การศึกษาไคติเนสของแบคทีเรีย รา และ *Streptomyces* และการใช้ประโยชน์ในการควบคุมโรคพืช

Chitinase of bacteria, fungi and *Streptomyces* and their uses in fungal control

มัทนา ศรีหัตถกรรม [1] นางนลินี ศรีวิกร [2]

บทคัดย่อ

สามารถโคลนยีนและถ่ายฝากยีนไคติเนสของแบคทีเรียเข้าใน pET 100/D-TOPO vector ได้ 6 ยีน และโคลนยีนราได้ 1 ยีน คือ *chi*A ของ *Serratia marcescens, chi*B ของ *S. marcescens*, *chi*C ของ *Pseudomonas aeruginosa*, *chb*(beta-N-acetylhexosaminidase , chitobiase) ของ *S. marcescens*, *chi* ของ *Klebsiella* sp. TPIMC, *basic chi* ของ *S. marcescens* และ *chi*A ของ *Aspergillus oryzae* ได้กรรมวิธีการแยกสกัดไคติเนสค่อนข้างบริสุทธิโดยการใช้ DEAE-cellulose chromatography ร่วมกับ size exclusion chromatography และโดยวิธี affinity chromatography และสามารถผลิตไคติเนสในถังหมักโดยใช้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไคติเนสที่ 37 °ซ , การกวน 200 รอบ/นาที, pH 7 และ pO_2 80 % เป็นเวลา 4-6 ชม. crude recombinant chitinase ของ *basic chi S. marcescens* และ *chiA S. marcescens* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราโรคพืช 3 เชื้อ ได้แก่ *Botryodiplodia theobromae, Pyricularia oryzae* และ *Fusarium oxysporum* และสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราโรคพืชได้อย่างสมบูรณ์

คำนำ

การระบาดของโรคและแมลง เป็นประเด็นปัญหาสำคัญของการเกษตรของประเทศไทยและทั่วโลก ทำให้ผลผลิตตกต่ำ ด้อยคุณภาพ การป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชที่นิยมปฏิบัติมักใช้สารเคมี ทำให้เกษตรกรเจ็บป่วยมีสุขภาพอ่อนแอ และถูกกีดกันทางการค้าจากประเทศคู่ค้าในเรื่องสารพิษตกค้าง ซึ่งกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างมาก ทั้งในเรื่องการรักษาพยาบาล การส่งออกผลิตผลทางการเกษตร และการพึ่งพาต่างประเทศในการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชที่ประเทศไทยผลิตเองไม่ได้ เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ประเทศในต่างประเทศได้หันไปใช้ bio-pesticide ซึ่งไม่มีพิษตกค้าง และได้มีการผลิตขายเป็นการค้าแล้ว แทนสารเคมีกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช หรือใช้ผสมกับสารเคมีกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช เพื่อลดการใช้สารเคมีกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช ซึ่งได้ผลดี ปัจจุบันประเทศไทยได้ตระหนักถึงผลเสียของการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช จึงผลักดันให้มีการลดการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชลง โดยจัดสรรงบประมาณให้ตั้งโรงงานผลิต bio-pesticide และเร่งรัดให้มีการค้นหาชีวภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของโรคและแมลงศัตรูพืชมาใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และเพื่อการส่งออกชีวภัณฑ์ที่ผลิตได้ในประเทศ สนับสนุนให้เกิดธุรกิจชีวภาพ และเป็นปัจจัยของเศรษฐกิจพอเพียง ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์กำจัดโรคและแมลงศัตรูพืชที่ผลิตจำหน่ายในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ สารปฏิชีวนะ สารพิษ ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis, Bacillus* spp., *Trichoderma* spp. เป็นหลัก เช่น chitinolytic และ glucanolytic enzyme บริสุทธิ์จากเชื้อ

---

1 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

Trichoderma spp. (http://link.springer-ny.com/link/service/journals/10123/contents/01/00001/paper/s101230100001 ch110.htm) subtilin จาก *B. subtilis* (Sonenshein,1993) และไคติเนสจากบาซิลัส (ปุณฑริกาและมณฑารพ, 2505) เนื่องจากผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์สามารถอกฤทธิ์ย่อยผนังเซลล์ของราโรคพืชและแมลงซึ่งมีไคตินสูงถึงร้อยละ 5-20 (http:/www.psrc.usm. Edu/macrog/sea/chitin.htm) ทำให้ราและแมลงศัตรูพืชหยุดชงักการเจริญเติบโตหรือตายไป นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ยังมีโครงสร้าง และ kinetic properties หลากหลายรูปแบบทำให้มีโอกาสรอดพ้นจากปฏิกิริยาการยับยั้งของพืชได้(http://link.springer-ny.com/link/servicejournals10123/contents/01/0001papers/1012301230100001 ch110.htm) ผลิตภัณฑ์ชีวภัณฑ์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์อื่นๆที่มีศักยภาพในการกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช ที่ยังไม่ได้นำมาศึกษาในเชิงลึกและยังไม่ได้นำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ยังมีอยู่มาก(มัทนา,2548; (http://www.ag.auburn.edu/argentina/ pdfmanuscripts/rovera.pdf), United States Patent 6,797,507) ผลจากการทดลองของมัทนา และคณะ(2548) พบว่า จุลินทรีย์หลายสกุลย่อยสลายไคตินในเปลือกกุ้ง กระดองปู และแกนในปลาหมึก และไคตินในอาหารดีมาก จึงเป็นไปได้ว่า สารชีวภัณฑ์ที่ย่อยไคตินดีจะมีศักยภาพสูงในการกำจัดราโรคพืช จำเป็นต้องศึกษาในเชิงลึก เพื่อสนองนโยบายของประเทศ และเพื่อประโยชน์ต่อเกษตรกรต่อไป

ไคติเนสเป็น glycoside hydrolases ซึ่งจะ hydrolyse ß-1,4-glycosidic bond ระหว่าง *N*-acetylglucosamine residues ของไคติน ประกอบด้วย catalytic domain และ non catalytic domain(มีตำแหน่งอยู่บน N- หรือ C- terminal ทำหน้าที่จับไคติน) จำแนก catalytic domain เป็น 2 Family ใหญ่ คือ Family18 และ Family19 โดยการเปรียบเทียบความเหมือนของ amino acid sequence, โครงสร้างและ mechanism ต่างๆของไคติเนส Family18 เป็น family ใหญ่ พบมากใน eukaryotes, prokaryotes และ virus (http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac= IPR001579; Jolles and Muzzarelli, 1999) ใน family นี้ มีไคติเนสและโปรตีนอื่นหลากหลายชนิด เช่น endochitinase, exochitinase, chitodextrinase, chitobiase, chitinase A, B, C และ D(Jolles and Muzzarelli, 1999) และพบว่า conserved glutamate ซึ่งเป็น residue สุดท้ายของ active site เกี่ยวข้องกับ catalytic mechanism และอาจจะทำหน้าที่เป็น proton donor (http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac= IPR001579; Tsujibo *et al*., 2002) นอกจากนี้ยังแบ่งเป็น class ต่างๆ ได้แก่ classI ไคติเนสจะย่อยสลาย cell wall ของแบคทีเรีย และมีคุณสมบัติในการเข้าไปจับไคติน ได้แก่ ไคติเนสของราและพืช classII ไม่ย่อยสลาย cell wall ของแบคทีเรีย และไม่มีคุณสมบัติในการเข้าไปจับไคติน มีบทบาทในการเป็น fungal elicitors ซึ่งจะไปกระตุ้นให้พืชสร้างภูมิต้านทาน เป็นต้น ส่วน Family19 พบมากในพืช เช่น มันฝรั่ง ถั่วลันเตา ฯ และ *Streptomyces griseus* และ *Haemophilus influenzae* ได้มีการสกัดเอนไซม์ chitinase และ glucanase ของ *Trichoderma* spp. ให้อยู่ในรูปบริสุทธิ์ ออกจำหน่ายเป็นสารออกฤทธิ์กำจัดรา ซึ่งสามารถนำไปใช้ร่วมกับสารเคมีกำจัดรา เช่น azoles, bensimidazoles และ pyrimidines และร่วมกับตัวเชื้อ *Trichoderma* spp. เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถย่อยผนังเซลล์ของราโรคพืชได้หลายชนิด และมีโครงสร้าง และ kinetic properties หลากหลายรูปแบบ ทำให้มีโอกาสรอดพ้นจากปฏิกิริยาการยับยั้งของพืชได้(http://link.springer-ny.com/link /service/ journals /10123/contents/01/0001/papers/1012301230100001ch110.htm) ไคติเนสมีคุณสมบัติในการย่อยสลายไคติน ได้เป็นไคโตซาน(N-acetylglucosamine) chitobiose น้ำตาล glucosamine แบบต่างๆ (Alexander, 1961, Jolles and Muzzarelli, 1999) ซึ่ง ไคติน ไคโตซาน chitobiose และ glucosamine มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เป็นพิษ

ต่อคน สัตว์ พืช ปลา และสิ่งมีชีวิตทั้งหลาย มีระดับความเป็นพิษเท่ากับน้ำตาลทราย เป็น biodegradable มีคุณสมบัติเป็น strong positive charge, metal ion binding, biocompatibility และ bioactivity(http://www. halosource.com/ corporate/platforms/chitosan/uses.shtm, http://www. Highbeam.com/library//doc1.asp? docid=1G1:41251403) จะพบไคติเนสในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา เห็ด เอคติโนมายซีส แมลง พืช และสัตว์(Tsujibo *et. al,*1998) ไคติเนสแต่ละชนิดมี catalytic activity แตกต่างกัน ไม่เท่ากัน (Wiseman, 1995; มัทนา และคณะ, 2548) ซึ่งถ้าได้ไคติเนสที่ย่อยสลายไคตินในผนังเซลล์ของราได้ดี จะเป็นประโยชน์ต่องานทางด้านการป้องกันกำจัดโรคพืช จะช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดโรคพืชลงได้ทำให้สินค้าเกษตรปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และต้นทุนต่ำ สามารถแข่งขันได้ในเวทีการค้าต่างประเทศ ลดการพึ่งพาจากต่างประเทศ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากรรมวิธีการผลิตไคติเนสจากแบคทีเรีย รา และ *Streptomyces* spp. โดยเทคโนโลยีชีวภาพ
2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะของไคติเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย รา และ *Streptomyces*
3. เพื่อศึกษาการใช้ไคติเนสในการกำจัดราโรคพืช

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. hot start high-fidelity DNA polymerase
2. primer
3. restriction enzyme
4. expression vector
5. expression host(*E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* pTGLM , *Saccharomyces cerevisiae* หรือ *Pichia*
6. IPTG
7. benzamidine
8. sodium azide
9. ammonium sulfate
10. potassium phosphate buffer
11. LB
12. Sabourdox medium
13. PMSF 0.2 mM
14. DEAE-cellulose chromatography
15. glycol-chitin
16. chitin ผง

17. colloidal chitin
18. Calcoflour white M2R
19. congro red
20. 30 % acylamide/ 0.8 % bisacrylamide gel
21. ammonium persulfate
22. TEMED
23. butanol
24. Coomassie Blue R-250
25. lysozyme
26. lactose
27. sodium acetate
28. N-acetylglucosamine(NAG) และอื่นๆ
29. Amplicilin
30. dialysis bag
31. citric acid
32. *p*-Dimethylaminobenzaldehyde
33. glacial acetic acid
34. hydrochloric acid
35. potassium tetraborate
36. dibasic sodium phosphate
37. McIlvaine buffer
38. sonicator
39. kinetic spectrophotometer

วิธีดำเนินการ

1. การศึกษากรรมวิธีการผลิตไคติเนสจากแบคทีเรีย รา และ *Streptomyces* spp. โดยเทคโนโลยีชีวภาพ

ดำเนินการตามลำดับดังนี้

1.1 การโคลนยีนไคติเนสจากแบคทีเรียและรา

1.2 การถ่ายฝากยีนและการเหนี่ยวนำให้ผลิตไคติเนส

1.3 การศึกษาการแยกสกัดไคติเนสบริสุทธิ์จาก expression clone

1.4 การผลิตไคติเนสในถังหมัก

1.1 การโคลนยีนไคติเนสจากแบคทีเรียและรา

วิธีการ

- สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียและสกัดอาร์เอ็นเอของรา

- เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไคติเนสโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์และตรวจสอบยีนที่โคลนได้

- purify PCR product

- โคลนยีนตามวิธีการที่ระบุไว้ในชุด Kitของบริษัทกิปไทยและบริษัท Clontech

1.2 การถ่ายฝากยีนและการเหนี่ยวนำให้ผลิตไคติเนส

ดำเนินการตามวิธีการที่แสดงไว้ในชุดถ่ายฝากยีนของบริษัทกิบไทย เหนี่ยวนำให้ผลิตไคติเนสโดยใช้ IPTG 1 mM เป็นเวลา 5-6 ชม. ที่ 37 ซ 200 รอบ/นาที ตรวจสอบโปรตีนที่ผลิตได้โดยวิธี SDS-PAGE

1.3 การศึกษาการแยกสกัดไคติเนสบริสุทธิ์จาก expression clone

ดำเนินการศึกษาการแยกสกัดไคติเนสบริสุทธิจาก expression clone ที่มียีน *basic chi* เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำให้ไคติเนสของยีนอื่นบริสุทธิต่อไป

วิธีการ

ทำให้เซลล์แบคทีเรีย(BL21 ที่ได้รับยีน *basic chi*)แตกโดยวิธี freeze-thaw และโดยใช้เครื่อง sonicator จากนั้นนำส่วนใสไปตกตะกอนโปรตีนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต ข้ามคืนที่ 4 °ซ ปั่นเหวี่ยงแยกโปรตีนออกจากแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วละลายตะกอนโปรตีนด้วย 1X 250 mM NaH_2PO_4 ผสม 2.5 M NaCL แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธี

1. Ni-NTA Purification kit
2. DEAE-cellulose chromatography ร่วมกับ size exclusion chromatography
3. โดยวิธี affinity chromatography

1. Ni-NTA Purification kit

ศึกษาการแยกและสกัดไคติเนสบริสุทธิ์จาก expression โคลน โดยใช้ Ni-NTA Purification System และตรวจสอบไคติเนสที่ได้โดยวิธี SDS-PAGE วิธีการตามที่แนบมากับชุด kit ของบริษัทกิบไทยและบริษัท GE Healthcare

2. DEAE-cellulose chromatography ร่วมกับ size exclusion chromatography

ดำเนินการดังนี้

1. เตรียม TOYOPEARL DEAE-650M cellulose Ion exchange resins และ TOYOPEARL HW-55 (size exclusion chromatography resin) ตามวิธีการที่แนบมากับสินค้า

2. เติมไคติเนสลงใน DEAE resin เขย่าเบาๆที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. เพื่อให้ไคติเนสเกาะติดกับเรซินให้มากที่สุด

3. บรรจุ resin ลงใน column

4. ชะล้าง (wash) ไคติเนสด้วยสารละลายความเข้มข้นและ pH ต่างๆ ได้แก่ 20-250 mM imidazole ใน 100 mM NaCl + 50 mM NaH2PO4 pH 7.0

5. เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมา มาตรวจสอบผลโดยวิธี SDS-PAGE

6. รวมส่วนใสที่ค่อนข้างบริสุทธิเข้าด้วยกัน นำมาผ่าน size exclusion chromatography column

7. ชะล้าง (wash) ไคติเนสด้วยสารละลาย 100 mM NaCl + 50 mM NaH2PO4 pH 7.0 20 มล. เก็บส่วนใส ครั้งละ 1 มล.

8. วัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Brad ford และตรวจสอบผลโดยวิธี SDS-PAGE

3. affinity chromatography โดยใช้ ไคโตซาน เป็นตัวจับเอนไซม์(absorbent)

มีวิธีการดังนี้

ตักไคโตซาน 1 ช้อนใส่ลงในน้ำโปรตีน 5 มล. เขย่าเบาๆบนเครื่องเขย่า 1 ชม. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน หรือนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 ซ 8,000 รอบ/นาที 1 นาที ดูดส่วนใสเก็บไว้ ล้างไคโตซาน 4 ครั้งด้วย

100 mM NaCl + 50 mM NaH2PO4 + 20 mM Immidazole pH6.6

100 mM NaCl + 50 mM NaH2PO4 + 40 mM Immidazole pH6.6

100 mM NaCl + 50 mM NaH2PO4 + 60 mM Immidazole pH6.6

100 mM NaCl + 50 mM NaH2PO4 + 80 mM Immidazole pH6.6

เก็บส่วนใสของแต่ละการล้าง สุดท้ายทำการชะล้าง 3 ครั้ง ด้วย

100 mM NaCl + 50 mM NaH2PO4 + 100 mM Immidazole pH 9.0

100 mM NaCl + 50 mM NaH2PO4 + 250 mM Immidazole pH 9.0

100 mM NaCl + 50 mM NaH2PO4 + 500 mM Immidazole pH 9.0

เก็บส่วนใสของแต่ละการชะล้าง วิเคราะห์โปรตีนโดย SDS-PAGE

หรือล้างไคโตซาน 4 ครั้ง ด้วย 50 mM Tris-HCl pH7 (เติม 50 mM Tris-HCl pH7 ลงในไคโตซาน เขย่าเบาๆ 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 ซ 8,000 รอบ/นาที 1 นาที แล้วเก็บส่วนใส) ชะล้าง 7 ครั้ง ด้วย

20 mM NaCl + 50 mM Tris-HCl pH8

40 mM NaCl + 50 mM Tris-HCl pH8

60 mM NaCl + 50 mM Tris-HCl pH8

80 mM NaCl + 50 mM Tris-HCl pH8

100 mM NaCl + 50 mM Tris-HCl pH8

250 mM NaCl + 50 mM Tris-HCl pH8

500 mM NaCl + 50 mM Tris-HCl pH8

เก็บส่วนใสของแต่ละการชะล้าง วิเคราะห์โปรตีนโดย SDS-PAGE

1.4 การผลิตไคติเนสในถังหมัก

วิธีการ

1. เลี้ยงเชื้อ BL21 Star(DE3) ที่ได้สอดแทรกยีน basic chi จาก *Serratia marcescens* ไว้แล้วในอาหาร LB+ ampicillin ข้ามคืน OD 0.8- 1.0

2. เติมเชื้อในข้อ1 ลงในอาหาร LB+ ampicilin ในถังหมัก ปริมาณ 10 % ของปริมาตรอาหาร

3. ตั้งอุณหภูมิ, การกวน, pH และ $pO_{2(\text{ค่าออกซิเจน ที่ละลายน้ำ})}$ ในการหมัก ที่อุณหภูมิ 37 °ซ , การกวน 200 รอบ/นาที, pH 7 และ pO_2 80 %

4. เมื่อเชื้อเจริญถึง O.D.600 0.6-0.8 เติมครึ่งหนึ่งของ 1 mM IPTG ลงในถังหมัก เพื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตไคติเนส และเติม IPTG ที่เหลือหลังจากการเติมครั้งแรก 1 ชม.

5. เก็บเชื้อทุกชั่วโมงจนถึง T8 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสทิ้งให้หมด

6. ใช้ปลายทิปตักเชื้อปริมาณเท่ากันของแต่ละชั่วโมงมาผสมกับ 1 X loading buffer นำไปต้มใน

น้ำเดือดนาน 10 – 15 นาที

7. ตรวจสอบผลโดยวิธี SDS-PAGE

2. การศึกษาคุณลักษณะของไคติเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย รา และ *Streptomyces*

ได้ทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสที่ค่อนข้างบริสุทธิที่แยกได้(partly purified chitinase) ในการย่อยไคโตซาน 2 วัน เปรียบเทียบกับ ไลโซซามที่สามารถย่อยไคโตซานได้ดีมาก ตรวจสอบน้ำตาล NAG ที่ได้โดยใช้ bromocresol purple pH 4.7 (NAG มี pH เป็นด่าง ทำให้ bromocresol purple ที่เป็นกรดเปลี่ยนเป็นด่างสีม่วง)

3. การศึกษาการใช้ไคติเนสกำจัดราโรคพืช

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยราโรคพืช

วิธีการ

ทำการผสมไคติเนสกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว(Salt medium / Sabourdox medium) จากนั้นทำการถ่ายราโรคพืชลงในอาหาร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบปฏิกิริยาการยับยั้งการเจริญของราโรคพืชทุกวัน

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของราโรคพืช

วิธีการ

ทำการผสมไคติเนสกับสปอร์ของราโรคพืช 2 เชื้อ คือ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium oxysporum* จากนั้นดูดส่วนผสมไปหยดลงบนอาหาร Malt extract agar บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบเส้นใยบนอาหารทุกวัน

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสในการยับยั้งโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง และผลพริก

วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย Polyethylene glycol (50 % Polyethylene glycol + 2.5 mM DTT(DL-Dithiothreitol) + 25 mM Tris-HCl pH 8.0 + ampicilin 100 มก./ล.)

2. ละลาย crude protein ไคติเนสของ *Ochrobactrum* sp. pI ด้วยสารละลาย Polyethylene glycol 5 มล. (มีความเข้มข้น 4.12 ug /ul)

3. ผสมสารละลาย crude protein ไคติเนสของ *Ochrobactrum* sp. pI กับน้ำสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ในอัตราส่วน 1:1

3. นำไปหยดลงบน ผลมะม่วง และผลพริกแล้วใช้เข็มเขี่ยเกลี่ยให้ทั่วผล ทำ 3 ซ้ำ

control มี 2 ลักษณะ คือ

ผลมะม่วง และผลพริก + สปอร์ของ *C. gloeosporioides* ในสารละลาย Polyethylene glycol

ผลมะม่วง และผลพริก + น้ำอบฆ่า

4. บ่มเชื้อในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ภายในบรรจุน้ำ ที่อุณหภูมิห้อง ทำการฉีดพ่นน้ำและระบายอากาศ 3 ครั้ง/วัน บันทึกผลการทดลองทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ crude recombinant chitinase ของ *basic chi Serratia marcescens* และ *chiA S. marcescens* ในการยับยั้งการเจริญของราโรคพืช 3 เชื้อ ได้แก่ *Botryodiplodia theobromae, Pyricularia oryzae* และ *Fusarium oxysporum*

วิธีการ

ดำเนินการโดยวิธี dual plate technique ความเข้มข้นของโปรตีน Basic chi เท่ากับ 20.8 µg/µl และ ChiA 28.7 µg/µl ทำ 6 ซ้ำ

3.4 ทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสในการยับยั้งโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง และผลพริก

วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย Polyethylene glycol (50 % Polyethylene glycol + 2.5 mM DTT (DL-Dithiothreitol) + 25 mM Tris-HCl pH 8.0 + ampicilin 100 มก./ล.)

2. ละลาย crude protein ไคติเนสของ *Ochrobactrum* sp. pI ด้วยสารละลาย Polyethylene glycol 5 มล. (มีความเข้มข้น 4.12 ug /ul)

3. ผสมสารละลาย crude protein ไคติเนสของ *Ochrobactrum* sp. pI กับน้ำสปอร์ของ *C. gloeosporioides* ในอัตราส่วน 1:1

3. นำไปหยดลงบน ผลมะม่วง และผลพริกแล้วใช้เข็มเขี่ยเกลี่ยให้ทั่วผล ทำ 3 ซ้ำ

control มี 2 ลักษณะ คือ

ผลมะม่วง และผลพริก + สปอร์ของ *C. gloeosporioides* ในสารละลาย Polyethylene glycol

ผลมะม่วง และผลพริก + น้ำอบฆ่า

4. บ่มเชื้อในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ภายในบรรจุน้ำ ที่อุณหภูมิห้อง ทำการฉีดพ่นน้ำและระบายอากาศ 3 ครั้ง/วัน บันทึกผลการทดลองทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาที่ดำเนินการ ต.ค. 2554 ถึง ก.ย. 2557

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การศึกษากรรมวิธีการผลิตไคติเนสจากแบคทีเรีย รา และ *Streptomyces* spp. โดยเทคโนโลยีชีวภาพ

1.1 การโคลนยีนไคติเนสจากแบคทีเรียและรา

1. สามารถโคลนยีนและถ่ายฝากยีนไคติเนสของแบคทีเรียเข้าใน pET 100/D-TOPO vector ได้ 6 ยีน และโคลนยีนราได้ 1 ยีน คือ

ยีนของแบคทีเรีย

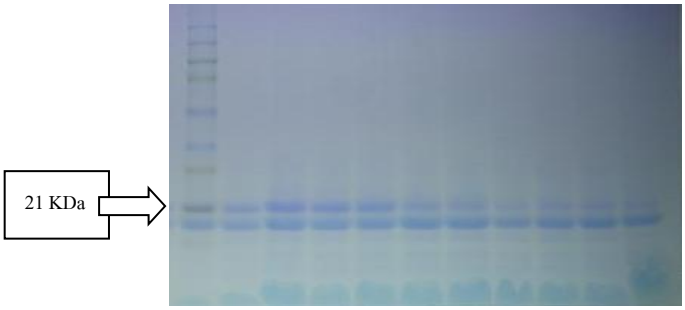
1. *chi*A ของ *Serratia marcescens*
2. *chi*B ของ *S. marcescens*
3. *chi*C ของ *Pseudomonas aeruginosa*
4. *chb*(beta-N-acetylhexosaminidase , chitobiase) ของ *S. marcescens*
5. *chi* ของ *Klebsiella* sp. TPIMC
6. *basic chi* ของ *S. marcescens*

ยีนของรา 1 ยีน

1. *chi*A ของ *Aspergillus oryzae*

1.2 การถ่ายฝากยีนและการเหนี่ยวนำให้ผลิตไคติเนส

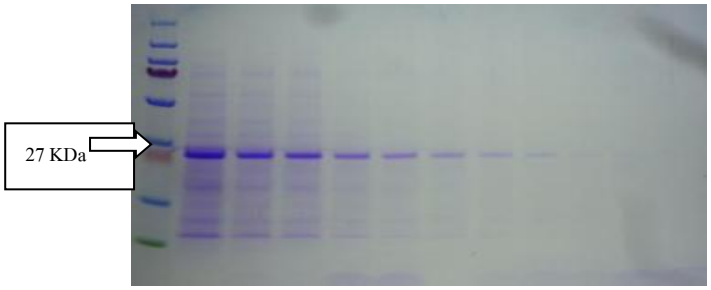
สามารถเหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไคติเนสที่ 4-6 ชม. โดยใช้ IPTG 1 mM ที่ 37 ซ บนเครื่องเขย่า 200 รอบ/นาที เมื่อ BL21 มีการเจริญที่ OD600 0.6-0.8 ในอาหาร LB+ ampicillin ได้ Basic chi 21 KDa (เลนที่1 คือ โปรตีนมาตรฐาน เลนที่ 2-10 คือ ไคติเนสที่ 0 - 9 ชม. ตามลำดับ

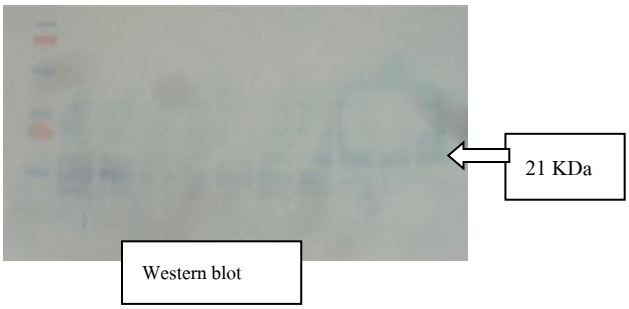


1.3 การศึกษาการแยกสกัดไคติเนสบริสุทธิ์จาก expression clone

1. ไม่สามารถแยกสกัดไคติเนสบริสุทธิโดยการใช้ชุด Ni-NTA Purification kit เนื่องจากโปรตีนเกาะเม็ด bead น้อย ทำให้ได้โปรตีนเป้าหมายน้อย

2. สามารถแยกสกัดไคติเนสบริสุทธิบางส่วนโดยการใช้ DEAE-cellulose chromatography ร่วมกับ size exclusion chromatography และโดยวิธี affinity chromatography (ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ทั่วไปในการแยกสกัดโปรตีน) แต่มีปัญหาตรงขนาดโมเลกุลของไคติเนสที่ได้จะไม่คงที่ จะอยู่ระหว่าง 17-27 KDa ขนาดโมเลกุลของโปรตีน Basic chi ที่มีรายงานไว้คือ 21 KDa(เลนที่1 คือ โปรตีนมาตรฐาน เลนที่2 คือ Flow through แลนที่3-6 คือ wash 1-4 ลนที่ 7-12 คือ elute)

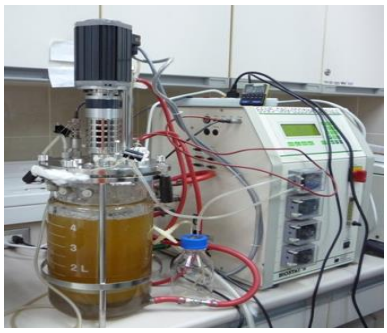




1.4 การผลิตไคติเนสในถังหมัก

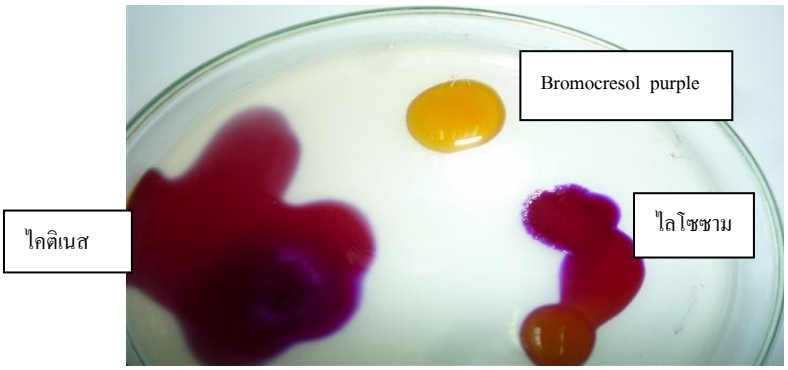
สามารถผลิตไคติเนสในถังหมักโดยใช้ 1 mM IPTG เหนี่ยวนำให้ BL21 ผลิตไคติเนสที่ 37 °ซ , การกวน 200

รอบ/นาที, pH 7 และ pO_2 80 % เป็นเวลา 4-6 ชม.



2. การศึกษาคุณลักษณะของไคติเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรีย รา และ *Streptomyces*

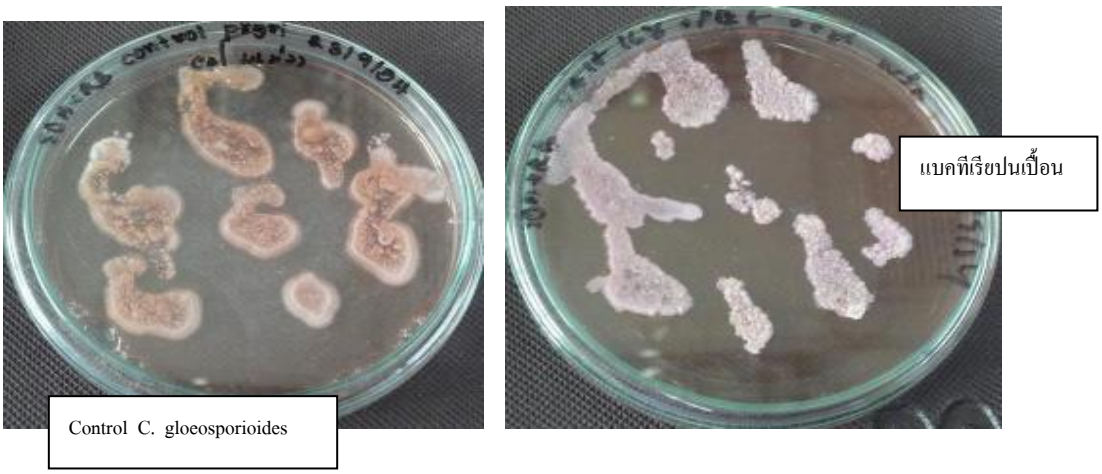
ประสิทธิภาพของไคติเนสที่ค่อนข้างบริสุทธิที่แยกได้ในการทดลองนี้ ในการย่อยไคโตซาน เปรียบเทียบกับไลโซซาม พบว่า มีประสิทธิภาพดีพอกับไลโซซาม ทำให้ น้ำตาล NAG เปลี่ยนเป็นสีม่วง



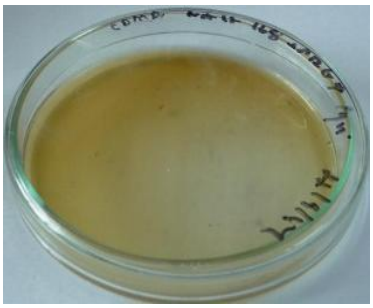
3. การศึกษาการใช้ไคติเนสกำจัดราโรคพืช

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

พบว่ามีการยับยั้งการเจริญของเส้นใยอย่างสมบูรณ์

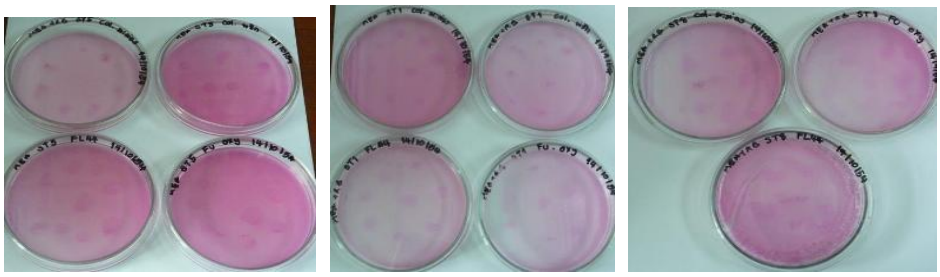


Control P. oryzae



3.2 ทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของราโรคพืช

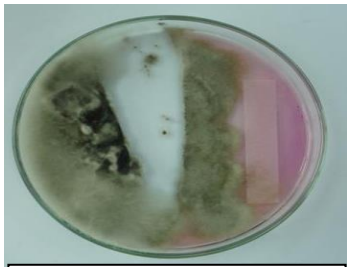
พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของราโรคพืชได้อย่างสมบูรณ์



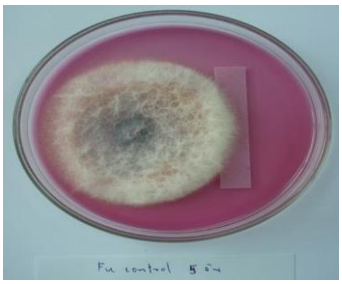
3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ crude recombinant chitinase ของ *basic chi S. marcescens* และ *chiA S. marcescens* ในการยับยั้งการเจริญของราโรคพืช 3 เชื้อ ได้แก่ *B. theobromae, P. oryzae* และ *F. oxysporum*

พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของราโรคพืชได้ดีมาก ทำให้เส้นใยราโรคพืชหยุดการเจริญหรือมีการเจริญช้าลงมาก

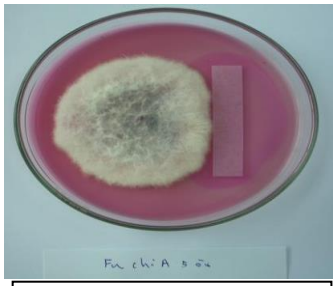
Botryodiplodia theobromea (control)



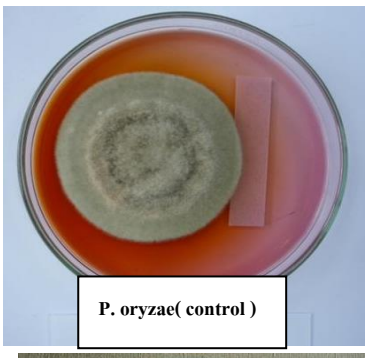
ChiA + Botryo : 5 วันหลังใส่ ChiA



Fusarium oxysporum (control)

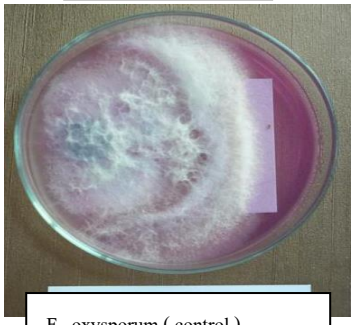


ChiA + Fu : 5 วันหลังใส่ ChiA



P. oryzae(control)

ChiA + Pyri. : 5 วันหลังใส่ ChiA



F. oxysporum (control)

Basic chi + Fu (5 วันหลังใส่ Basic chi)

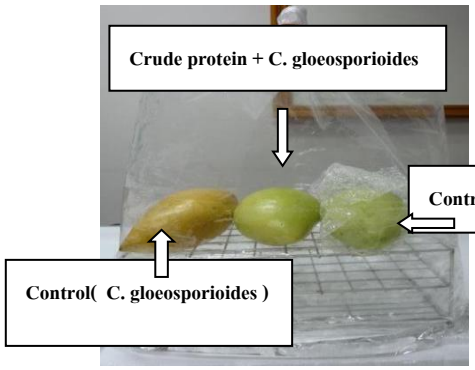
3.4 ทดสอบประสิทธิภาพของไคติเนสในการยับยั้งโรคแอนแทรคโนสบนผลมะม่วง และผลพริก

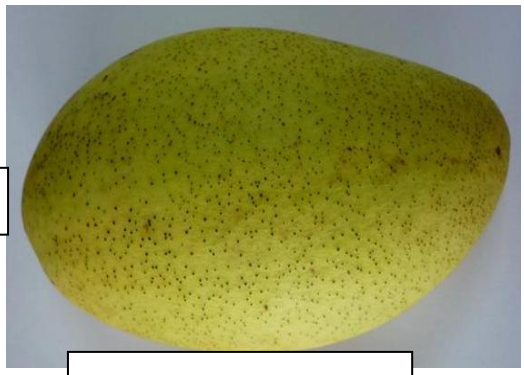
1. ใน Control(C. gloeosporioides) polyethylene glycol ทำให้ผลมะม่วงสุกเร็วชั่วเพียงข้ามคืน ทำให้เหมาะสมต่อการเข้าทำลายผลมะม่วงของรา C. gloeosporioides ทำให้เกิดแผลเน่าเละบนผลมะม่วง

2. Control น้ำกลั่น มะม่วงยังสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค

3. Crude protein + C. gloeosporioides ผลมะม่วงสุก ทำให้เกิดแผลเล็กๆจำนวนมาก แผลไม่ขยายตัว

4. บนผลพริก Crude protein + C. gloeosporioides ยับยั้งการเจริญของโรคดีมาก ไม่เกิดโรค ส่วน control เกิดแผลขนาดใหญ่





Crude protein + C. gloeosporioides

กรรมวิธีการทดสอบบนผลพริก

การนำผลการทดลองไปใช้ประโยชน์

1. นำกรรมวิธีที่ได้ศึกษาไปผลิตไคติเนสโดยเทคโนโลยีชีวภาพ

2. ไคติเนสที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไคโตซาน และไคตินดีมาก สามารถนำไปใช้ในการผลิตไคโตซานสายสั้น เพื่อใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรและอุตสาหกรรม

3. ได้ไคติเนสที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดราโรคพืชในผลมะม่วง พริกและ ในข้าว สามารถนำไปผลิตเป็น bio-pesticide

เอกสารอ้างอิง

ปุณฑริกา เภสัชชา และ มณฑารพ ยมาภัย. 2005. การโคนยีนและการแสดงออกของบาซิลัสไคติเนสใน *Escherichia coli*. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18-20 October 2005.

มัทนา ศรีหัตถกรรม หทัยรัตน์ อุไรรงค์ บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และพยุงศักดิ์ รวยอารีย์. 2548. การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อการใช้ประโยชน์. ใน: รายงานโครงการวิจัยที่สิ้นสุดปี 2548 สำหรับผู้บริหาร. กรมวิชาการเกษตร.

Barboza-Corona, J. E., E. Nieto-Mazzocco, R. Velazquez-Robledo, R. Salcedo-Hernandez, M. Bautista, B. Jimenez and J. E. Ibarra. 2003. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol*. 69(2) 1023-1029.

Cottrell, M. T., D. N. Wood, L. Yu and D. L. Kirchman. 2000. Selected chitinase gene in cultured and uncultured marine bacteria in the α- and -subclasses of the Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (3) : 1195-1201.

Folders, J., J. Algra, M. S. Roelofs, L. C. van Loon, J. Tommassen and W. Bitter. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein. *J. Bacteriol.* 183(24) : 7044-7052.

Folster, J. P. and T. D. Connell. 2002. The extracellular transport signal of the *Vibrio cholerae* endochitinase(ChaiA) is a structural motif located between amino acids 75 and 555. *J. Bateriol.* 184(8) : 2225-2234.

Gupta, R., R. K. Saxena, P. Chaturvedi, J. S. Virdi. 2008. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cellwal lysis. *J. Appl. Microbiol*. 78(4) : 378-383.

Inglis, P. W., J. F. Peberdy and R. E. Sockett. 2000. Cloning of a chitinase gene from *Ewingella americana,* a pathogen of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus. Genet. Mol. Biol*. 23(3). Download article in PDF format.

Jolles, P. and R. A. A. Muzzarelli (eds.). 1999. Chitin and chitinases. Birkhauser Verlag. Berlin.

Kobayashi, D. Y., R. M. Reedy, J. A. Bick and P. V. Oudemans. 2002. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. . *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (3) : 1047-1054.

Lonhienne, T., K. Mavromatis, C. E. Vorgias, L. Buchon, C. Gerday and V. Bouriotis. 2001. Cloning, sequences, and characterization of two chitinase genes from the Antarctic *Arthrobacter* sp. strain TAD 20: isolation and partial characterization of the enzymes. *J. Bacteriol.* 183(5) : 1773-1779.

Mahadevan, B. and D. L. Crawford. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enz. Microb. Technol*. 20(7) : 489-493.

Miyamoto, K., E. Nukui, H. Itoh, T. Sato, T. Kobayashi, C. Imada, E. Watanabe, Y. Inamori, and H. Tsujibo. 2002. Molecular analysis of the gene encoding a novel chtin binding protease from *Alteromonas* sp. Strain 0-7 and its role in the chitinolytic system. *J. Bacteriol*. 184(7) : 1865-1872.

Naranong, N. 1997. Production and characterization of chitinolytic enzymes from microorganisms. Ph.D thesis. Kasetsart University, Bangkok.

Saito, A., T. Fujii, T. Yoneyama, M. Redenbach, T. Ohno, T. Watanabe and K. Miyashita. 1999. High-multiplicity of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63(4) : 710-718.

Sonenshein, A. C., J. A. Hoch and R. Losick. 1993. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria : biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

Teotia, S., R. Lata and M. N. Gupta. 2004. Chitosan as a macroaffinity ligand purification of chiitinases by affinity precipitation and aqueous two-phase extraction. *J. Chromatography A.* 1052 : 85-91.

Tsujibo, H., H. Orikoshi, H. Tanno, K. Fujimoto, K. Miyamoto, C. Imada, Y. Okami and Y. Inamori. 1993. Cloning, sequence, and expression of a chitinase gene from a marine bacterium, *Altermonase* sp. Strain O-7. *J. Bacteriol*. 175 : 176-181.

Wang S-L., T-C Yieh and I-L Shih, 1999. Production of antifungal compounds by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shimp and crab shell powder as a carbon source. *Enz. Microb. Technol.* 25(1-2) : 142-148.

…….