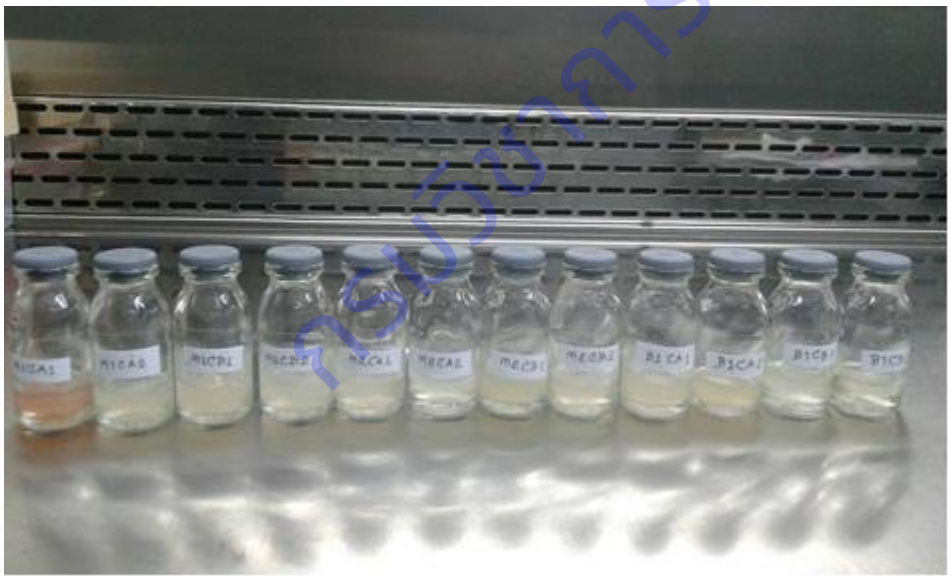
เวลา : ตุลาคม 2561 -กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

7. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส

ทำการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียม 2 ไอโซเลตโดยเป็นเชื้อเมตาไรเซียมจากสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและวิทยาศาสตร์แห่งชาติ (สวทช). 1 ไอโซเลท และเชื้อเมตาไรเซียมที่เก็บรวบรวมที่สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ (สทช) 1 ไอโซเลท และบิววาเลียจากสวทช 1 ไอโซเลต โดยใช้ไคติน 2 ชนิด คือ ชนิด A และ ชนิด B ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ รวมกรรมวิธีที่ผลิตไคติเนส 12 กรรมวิธี นำไคติเนสที่อยู่ในรูปของเหลวเข้าเครื่อง Freeze dryer ทำให้แห้ง เพื่อที่จะนำไปใช้ทดสอบกับหนอนกระทู้ผักวัยสอง

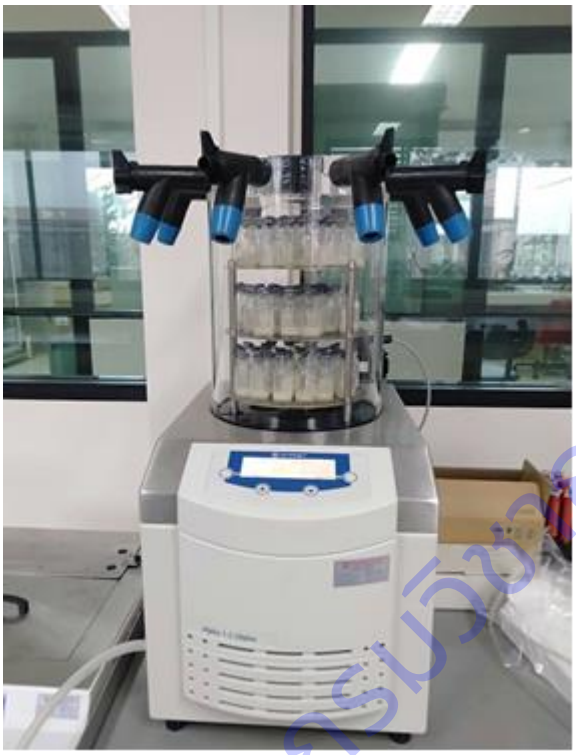


ภาพที่ 1 ไคติเนสที่เตรียมจากทั้ง 12 กรรมวิธี

1. เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%
2. เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%
3. เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%
4. เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%
5. เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%

กรมวิชาการเกษตร

6. เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%
7. เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%
8. เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%
9. บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%
10. บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%
11. บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%
12. บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%



กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 2 การทำไคติเนสที่ผลิตจากกรรมวิธีต่างๆ ให้แห้งโดยนำเข้าเครื่อง freeze dry

<u>เดือนมีนาคม 2562</u>

ทำการทดสอบเบื้องต้น โดยเตรียมไคติเนสที่เขย่าไว้ 3 วัน และเนื่องจากยังอยู่ในช่วงรอ Chitnase assay kit ซึ่งเป็นชุดวัด activity ของเอ็นไซม์ไคติเนส จึงใช้วิธีชั่งน้ำหนักไคติเนสผสมกับน้ำกลั่นในอัตรา 0.01 กรัม /น้ำ 100 ul เพื่อประเมินประสิทธิภาพในเบื้องต้น ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสทั้ง 12 สูตรโดยเปรียบเทียบกับวิธีควบคุมโดยใช้น้ำกลั่น เมื่อนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก โดยผสมไคติเนสในอาหารเทียมให้กับหนอนกระทู้ผักกิน ใช้หนอน 10 ตัวต่อซ้ำ พบว่าขนาดลำตัวของหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส ขนาดลำตัวโดยเฉลี่ยจะเล็กกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส โดยหนอนจากวิธีควบคุมบางตัว มีความยาวลำตัว 3 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.72 กรัม ส่วนหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสบางตัวมีความยาว 1 เซนติเมตร น้ำหนัก 0.027 กรัม (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 3 เปรียบเทียบขนาดหนอนกระทู้ผักที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส (ตัวบน) กับหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส-วิธีควบคุม (ตัวล่าง)

เมื่อทำการวัดขนาดลำตัวและชั่งน้ำหนักของหนอนกระทู้ผักหลังจากทำการทดสอบแล้ว 1 สัปดาห์ พบว่าขนาดและน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักจากวิธีควบคุมจะมีขนาดลำตัวที่ใหญ่กว่าและน้ำหนักมากกว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับไคติเนส ดังแสดงในตารางที่ 1

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 1 แสดงความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผัก 20 ตัว ที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสไปแล้ว 1 สัปดาห์ ในเดือนมีนาคม 2562

กรรมวิธี	ความยาวเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (เซนติเมตร)	น้ำหนักเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (กรัม)
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	2.13	0.29
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	1.83	0.17
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	2.13	0.28
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	1.85	0.25
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	1.73	0.26
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	1.95	0.19
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	1.93	0.24
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	1.88	0.23
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	1.95	0.21
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	1.90	0.25
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	2.05	0.28
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	1.70	0.19
วิธีควบคุม	2.15	0.30

กรมวิชาการเกษตร

หลังจากให้หนอนกินอาหารที่มีเอ็นไซม์ปนอยู่ในอาหารเทียมแล้ว ทำการเช็คจำนวนหนอนที่ตายทุกวัน พบว่าหนอนจะตายมากหลังจากได้รับเชื้อ 10-15 วัน และหนอนบางตัวจะตายในระยะดักแด้ ไม่สามารถออกเป็นผีเสื้อได้ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด 55 % เมื่อหนอนได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากเชื้อเมตาไรเซียม (1) กับ ไคติน A 2% ซึ่งค่าที่ได้ค่อยข้างแปรปรวน เนื่องจากไม่ได้มีการวัด activity ของเอ็นไซม์ไคติเนสก่อนที่จะทำการทดสอบกับหนอน เพราะอยู่ในช่วงที่กำลังรอชุดทดสอบ chitinase assay kit

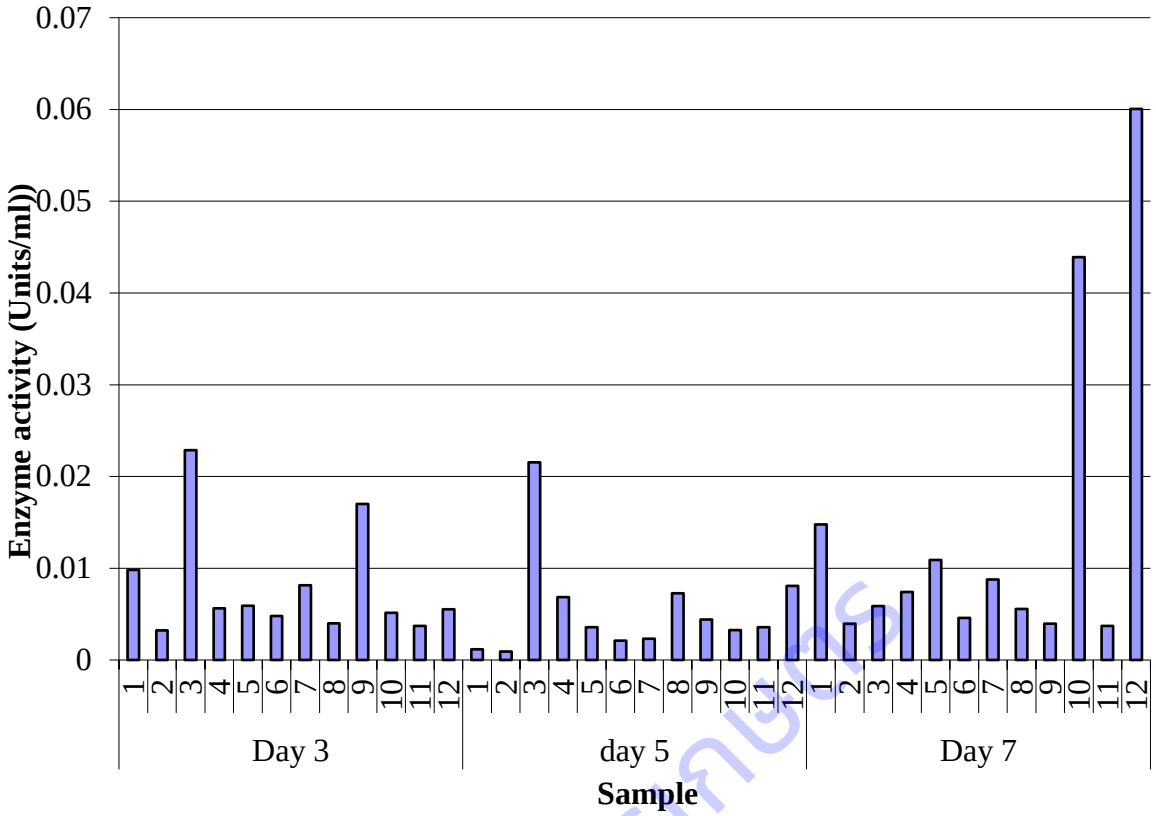
ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์หนอนกระทู้ผักที่ตายหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส จากการเตรียมไคติเนสที่มีการเขย่าเชื้อ 3 วัน ในเดือนมีนาคม 2562

กรรมวิธี	% การตายหนอนกระทู้ผัก
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	20
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	55
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	20
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	5
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	50
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	15
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	20
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	45
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	25
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	40
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	35
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	15
วิธีควบคุม	0

กรมวิชาการเกษตร

<u>เดือนมิถุนายน 2562</u>

หลังจากผลการทดสอบเบื้องต้น ได้เตรียมไคติเนสโดยการเขย่าส่วนผสมแต่ละกรรมวิธี เป็นเวลา 3, 5 และ 7 วัน นำเอ็นไซม์ที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยเข้าเครื่อง freeze dry แล้ววัดค่า activity ของเอ็นไซม์ ดังแสดงในกราฟที่ 1 จากนั้นทำการปรับค่า activity ทุกกรรมวิธีให้เป็น 0.01 unit/ ml



ภาพที่ 4 กราฟแสดงค่า enzyme activity ของเอ็นไซม์โคติเนสแต่ละกรรมวิธี

จากนั้นได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์โคติเนสกับหนอนกระทู้ผักวัย 2 ในเดือนมิถุนายน 2562 โดยวัดขนาดลำตัวและน้ำหนักหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์โคติเนส ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4 และได้บันทึกจำนวนหนอนกระทู้ผักที่ตายหลังจากได้รับเอ็นไซม์โคติเนส คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ตามตารางที่ 5

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 ขนาดเฉลี่ยขนาดของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ เดือนมิถุนายน 2562

กรรมวิธี	ขนาดเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (ซ.ม.)		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	2.70 abc	2.58 c	1.83 a
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	2.54 abc	2.44 bc	1.84 a
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	2.68 abc	2.33 abc	2.16 a
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	2.89 c	2.54 c	1.81 a
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	2.63 abc	1.99 ab	1.85 a
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	2.84 bc	1.88 a	2.01 a
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	2.53 abc	2.16 abc	2.19 a
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	2.63 abc	2.20 abc	2.25 ab
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	2.24 a	2.24 abc	1.94 a
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	2.53 abc	2.34 abc	2.25 ab
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	2.36 ab	2.24 abc	2.08 a
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	2.39 abc	2.04 ab	2.11 a
13. วิธีควบคุม	2.58 abc	2.60 c	2.60 b
CV (%)	12.1%	12.3	12.8

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4 น้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ เดือนมิถุนายน 2562

กรรมวิธี	น้ำหนักเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (กรัม)		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	0.40 a	0.33 b	0.20 a
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	0.33 a	0.29 ab	0.20 a
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	0.40 a	0.27 ab	0.26 ab
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	0.48 a	0.32 b	0.19 a
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	0.41 a	0.27 ab	0.23 a
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	0.45 a	0.20 a	0.23 a
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	0.36 a	0.23 ab	0.24 ab
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	0.40 a	0.27 ab	0.26 ab
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	0.30 a	0.26 ab	0.21 a
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	0.35 a	0.28 ab	0.26 ab
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	0.31 a	0.23 ab	0.24 ab
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	0.32 a	0.23 ab	0.26 ab
13. วิธีควบคุม	0.37 a	0.32 b	0.32 b
CV (%)	31.6	24.2	22.9

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์หนอนกระทู้ผักที่ตายหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส เดือนมิถุนายน 2562

กรรมวิธี	% การตายหนอนกระทู้ผัก		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	35	60	47.5
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	62.5	50	57.5
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	52.5	55	75
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	47.5	50	57.5
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	57.5	35	55
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	42.5	40	60
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	52.5	52.5	62.5
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	42.5	50	55
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	50	35	65
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	67.5	52.5	45
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	40	55	35
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	52.5	55	55
13. วิธีควบคุม	32.5	30	32.5

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองในเดือนมิถุนายน 2562 พบว่าขนาดตัวและน้ำหนักของหนอนกระทู้ที่ได้รับเอ็นไซม์ที่ผลิตโดยการเขย่าเชื้อ 7 วันจะมีขนาดและน้ำหนักน้อยกว่า หนอนที่ได้รับเอ็นไซม์จากการเขย่าเชื้อ 3 และ 5 วัน และหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ส่วนใหญ่จะมีขนาดและน้ำหนักน้อยกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ ค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ในแต่ละวิธีการค่าจะค่อยข้างแปรปรวน รวมทั้งวิธีควบคุมที่หนอนไม่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสมีเปอร์เซนต์การตายค่อนข้างสูง จึงไม่สามารถสรุปผลได้อย่างชัดเจน

ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสกับหนอนกระทู้ผักวัย 2 ซ้ำอีก ในเดือนสิงหาคม 2562 ได้ค่าเฉลี่ยขนาดเฉลี่ยขนาดของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ตามตารางที่ 6 และค่าขนาดเฉลี่ยน้ำหนักของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ตามตารางที่ 7 ได้ค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ตามตารางที่ 8

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 6 ขนาดเฉลี่ยขนาดของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ เดือนสิงหาคม 2562

กรรมวิธี	ขนาดเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (ซ.ม.)		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	1.96 a	2.15 ab	2.16 a
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	2.16 a	2.03 a	2.33 a
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	2.36 abc	2.33 ab	1.98 a
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	2.19 ab	2.40 abc	2.13 a
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	1.93 a	2.26 ab	2.26 a
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	1.91 a	2.20 ab	2.40 a
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	2.25 ab	2.58 bc	2.25 a
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	2.91 c	2.49 abc	2.31 a
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	2.44 abc	2.55 bc	2.36 a
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	2.06 a	2.40 abc	2.33 a
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	2.36 abc	2.56 bc	2.28 a
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	2.19 ab	2.25 ab	2.29 a
13. วิธีควบคุม	2.80 bc	2.80 c	2.80 a
CV (%)	17.1	11.9	12

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 7 น้ำหนักเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสแล้ว 1 สัปดาห์ เดือนสิงหาคม 2562

กรรมวิธี	น้ำหนักเฉลี่ยหนอนกระทู้ผัก (กรัม)		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	0.15 a	0.20 ab	0.19 a
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	0.18 ab	0.17 a	0.30 ab
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	0.24 ab	0.25 abc	0.18 a
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	0.21 ab	0.29 abc	0.22 ab
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	0.15 a	0.24 abc	0.26 ab
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	0.14 a	0.23 abc	0.31 ab
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	0.22 ab	0.31 abc	0.24 ab
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	0.24 ab	0.32 abc	0.25 ab
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	0.29 bc	0.35 bc	0.32 ab
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	0.19 ab	0.28 abc	0.28 ab
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	0.26 b	0.36 bc	0.26 ab
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	0.23 ab	0.26 abc	0.25 ab
13. วิธีควบคุม	0.37 c	0.37 c	0.37 b
CV (%)	29.9	34.3	37.9

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์หนอนกระทู้ผักที่ตายหลังจากได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส เดือนสิงหาคม 2562

กรรมวิธี	% การตายหนอนกระทู้ผัก		
	เขย่าเชื้อ 3 วัน	เขย่าเชื้อ 5 วัน	เขย่าเชื้อ 7 วัน
1.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 1%	10	7.5	5
2.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน A 2%	15	5	2.5
3.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 1%	5	2.5	5
4.เมตาไรเซียม (1) + ไคติน B 2%	15	7.5	7.5
5.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 1%	12.5	7.5	2.5
6.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน A 2%	7.5	7.5	10
7.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 1%	10	2.5	10
8.เมตาไรเซียม (2) + ไคติน B 2%	2.5	7.5	5
9.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 1%	2.5	2.5	7.5
10.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน A 2%	12.5	5	17.5
11.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 1%	10	5	17.5
12.บิวเวอร์เรีย (1) + ไคติน B 2%	15	15	0
13. วิธีควบคุม	0	0	0

กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองในเดือนสิงหาคม 2562 จากการวัดค่าขนาดและน้ำหนักของหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส จากตารางที่ 6 และ 7 จะให้ค่าไปในแนวเดียวกัน โดยวิธีที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดคือการใช้เมตาไรเซียมผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส โดยที่ไคติน A จะให้ประสิทธิภาพดีกว่าไคติน B และเขย่าเชื้อเพื่อผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส 3 วัน จะมีประสิทธิภาพดีที่สุด ซึ่งหนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะมีขนาดและน้ำหนักน้อยกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนส อย่างไรก็ตามในตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก จะ

ไม่สูงนัก เปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดเพียง 17.5% เท่านั้น ซึ่งหากต้องนำไปใช้ในแปลงเกษตรกร จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์ที่ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก

จากผลการทดลองที่หนอนกระทู้ผักที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสมีน้ำหนักตัวน้อยกว่าวิธีควบคุมที่ไม่ได้รับไคติเนสสอดคล้องกับที่ Wuนำ Wu et al., (2010) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของไคติเนสจากเชื้อเมตาไรเซียมกับหนอนใยผักว่าทำให้หนอนใย และ Binod et al., (2007) ศึกษาประสิทธิภาพของไคติเนสกับหนอนเจาะสมอฝ้ายพบว่าพบว่าหนอนจะลดการกินลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้

2. การศึกษารูปแบบสารเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ประโยชน์ในการกำจัดหนอนกระทู้ผัก

จากการวิเคราะห์ผลการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสในการทดลองที่ผ่านมา จากเชื้อราเมตาไรเซียม 2 ไอโซเลต และบิววาเลีย 1 ไอโซเลต โดยใช้ไคติน 2 ชนิด คือ ชนิด A และ ชนิด B ที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ และเวลาในการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส 3, 5 และ 7 วัน พบว่าวิธีที่ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดคือการใช้เมตาไรเซียมผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส โดยที่ไคติน A จะให้ประสิทธิภาพดีกว่าไคติน B และเขย่าเชื้อเพื่อผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส 3 วัน จะมีประสิทธิภาพดีที่สุด

การศึกษารูปแบบสารเอ็นไซม์ไคติเนสจึงเลือกที่ผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียมไอโซเลทที่ 1 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีและเป็นเชื้อราที่ทางสำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพได้เก็บรักษาไว้ ส่วนไคตินที่ทำการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสนั้น ได้เลือกไว้ทั้งสองชนิดเนื่องจากไคตินA มีประสิทธิภาพที่ดี แต่มีราคาแพง หากสามารถใช้ไคติน B แทนจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสได้ และระยะเวลาในการผลิตใช้เวลาในการเขย่าเชื้อเพียง 3 วันเท่านั้น โดยใช้ความเข้มข้นของไคตินเพียง 1% เพื่อลดต้นทุนในการผลิต

เมื่อได้เอ็นไซม์ในรูปผง โดยทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) ผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) Aluminium silicate และ Kaoline เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัวเพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว และเพิ่มประสิทธิภาพในการจับใบเมื่อใช้ในการฉีดพ่นพืชผักในแปลงเกษตรกร แล้วทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผสมสารปรุงแต่ง กรรมวิธีต่างๆ ในเดือนมกราคม 2563 กับหนอนกระทู้ผัก วัย 2 โดยบันทึก ขนาด น้ำหนักหนอน จำนวนตัวที่ตาย หลังจากได้รับเอ็นไซม์ ในแต่ละวัน ผลการทดลองพบว่า สารปรุงแต่ง Aluminium silicate จะให้ประสิทธิภาพดีกว่า Kaoline ในกรรมวิธีที่ 2 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g จะพบการตายของหนอนกระทู้ผัก 60% รองลงมาคือกรรมวิธีที 7 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g หนอนมีการตาย 57.50 % ดังแสดงในตารางที่ 9

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักจากกรรมวิธีต่างๆ ในเดือนมกราคม 2563

กรรมวิธี	% การตายของหนอน
1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	47.50 ab
2.เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	60.00 a
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	32.50 b
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	52.50 ab
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม	45.00 ab
6. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินAในรูปของเหลว	37.50 ab
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	57.50 a
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	47.50 ab
9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	32.50 b
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	40.00 ab
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม	32.50 b
12. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินBในรูปของเหลว	52.50 ab
13. น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)	0 c

กรมวิชาการเกษตร

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสซ้ำในหนอนไขผึ้ง เนื่องจากช่วงโควิดไม่มีการเพิ่มปริมาณหนอนกระทู้ผัก ทำให้หนอนกระทู้ผักไม่เพียงพอในการทดลอง จึงใช้หนอนไขผึ้งซึ่งเป็นหนอนผีเสื้อเหมือนกันทำการทดสอบแทน โดยใช้หนอนไขผึ้ง วัยที่ 2 โดยได้เพิ่มกรรมวิธีอีก 2 กรรมวิธี เพื่อดูผลของ Aluminium silicate และ Kaoline จากผลการทดลองหนอนไขผึ้งตายน้อยมาก ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแต่ละกรรมวิธีได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากหนอนไขผึ้งและหนอนกระทู้ผักอยู่คนละวงศ์ (Family) กัน จึงทำให้ผลที่ได้ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนไชผึ้งจากกรรมวิธีต่างๆ ในเดือนมิถุนายน 2563

กรรมวิธี	% การตายหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง
1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	0
2.เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	2.5
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	0
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	2.5
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม	0
6. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินAในรูปของเหลว	2.5
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	0
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	0
9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	5
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	2.5
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม	2.5
12. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินBในรูปของเหลว	0
13. Aluminium silicate 0.1 g	2.5
14. Kaoline 0.10 g	0
15. น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)	0

กรมวิชาการเกษตร

ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสซ้ำในหนอนกระทู้ผัก วัยที่ 2 โดยได้เพิ่มกรรมวิธีอีก 2 กรรมวิธี เพื่อดูผลของ Aluminium silicate และ Kaoline ต่อหนอนกระทู้ผัก ผลการทดลองพบว่าในกรรมวิธีที่มี Aluminium silicate และ Kaoline พบว่ามีหนอนตาย จึงน่าจะเป็นไปได้ที่สารทั้งสองมีฤทธิ์ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกับแมลงมากขึ้น

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักจากกรรมวิธีต่างๆ ในเดือนสิงหาคม

กรรมวิธี	**% การตายของหนอนกระทู้ผัก**
1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	10
2.เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	2.50
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	7.50
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	12.5
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม	2.50
6. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินAในรูปของเหลว	2.50
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g	5
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g	5
9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 g	5
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม+ Kaoline 0.20 g	5
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม	15
12. เอ็นไซม์ไคติเนสจากไคตินBในรูปของเหลว	12.50
13. Aluminium silicate 0.1 g	12.50
14. Kaoline 0.10 g	10
15. น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)	2.50

กรมวิชาการเกษตร

3. การทดสอบหาค่า LC 50

การทดสอบหาค่า LC 50 เป็นการความเข้มข้นของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50 % เดือนกันยายน โดยใช้เอ็นไซม์ไคติเนสที่ได้จากไคติน A และ B ที่ความเข้มข้นต่างๆ และใช้เอ็นไซม์ไคติเนสที่ได้จากไคติน A ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับ Aluminium silicate และ Kaoline

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักในเวลา 1 สัปดาห์ จากกรรมวิธีต่างๆ ในเดือนกันยายน 2563

กรรมวิธี	% การตายของหนอนกระทู้ผัก
1. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.10 กรัม	20
2. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.20 กรัม	10
3. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.30 กรัม	10
4. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.40 กรัม	22.5
5. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.50 กรัม	15
6. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 กรัม	7.5
7. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.2 กรัม + Aluminium silicate 0.1 กรัม	10
8. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.3 กรัม + Aluminium silicate 0.10 กรัม	20
9. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.4 กรัม + Aluminium silicate 0.10 กรัม	17.5
10. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.5 กรัม + Aluminium silicate 0.10 กรัม	25
11. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Kaoline 0.10 กรัม	15
12. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.2 กรัม + Kaoline 0.10 กรัม	5
13. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.3กรัม + Kaoline 0.10 กรัม	5

กรมวิชาการเกษตร

14. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.4 กรัม + Kaoline 0.10 กรัม	22.5
15. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.5 กรัม + Kaoline 0.10 กรัม	35
16. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม	10
17. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.2 กรัม	10
18. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.3 กรัม	12.5
19. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.4 กรัม	25
20. เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.5 กรัม	30
21. Aluminium silicate 0.05 g	2.5
22. Kaoline 0.10 g	20
23. น้ำ	0

กรมวิชาการเกษตร

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ และเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผสมสารปรุงแต่งที่อัตราส่วนต่างๆ บางวิธีการเมื่อเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์จะมีผลทำให้การตายของหนอนเพิ่มขึ้น แต่ไม่เสมอไป และจากตารางจะพบว่าหนอนกระทู้ที่ทดสอบด้วย Kaoline เพียงอย่างเดียว สามารถทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 20% ทั้งนี้เนื่องจากเกาลีนมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงด้วย ทุกกรรมวิธีไม่ทำให้หนอนตายถึง 50% สูงสุดเพียง 25% ทั้งนี้อาจจะมาจากปริมาณเอ็นไซม์ไคติเนสที่มีไม่มากพอ เนื่องจากข้อจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์จากเครื่อง freeze dry ในหน่วยงาน ที่เป็นเครื่องขนาดเล็ก จึงไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์เป็นจำนวนมากๆได้

8. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

ในการทดสอบการใช้ประโยชน์จากเอ็นไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก ในปี 2562 ได้ทำการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อราเมตาไรเซียม โดยใช้ไคติน ชนิด A และ B ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในการทดลอง เข้าเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 3 วัน ผลการทดสอบพบว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะกินอาหารลดลง น้ำหนักตัวลดลง จากการวิเคราะห์ทางสถิติจะพบว่าน้ำหนักตัวหนอนที่

ได้รับไคติเนสจะน้อยกว่าหนอนที่ไม่ได้รับไคติเนส ไคติเนสที่อยู่ในรูปของเหลวเข้าเครื่อง Freeze dryer ให้แห้ง แล้วผสมผงเอ็นไซม์กับสารปรุงแต่ง (additive) เพื่อให้เอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการคงตัว นำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผักวัยสอง ผลการทดลองพบว่าในเดือนมกราคม 2563 สารปรุงแต่ง Aluminium silicate จะให้ประสิทธิภาพดีกว่า Kaoline ในกรรมวิธีที่ 2 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินA 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.1 g จะพบการตายของหนอนกระทู้ผัก 60% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 7 เอ็นไซม์ไคติเนสในรูปผงจากไคตินB 0.1 กรัม + Aluminium silicate 0.05 g หนอนมีการตาย 57.50 % ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสซ้ำในหนอนไขผึ้ง เนื่องจากไม่มีหนอนกระทู้ผักเพียงพอในการทดลองเพราะอยู่ในช่วงโควิด โดยใช้หนอนไขผึ้งวัยที่ 2 โดยได้เพิ่มกรรมวิธีอีก 2 กรรมวิธี เพื่อดูผลของ Aluminium silicate และ Kaoline ว่ามีผลต่อการตายของหนอนหรือไม่ พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนไขผึ้งน้อยมาก ไม่มีความแตกต่างกับวิธีควบคุม ต่อมาเมื่อเข้าสู่ภาวะปกติจึงได้ทำการทดสอบกับหนอนกระทู้ผักซ้ำอีกครั้งพบว่า Aluminium silicate และ Kaoline มีผลทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักเมื่อนำไปผสมกับเอ็นไซม์ไคติเนส และได้มีการทดลองหาค่าความเข้มข้นของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 50% ซึ่งอยู่ในระหว่างดำเนินการทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้นต่างๆ และเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผสมสารปรุงแต่งที่อัตราส่วนต่างๆ บางวิธีการเมื่อเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์จะมีผลทำให้การตายของหนอนเพิ่มขึ้น แต่ไม่เสมอไป และจากตารางจะพบว่าหนอนกระทู้ที่ทดสอบด้วย Kaoline เพียงอย่างเดียว สามารถทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 20% ทั้งนี้เนื่องจากเกาลีนมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลงด้วย ทุกกรรมวิธีไม่ทำให้หนอนตายถึง 50% สูงสุดเพียง 25% ทั้งนี้อาจจะมาจากปริมาณเอ็นไซม์ไคติเนสที่มีไม่มากพอ เนื่องจากข้อจำกัดในการผลิตเอ็นไซม์จากเครื่อง freeze dry ในหน่วยงาน ที่เป็นเครื่องขนาดเล็ก จึงไม่สามารถผลิตเอ็นไซม์เป็นจำนวนมากๆได้ ซึ่งในการทดลองต่อไปควรจะผลิตเอ็นไซม์จากเครื่อง freeze dry ขนาดใหญ่ ที่สามารถผลิตเอ็นไซม์จำนวนมากๆ ได้ภายในระยะเวลาสั้นๆ เพื่อที่สามารถนำไปเป็นต้นแบบเชิงพาณิชย์ได้

9. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถขยายผลทดสอบในแปลงทดลอง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแนะนำให้เกษตรกรใช้ในแปลงผัก
2. สามารถขยายผลในเชิงพาณิชย์ โดยพัฒนาการผลิตเอ็นไซม์เป็นจำนวนมากๆ ด้วยวิธีการที่เหมาะสม

10. คำขอบคุณ :

ขอขอบคุณ คุณศรีจิตรา กลันทกานนท์ ว่าที่ ร.ต.ชนินทร์ นาคขำ คุณอัจฉรา ซอวงศ์ นักวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ช่วยเหลือในการทดลอง

กรมวิชาการเกษตร

11. เอกสารอ้างอิง :

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง: นิวคลีโอโดลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Binod, P., R.K. Sukamaran, S.V. Shirke, J.C. Rajput and A. Pandey. 2007. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against Helicoverpa armigera. J. of Applied Micrology. 103:1845-1852

Karthik, N., K. Akanksha, P. Binod abd A. Pandey. 2014. Production, purification and properties of fungal chitinase. Indiean Journal of Experiment Biology. 52: 1025-1035.

Kramer, K. L. and S. Muthikrishnan, 1997. Insect Chitinases: Molecular biology and potential use as pesticides. Insect Biochem. Molec. 27: 887-900.

Rustiguel, C.B., J.A. Jorge and L.H.S. Guimaraes. 2012. Optimization of the Chitinase Production by Different Metarhzium anisopliae Strains under Solid-State Fermentation with Silkworm Chrysalis as Substrate Using CCRD. Advances in Microbiology. 2:268-276.

Sahai A. S. and M. S. Manocha. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite intereaction. FEMS Microbial. Rev. 11: 317-338.

Vijayakumar N., S. Alagar, N. Madanagopal. 2017. Biocontrol potential of fungal chitinase from high yielding Trichoderma viride against Corcyra cephalonica (stainton)

Wo, J.H., S. Ali., S.X. Ren. 2010 Evaluation of Chitinase from Metarhizium anisopliae as Biopesticide agaust Plutella xylostella. Pakistan J. Zool. 42(5): 521-528.

12. ภาคผนวก

การวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์ไคติเนส

ชุด kit ประกอบด้วย

Assay buffer **(A4855)**	20ml
4-Nitrophenol N-acetyl-β-D-glucosaminide **(no.N9376)**	10mg
4-Nitrophenol N,N'-diacetyl- β-D-chitobioside **(no.N6133)**	5mg
4-Nitrophenol β –D-N,N',N"-triacetylchitotriose **(no.N8638)**	1mg
Chitinase from *Trichoderma viride* **(C6242)**	1mg
p-Nitrophenol Solution 10mM **(N7660)**	1ml
sodium carbomate **(S2127)**	1g

กรมวิชาการเกษตร

Reagent และอุปกรณ์ที่ต้องเตรียมเอง

1. Dulbecco's Phosphate buffer saline (PBS) **(no.D8537)**
2. ultrapure water
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 405 nm
4. 96 well plate
5. water bath 37 องศาเซลเซียส
6. For macrophages lysis **(no.C2978)**

การเตรียมสาร

1.Stop Solution

- เติม 24 ml ultrapure water ใน sodium carbonate **(no.S2127)**
- ทำให้ละลายโดยใช้ magnetic จนละลาย
- เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.Substrate Solution(s) (1mg/ml)

-ละลาย 1 mg 4-Nitrophenol N-acetyl-β-D-glucosaminide **(no.N9376)**ใน 1ml ของ Assay Buffer **(A4855)**

-ละลาย 1 mg 4-Nitrophenol β –D-N,N',N"-triacetylchitotriose **(no.N8638)**ใน 1ml ของ Assay Buffer **(A4855)**

-ละลาย 1 mg 4-Nitrophenol N,N'-diacetyl- β-D-chitobioside **(no.N6133)**ใน 1ml ของ Assay Buffer **(A4855)**

กรมวิชาการเกษตร

1ml ของสารละลายเพียงพอสำหรับ ~10 ปฏิกิริยา mix สารละลายด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง

Substrate ละลายยากในบัฟเฟอร์ อาจใช้เวลานานประมาณ 1 ชั่วโมง ในการเขย่าเพื่อให้สารละลาย ละลายสมบูรณ์ เก็บสารละลายบนน้ำแข็งระหว่างทำการทดลอง (เก็บไวที่-20 องศาเซลเซียส เก็บได้นาน 1 เดือน)

3.Chitinase Control Enzyme

- เติม 5 ml ของ PBS ในขวด Chitinase **(no.C6242)**
- จะได้ไคติเนสความเข้มข้น 0.2mg/ml
- Vortex จนสารละลาย

- เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส (เก็บได้นาน 3 เดือน)
- ก่อนใช้ให้ dilute 20 เท่า ด้วย PBS และเก็บบนน้ำแข็ง

4.Strandard Solution

- dilute 5 μl ของ 10 mM สารละลาย *p*-Nitrophenol **(no.N7660)** ด้วย 995 μl ของ stop solution
- Vortex
- เก็บบนน้ำแข็ง

5. Sample preparation

- ตัวอย่างเอ็นไซม์ เตรียมโดย centrifuge อาหารที่เลี้ยงเชื้อราไว้
- ถ้าเป็น มนุษย์ แมคโคฟาจ โปรตีน ต้องย่อยด้วยชุดคิท ก่อน **(no.C2978)**

6.Procedure

- chitinase hydrolysis จะทำในสภาวะเป็นกรด pH ประมาณ 4-8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- การ hydrolysis enzyme จะปลดปล่อย *p*-Nitrophenol
- เมื่อใส่ stop solution จำทำให้เกิด ionization ของ *p*-Nitrophenol ได้เป็นสีเหลือง
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm^3

-การหา total activity ของ ไคติเนส จะใช้สับสตรท 3 ตัว ที่มากับชุดคิท

4-Nitrophenol N-acetyl-β-D-glucosaminide **(no.N9376)**

4-Nitrophenol β –D-N,N',N"-triacetylchitotriose **(no.N8638)**

4-Nitrophenol N,N'-diacetyl- β-D-chitobioside **(no.N6133)**

กรมวิชาการเกษตร

วิธีการทดสอบ

1. ชั่งตัวอย่าง 0.01 ละลายด้วย ultrapure water 10 μl
2. บ่ม substrate solution และ standard solution ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
3. set plate reader ที่ 405 nm
4. ใส่ reaction components ใน 96 well plate ตามตาราง 1 แล้ว mix โดยใช้ไปเปต

	Substrate Solution	Sample	Standard Solution
Blank*	100 μl	-	-
Standard**	-	-	300 μl
Positive Control***	90-99 μl	1-10 μl of chitinase control enzyme	-
Test	90-99 μl	1-10 μl of sample	-

5. ใส่ Substrate ก่อนตามด้วยเอ็นไซม์
6. บ่ม plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา30 นาที (สามารถลดเวลาได้)
7. stop reaction โดยใส่ 200 μl ของ stop reaction ไปในแต่ละ well ยกเว้น wells ที่มี Standard Solution เขย่าจะได้เป็นสีเหลือง
8. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ภายใน30 นาที

วิธีคำนวณ

นิยาม เอ็นไซม์ 1 ยูนิต หมายถึง กิจกรรมของเอ็นไซม์ไคติเนสที่สามารถปลดปล่อย *p*-Nitrophenol 1μ mole ภายใต้สภาวะที่กำหนด (pH 4.8 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส)

$$\text{Units/ml} = \frac{(A_{405}\text{sample} - A_{405}\text{blank}) \times 0.05 \times 0.3 \times DF}{A_{405}\text{standard} \times \text{time} \times V_{enz}}$$

A_{405}sample=ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง ที่ 405 nm

A_{405}blank= ค่าการดูดกลืนแสงของ blank ที่ 405 nm

0.05= μmole/ml ของ *p*-Nitrophenol ใน standard solution

0.3=ปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาใน 96well plate หลังจากเติม stop solution (ml)

DF=อัตราส่วนระหว่างปริมาตรสุดท้ายและปริมาตรเริ่มต้นของเอ็นไซม์ไคติเนส

กรมวิชาการเกษตร

A_{405}standard= ค่าการดูดกลืนแสงของ standard solution ที่ 405 nm

Time= เวลา (นาที)

V_{enz}= ปริมาตรของตัวอย่าง (ml)

กรมวิชาการเกษตร