



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การควบคุมแมลงศัตรูโดยใช้ serine proteinase inhibitors สกัดจากพืช
Control of Phytophagous Insect Pests Using Plant Serine Proteinase Inhibitors

โดย พนิดา อติเวทิน และคณะ

ธันวาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การควบคุมแมลงศัตรูโดยใช้ serine proteinase inhibitors สกัดจากพืช
Control of Phytophagous Insect Pests Using Plant Serine Proteinase Inhibitors

ผู้วิจัย

สังกัด

- | | |
|----------------------------|-----------------------|
| 1. พนิดา อติเวทิน | มหาวิทยาลัยมหาสารคาม |
| 2. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 3. ศิวิลัย สิริมังครารัตน์ | มหาวิทยาลัยขอนแก่น |

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

การศึกษา serine proteinase inhibitors ในเมล็ดตำลึง พบว่าสารสกัดจากเมล็ดตำลึงมีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin 2 ชนิด เรียกเป็น CGTI-I และ CGTI-II มีหน่วยการยับยั้งที่จำเพาะต่อเอนไซม์ trypsin คือ 8.21 และ 28.07 U/mg ตามลำดับ ซึ่ง CGTI-II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3303.69 เมื่อนำไปทดสอบกับหนอนกระทู้ผักในความเข้มข้น 3, 6, 9, และ 12 TIU/g diet เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าสารสกัด Trypsin Inhibitors (TIs) จากเมล็ดตำลึง ทำให้น้ำหนักหนอนกระทู้ผักในวันที่ 10 หลังการได้รับสาร ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 9 TIU/g diet และ 12 TIU/g diet น้ำหนักหนอนลดลง 18.59 % และ 31.51 % และทำให้หนอนตาย 11.0 % และ 15.0 % น้ำหนักดักแด้ลดลงประมาณ 25 % เมื่อหนอนได้รับสารความเข้มข้น 9 TIU/g diet และ 12 TIU/g diet สาร TIs ความเข้มข้น 6, 9 และ 12 TIU/g diet ทำให้การวางไข่ของผีเสื้อลดลงอย่างมาก คือ 59.88 %, 61.73 %, และ 63.21 % ตามลำดับ

ในเมล็ดมะระจีนพบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin 2 ชนิด เรียกเป็น MCTI-1 และ MCTI-2 และพบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ elastase 1 ชนิดเรียกเป็น MCEI-1 ซึ่งมีหน่วยการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ของ MCTI-1 และ MCTI-2 เท่ากับ 81 และ 117 U/mg หน่วยการยับยั้งเอนไซม์ elastase ของ MCEI-1 เท่ากับ 147.80 U/mg ขนาดโมเลกุลของ MCTI-1, MCTI-2 และ MCEI-1 เท่ากับ 3270, 3335 และ 3169 Da ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบกับหนอนเจาะสมอฝ้าย พบว่าการได้รับ TIs จากสารสกัดเมล็ดมะระจีน ทำให้น้ำหนักหนอนเจาะสมอฝ้ายลดลงอย่างเห็นได้ชัด การได้รับสารระดับ 6 TIU/g diet ทำให้มีหนอนตายถึง 40 % เมื่อหนอนได้รับสารเข้มข้น 12 TIU/g diet ทำให้น้ำหนักดักแด้ลดลงประมาณ 33 % ส่วนการตายของดักแด้นั้นพบว่า ความเข้มข้น 6 และ 9 TIU/g diet ทำให้ดักแด้ตาย 22.0% และ 26.0% ตามลำดับ สาร TIs ความเข้มข้น 6, 9 และ 12 TIU/g diet ทำให้การวางไข่ของผีเสื้อลดลง 51.78 %, 67.67%, และ 65.48 % ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น ยังทำให้การฟักออกจากไข่ลดลงอย่างมาก คือ 69.82 %, 98.87 %, และ 95.96 %ตามลำดับ การที่สารสกัด trypsin inhibitors จากเมล็ดพืชทั้ง 2 ชนิด เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก (ประมาณ 3000 Da) ทำให้มีความเป็นไปได้ค่อนข้างง่ายในการที่จะสอดแทรกชิ้นส่วนเปปไทด์เข้าไปเนื้อเยื่อของพืชเศรษฐกิจเพื่อกระตุ้นให้พืชเศรษฐกิจเหล่านั้นมีความสามารถในการป้องกันตัวเองและทำลายแมลงศัตรูสำคัญ เช่น หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้ผักได้ต่อไป

Abstract:

In this study, serine proteinase inhibitors extracted from Ivy gourd seed and Thai bitter gourd were analyzed. Ivy gourd seed extracted showed CGTI-I and CGTI-II with trypsin inhibitory activity 8.21 and 28.07 U/mg. CGTI-II was further analyzed and its molecular weight was 3303.69 Da. Trypsin inhibitors from ivy gourd was tested with common cutworm in concentrations 3, 6, 9, and 12 TIU/g diet compared with control (artificial without TIs). Larvae fed on diet containing the 9 TIU/g diet and 12 TIU/g diet of CGTIs showed reduction in weight by about 18.59 % and 31.51 % after 10 days of feeding as compared with larvae fed on control diet. Highest larval mortality of 15.0 % was observed in larvae fed on diet containing 12 TIU/g diet. Pupal weight was reduced in a dose-dependent manner by about 25 % until 9 TIU/g diet. Egg laying capacity of adult females reduced significantly from an average of 810 eggs/female (control) to 298 eggs/female (12 TIU/g diet).

Extracted from Thai bitter gourd showed MCTI-1 and MCTI-2 with trypsin inhibitory activity, another was MCEI-1 with elastase inhibitory activity. Their units were 81, 117 U/mg and 147.80 U/mg, respectively. The MCTI-1 and MCTI-2 showed molecular weight 3270 and 3335 Da, MCEI-1 showed 3169 Da. In larval feeding studies, Trypsin inhibitors from Thai bitter gourd was found to retard growth and development of *H. armigera*. Highest larval mortality of 40 % was observed in larvae fed on diet containing 6 TIU/g diet. Pupal weight was reduced in a dose-dependent manner by about 33 % at the highest dose of MCTIs as compared with control. Highest pupal mortality of 26 % was observed in larvae fed on diet containing 9 TIU/g diet. Fertility was drastically affected as the egg-laying incidence reduced from 365 eggs/female (control) to 118 eggs/female (9 TIU/g diet). Hatching of larvae from eggs was reduced from 88 % in control to 61 % (3 TIU/g diet), 26 % (6 TIU/g diet), 1 % (9 TIU/g diet), and 3 % (12 TIU/g diet). Being small peptides (about 3000 Da), it would be easy to express them in plants to confer protection against devastating pests such as *H. armigera* and *S. litura*.

Executive summary

Serine proteinase inhibitors from seed of Ivy gourd and Thai bitter gourd were identified. Ivy gourd seed extracted showed CGTI-I and CGTI-II with trypsin inhibitory activity 8.21 and 28.07 U/mg. CGTI-II was further analyzed and its molecular weight was 3303.69 Da. Thai bitter gourd showed MCTI-1 and MCTI-2 with trypsin inhibitory activity, another was MCEI-1 with elastase inhibitory activity. Their units were 81, 117 U/mg and 147.80 U/mg, respectively. The MCTI-1 and MCTI-2 showed molecular weight 3270 and 3335 Da, MCEI-1 showed 3169 Da. Trypsin inhibitors from Thai bitter gourd and Ivy gourd seeds can cause deleterious effects on growth and development of *H. armigera* and *S. litura*. Experimental data is provided which clearly shows reduction in fertility and fecundity of insects due to antifeedant properties of trypsin inhibitors. Being small peptides, it would be easy to express them in plants to confer protection against devastating pests such as *H. armigera* and *S. litura*.

วัตถุประสงค์

ศึกษาศาสตร์สกัด serine proteinase inhibitors จากเมล็ดพืชในตระกูลแตง (Cucurbitaceae) ได้แก่ มะระขี้นก และตำลึง นำไปทดสอบการควบคุมการเจริญเติบโตของ หนอนกระทู้ผัก และ หนอนเจาะสมอฝ้าย

วิธีทดลอง

พืชที่ใช้ในการทดลอง

- เมล็ดมะระขี้นก Thai bitter gourd; *Momordica charantia* Linn
- เมล็ดตำลึง Ivy gourd; *Coccinia grandis* Linn Voigt

แมลงที่ใช้ในการทดลอง

- หนอนกระทู้ผัก Common cutworm; *Spodoptera litura* Fabricius
- หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicovera armigera* (Hubner)

การทดลองครั้งนี้แบ่งงานออกเป็น 6 ส่วน คือ

ส่วนที่ 1 การปลูกมะระขี้นกและตำลึง

เก็บผลสุกของมะระขี้นกและตำลึง มาล้างเอาส่วนของเมล็ดนำเมล็ดแช่น้ำก่อนนำไปเพาะ 12 ชั่วโมงเพาะเมล็ดในถาดเพาะใช้ดินผสมเป็นวัสดุปลูกรดน้ำวันละครึ่ง จนอายุต้นกล้า 30 วัน ใช้พื้นที่ในการปลูกตำลึงและมะระขี้นก กว้าง 5 เมตร ยาว 10 เมตร ทำขนาดแปลง 30 x 400 ซม. ระยะห่างระหว่างแถว 80 ซม. จำนวน 5 แถว ย้ายต้นกล้าลงปลูกในแปลง ใช้ระยะห่างระหว่างต้น 50 ซม. ทำค้างให้ตำลึงและมะระขี้นก หลังย้ายปลูก 10 วัน และใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 เมื่อต้นกล้ามียอายุ 20 วันหลังย้ายปลูก มะระขี้นกเริ่มติดดอกเมื่ออายุ 45 วันหลังย้ายปลูก

ส่วนที่ 2 การศึกษาการเจริญเติบโต และวงจรชีวิต ของหนอนกระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

เก็บหนอนกระทู้ผักและหนอนเจาะสมอฝ้าย จากแปลงผักเกษตรกรรมมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกในห้องปฏิบัติการควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C แยกเลี้ยงในกล่องพลาสติก 1 ตัว/กล่อง ให้อาหารเป็นใบถั่วลิสงที่เก็บมาจากแปลงที่หนอนเคยอาศัยอยู่ เลี้ยงหนอนประมาณ 3-5 วัน หนอนจะเริ่มเข้าสู่ระยะดักแด้ (Pupa) ระยะเวลาเป็นดักแด้ 10-12 วัน จากนั้นพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย (Adult) นำตัวเต็มวัยมาใส่

กล่องพลาสติกใหญ่ เพื่อให้ผสมพันธุ์และวางไข่ (egg) ระยะเวลาที่ตัวเต็มวัยวางไข่ 3-4 วัน โดยจะวางไข่ตามใบพืชที่วางไว้ให้และจับตัวเต็มวัยออก ศึกษาระยะไข่ฟักเป็นตัวหนอน ใช้ระยะเวลา 3-4 วัน จนกระทั่งพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตหนอนกระทู้ผัก

หนอนที่ฟักออกจากไข่ ถูกนำเลี้ยงหนอนในกล่องพลาสติก ให้อาหารเป็นใบถั่วลิสงที่เก็บมาจากแปลงเกษตรกรที่หนอนเคยอาศัยอยู่ เมื่อหนอนพัฒนาเป็นวัย 2 จับแยกเลี้ยงในกล่องขนาดใหญ่ขึ้น กล่องละประมาณ 50 ตัว เมื่อหนอนพัฒนาเป็นวัย 3 หนอนจะกินอาหารเยอะและโตเร็วมากจึงจับแยกเลี้ยงในกล่องๆ ละ 20 ตัว จากการสังเกตหนอนวัย 3 การมีชีวิตรอดน้อยลง หากเลี้ยงรวมกันในกล่อง เนื่องจากหนอนจะกัดกันตาย เมื่อหนอนพัฒนาเป็นวัย 4 จับหนอนแยกเลี้ยงเดี่ยวในกล่องพลาสติก เส้นผ่าศูนย์กลาง 4 ซม. หลังจากที่หนอนลอกคราบเป็นวัย 5 หนอนจะเริ่มกินอาหารได้น้อยลงและตัวก็จะหดเล็กลงเข้าสู่ระยะดักแด้

ส่วนที่ 3 การสกัดโปรตีนจากเมล็ดมะระจีนก และเมล็ดตำลึง

รวบรวมผลมะระจีนกและผลตำลึงที่สุกแก่เต็มที่ จากแปลงเกษตรกรทั่วไปและผลผลิตจากแปลงปลูก นำมาหั่น 48 h ล้างเมล็ดให้สะอาด นำไปอบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 12 h กะเทาะเปลือก แยกเอาเนื้อเมล็ดไปปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นผลไม้ เมล็ดมะระจีนก 100 g มีส่วนของเปลือก 51 g และส่วนของเนื้อเมล็ด 49 g ส่วนเมล็ดตำลึง 100 g มีส่วนของเปลือก 41.03 g และส่วนของเนื้อเมล็ด 43.59 g

การแยกกาก สี และไขมันออกจากเมล็ดมะระจีนกและเมล็ดตำลึง

เนื้อเมล็ดปั่นละเอียดนำมาแยกกาก สี และไขมันออก ด้วยการแช่ใน acetone อัตราส่วน 1:5 w/v โดยใช้เครื่อง stirrer ปั่นตลอดเวลา 1 h ในครั้งแรก และนาน 5 h ในครั้งที่ 2 หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง โดยใช้เครื่อง refrigerated centrifugator ที่ 4400 rpm, 20 min, 4 °C นำส่วนที่ตกตะกอนจากการ centrifuged มาทำให้เป็นผงแห้ง (dried pellet)

การสกัดโปรตีนจากเมล็ดมะระจีนก และเมล็ดตำลึง

นำผงแห้งของเมล็ดพืชที่แยกกาก สี และไขมันออกแล้ว มาสกัดด้วย Tris-HCl (pH 8) บัฟเฟอร์ อัตราส่วน 1: 10 w/v โดยใช้เครื่อง stirrer นาน 2 h ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifugator ที่ 7000 rpm, 20 min, 4 °C นำ supernatant ไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C, 10 min แยกส่วนด้วยเครื่อง refrigerated centrifugator ที่ 7000 rpm, 20 min, 4 °C เอาส่วน supernatant มาปรับ pH เป็น 3.5 ด้วย HCl เพื่อตกตะกอนโปรตีนที่ไม่ต้องการ และแยกส่วนด้วยเครื่อง refrigerated centrifugator ที่ 7000 rpm, 20 min, 4 °C เอาส่วน supernatant ไปทำให้เป็นผงด้วย เครื่อง Freeze-Dryer เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

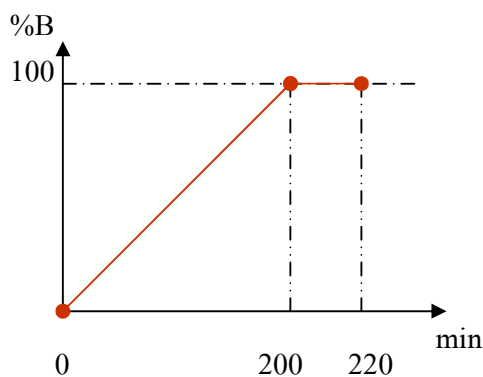
ส่วนที่ 4 การแยก Trypsin inhibitors

4.1 การแยก Trypsin inhibitors ด้วยเทคนิค Ion Exchange Chromatography

โดย resin ที่เป็นตัวจับกับประจุบวก (Cation-exchanger) ได้แก่ SP-toyopearl column และ Carboxymethyl cellulose column (CM52) และ Mobile phase: liquid ได้แก่ 10 mM Sodium Acetate (CH_3COONa) pH 3.5 และ 0-1M Sodium Chloride (NaCl) เป็น mobile phase ที่ใช้ elute สารตัวอย่าง

วิธีการเตรียม Ion exchange chromatography column

1. ล้าง resin ด้วย 0.1 M NaOH จากนั้นล้างด้วย 0.1 N HCl ปรับสมดุลด้วย 10 mM CH_3COONa
2. เท resin ลงใน column (2 x 21 mm; Tosoh, Tokyo, Japan) จากนั้นโหลดสารละลายลงใน Column
3. เตรียม buffer A (10 mM CH_3COONa) และ buffer B (1 N NaCl ในสารละลาย 10 mM CH_3COONa) เพื่อแยกสารละลายออกจาก column โดยตั้งสภาวะการทำงานของเครื่องดังนี้



Time (min)	%A	%B	Flow rate (ml/min)
0	100	0	3
200	0	100	3
220	0	100	3

โดยผสม Cation exchanger กับ buffer (10 mM CH_3COONa) จากนั้นนำไปเทลง column และล้างด้วย start buffer จะได้ column ที่พร้อมจะใช้งาน ภายหลังการเติม sample ลงใน column ทำการ elute ด้วย 0-1M NaCl ที่เปลี่ยนแปลง ionic strength ของ elution buffer โดยทำ gradient elution

แบบ continuous เก็บตัวอย่างไล่หลอดทดลองตามการตั้งค่า คือสารที่แยกด้วย SP-toyopearl column เก็บตัวอย่างหลอดละ 6 ml ตั้งค่าการไหลของ elution buffer เป็น 3 ml/min และ CM52 column เก็บตัวอย่างหลอดละ 2 ml ตั้งค่าการไหลของ elution buffer เป็น 1 ml/min เมื่อได้สารที่ผ่านการ elute ด้วย 0-1 M NaCl แล้วนำแต่ละหลอดที่เก็บตัวอย่างไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 nm และทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ของสารสกัดที่แยกด้วยปฏิกิริยา BApNA เมื่อพบสาร Trypsin inhibitors (TIs) ทำการเก็บตัวอย่างหลอดที่มี TIs โดยแยกตาม fraction ที่แสดงกิจกรรมของ TIs นำตัวอย่าง TIs ของแต่ละ fraction ไปทดสอบหาหน่วยการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin (TI-Unit) ด้วยปฏิกิริยา BAEE (N_α -Benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride) และกรองสารตัวอย่างด้วย 0.2 μ m Cellulose acetate filter ก่อนที่จะนำไปแยกด้วยเทคนิค RP-HPLC เพื่อให้ได้ TIs ที่บริสุทธิ์มากขึ้น ส่วนสาร TIs ที่เหลือหลังผ่านการแยกด้วยเทคนิค IEC นำไปแยกสารละลาย NaCl (desalting) ออกด้วยเทคนิค Size-exclusion chromatography

4.2 การแยกสารด้วยเทคนิค Size-exclusion chromatography

การแยกสาร TIs ออกจากสารละลาย NaCl โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล โดย stationary phase เป็นแผ่น membranes (1000 NMWL) ขนาดของรูพรุน (Millipore) โดยใช้เครื่อง Ultrafiltration membrane ของ amicon 8400 (76 mm filter diameter Millipore ; Pmax 75 psi, 5.3 kg/cm² ปริมาตร 400 ml) และ amicon 8200 (63.5 mm filter diameter Millipore ; Pmax 75 psi, 5.3 kg/cm² ปริมาตร 200 ml) ซึ่งสารที่มีขนาดใหญ่ (TIs) ไม่สามารถผ่านรูพรุนของ membrane ได้ ในขณะที่สารที่มีขนาดเล็ก (NaCl) ผ่านเข้าไปในรูพรุนของ membrane ทำให้สารละลาย NaCl ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าสาร TIs ที่สกัดได้จากเมล็ดพืชหลุดออกไป ในการแยกสารครั้งนี้ Stationary phase: แผ่น membrane 1000 NMWL ส่วน Mobile phase: gas คือ ก๊าซไนโตรเจน (N₂ gas)

เมื่อแยกสารละลาย NaCl ออกจาก TIs หหมดแล้วนั้น นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดย Lowry และตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin โดยปฏิกิริยา BApNA ก่อนนำสาร TIs ที่ได้ไป freeze dry และนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก

4.3 การแยกสารด้วยเทคนิค Reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

โดย Inertsil 5 μ m, 4.6 x 250 mm Column เมื่อเอาตัวอย่าง load ลงบน column ใช้ Mobile phase: liquid คือ 0.1%TFA (Trifluoroacetic acid) + 1% Acetonitrile และ elute ด้วย 0.1 %TFA ใน 99% Acetonitrile เก็บ peak ของสารที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค RP-HPLC ไป freeze dry และละลายด้วย 300 μ l ของ 10 mM NH₄HCO₃ (Ammonium Hydrogen Carbonate) ทดสอบหากิจกรรมของ TIs ด้วยปฏิกิริยา BApNA และวิเคราะห์หา TIU ด้วยปฏิกิริยา BAEE เก็บ peak ที่มีการแสดงออกของ

TIs สูงมาผ่านการแยกด้วยเทคนิค RP-HPLC อีกครั้ง freeze dry และละลายด้วย 300 μ l ของ 0.1 % TFA นำสารที่ได้ไปทดสอบหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค Mass spectrometry

4.4 การตรวจสอบหาน้ำหนักโมเลกุลของ Trypsin inhibitor ด้วยเทคนิค Mass spectrometry (MS)

Mass spectrometry เป็นเทคนิคการตรวจวิเคราะห์โดยใช้หลักการตรวจวัดมวลโมเลกุลของไอออนอิสระในสถานะสุญญากาศสูง ซึ่งวิธี MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) ใช้กับเครื่อง Bruker Autoflex III TOF mass spectrometer การหามวลโมเลกุล (molecular mass) โดยเตรียมตัวอย่าง ปริมาตร 1 μ l ผสมกับ 1 μ l ของ SA (30 mg sinapinic acid ใน 0.1% TFA 1 ml) เปรียบเทียบกับ 1 μ l Aminoethyl indole ผสมกับ 1 μ l ของ SA ที่เป็นสารมาตรฐาน หดสารมาตรฐานและสารตัวอย่างลงใน plate ปลอ่ยให้แห้งนำไปตรวจสอบหา MW ด้วยเครื่อง Bruker Autoflex III TOF mass spectrometer

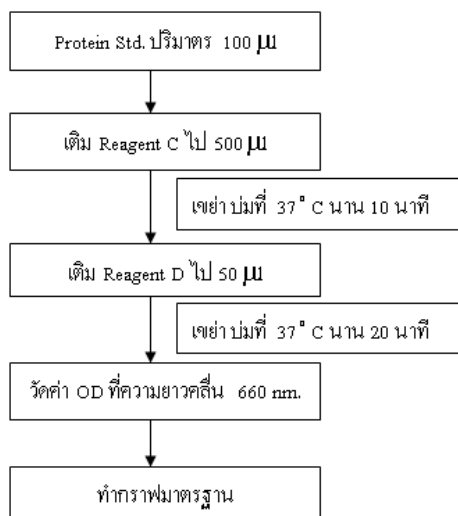
ส่วนที่ 5 การวิเคราะห์ Trypsin Inhibitors จากสารสกัดเมล็ดพืช

หลังผ่านการแยกด้วยเทคนิค IEC มีการวิเคราะห์ข้อมูลของสารที่สกัดได้ คือ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin และคำนวณหน่วยการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin

5.1 ปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน

ในการทดลองนี้ได้วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน ตามวิธีการของ Lowry (Folin-Ciocalteu; 1951) โดยวัดพันธะเปปไทด์ ที่ค่าดูดกลืนแสง 660 nm ซึ่งเป็นการใช้สารในปริมาณน้อย โดยโปรตีนที่ใช้วัดมีกรดอะมิโนชนิดไทโรซีนเป็นส่วนประกอบ และการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm เป็นวิธีการตรวจสอบการทำงานของกรดอะมิโนพวกแอมิโนกรดโดยเฉพาะกรดอะมิโนชนิดฟีนิลอะลานีน และไทโรซีนดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ซึ่งเป็นวิธีที่เร็ว ตัวอย่างไม่ถูกทำลายแต่จะได้ค่าไม่ถูกต้องเท่ากับวิธีอื่น ดังนั้นจึงทำการเลือกใช้ทั้ง 2 วิธีในการตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนที่แน่นอนและความเป็นไปได้ของโปรตีนที่พบหลังการสกัด โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

5.1.1 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีน โดยวิธีการของ Lowry เตรียมโปรตีนมาตรฐาน (Protein Standard) ดังนี้ เตรียม Reagent A และ Reagent B ตามสัดส่วน จากนั้นเตรียม Reagent C โดยนำ Reagent A ผสมกับ Reagent B ในสัดส่วน 50:1 เตรียม Reagent D โดยสัดส่วนของ folin : น้ำกลั่น (1:1) และเตรียม Protein Std. ที่ความเข้มข้น 1mg/ml ของ BSA แบ่งสัดส่วนของ Protein Std. ที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 μ g/ml เติมสัดส่วนสารตามขั้นตอน ดังนี้



เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสง 660 nm ของ Protein Standard ที่ความเข้มข้น 0-600 µg/ml นำค่าที่ได้ไปทำการพลาตรฐานได้สูตรการคำนวณโปรตีนของสารสกัด คือ

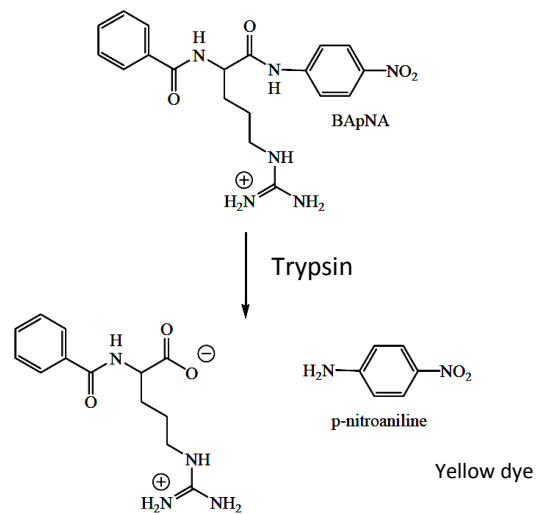
$$Y = 0.0013X + 0.1404$$

นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนตามขั้นตอน และเข้าสู่สูตรคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนจากสารสกัดที่ได้จากเมล็ดพืช

5.1.2 การวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm นำสารสกัดที่แยกได้แต่ละหลอดไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm แสดงค่าเป็นความเข้มข้นโปรตีนที่แยกได้จากสารสกัด

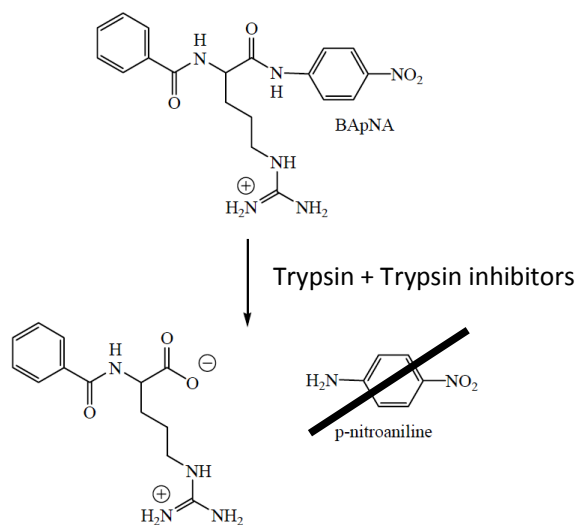
5.2 การวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin โดยปฏิกิริยา BApNA

โดยปกติแล้วเอนไซม์ Trypsin มีหน้าที่ย่อยโปรตีนหรือสารตั้งต้นในส่วนของกระเพาะอาหารได้เป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย หลักการทำงานของเอนไซม์ Trypsin ที่ทำปฏิกิริยากับ BApNA (N-Benzoyl-DL-Arg-p-nitroanilide hydrochloride) แล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-Benzoyl-DL-arginine กับ p-nitroaniline ซึ่งให้สีเหลือง ดังภาพที่ 2



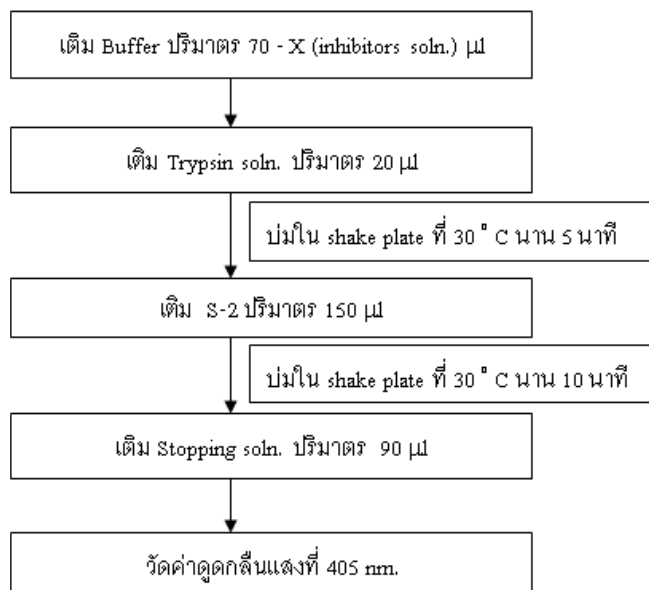
ภาพที่ 2 แสดงการทำงานของเอนไซม์ Trypsin

Trypsin inhibitors จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Trypsin ทำให้มีผลิตภัณฑ์น้อยลง จนกระทั่งอาจไม่เกิดผลิตภัณฑ์เลย ทำให้ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 nm ได้ มีปฏิกิริยาดังนี้(ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงการทำงานของ Trypsin inhibitors

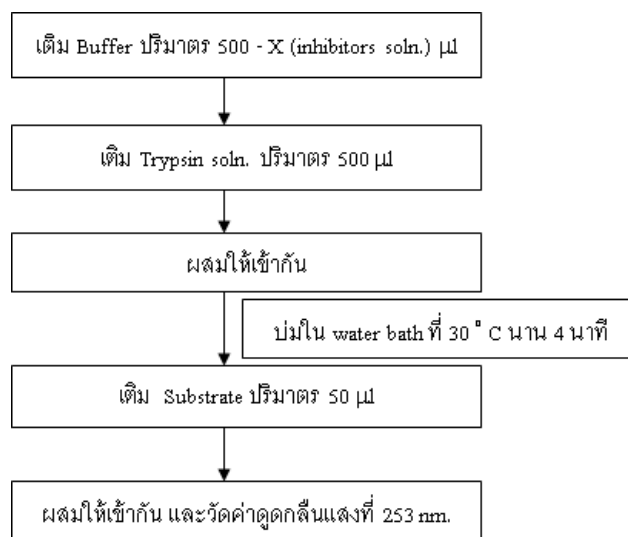
นำสารสกัดที่แยกได้ มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ด้วยปฏิกิริยา BApNA (Dwijendra and Srinivasa, 2006) โดยหยดสารละลาย 0.05 M Tris-HCl (เติม 0.02M CaCl_2) pH 7.5 (Buffer) ลงใน micro plate เติมสารที่สกัดได้ (Inhibitor solution) ลงไปตามสัดส่วนที่เหมาะสม เติมเอนไซม์ Trypsin (Trypsin solution) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ใน shake plate นาน 5 นาที จากนั้นเติมสารตั้งต้นคือ BApNA (S-2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ใน shake plate นาน 10 นาที หยุดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วย 30% Acetic acid (Stopping solution) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง micro-plate reader โดยมีสัดส่วนของสารที่ทดสอบดังนี้



นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากเมล็ดพืช แสดงกิจกรรมยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Trypsin จากสารสกัดที่แยกได้

5.3 การวิเคราะห์หน่วย (unit) ยับยั้งเอนไซม์ Trypsin โดยปฏิกิริยา BAEE (Atiwetin et al., 2006)

ขั้นตอนการวิเคราะห์คือ เติม Trypsin solution (T-2) ลงใน Cuvette ตามด้วยสารสกัดจากเมล็ดพืช (Inhibitor solution) และ 0.05M Tris-HCl ที่เติม 0.02 CaCl_2 pH 8.0 (Buffer) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 30°C นาน 4 นาที เติมสารละลาย BAEE (Substrate) ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 253 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ติดตามปฏิกิริยาทุก 5 วินาที นาน 60 วินาที จากนั้นคำนวณหาหน่วยการยับยั้ง Trypsin ของสารสกัด กับ standard curve ซึ่งไม่เติมสารสกัดจากเมล็ดพืช มีสัดส่วนของสารที่ใช้ดังนี้



นำค่าดูดกลืนแสงที่จากการติดตามปฏิกิริยาเริ่มต้นถึงปฏิกิริยาสิ้นสุดของ standard curve และ สารสกัด (TIs) คำนวณหาหน่วยการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ดังนี้

$$\text{Trypsin- inhibitory activity (U)} = \frac{\text{Abs control} - \text{Abs sample}}{\text{Abs control} \times \text{trypsin (mg)}}$$

ส่วนที่ 6เตรียมตัวอย่างแมลงและทดสอบTrypsin inhibitors ต่อการพัฒนาของหนอนกระทู้ผักและ หนอนเจาะสมอฝ้าย

การวิจัยได้นำหนอนกระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย มาเลี้ยงด้วยอาหารเทียม ซึ่งคัดแปลง สูตรมาจาก กรมวิชาการเกษตร ศึกษาวงจรชีวิตของหนอน และทดสอบ TIs ที่สกัดได้จากเมล็ดพืชต่อการพัฒนาการตลอดวงจรชีวิตหนอนกระทู้ผัก

6.1 ศึกษาวงจรชีวิตของหนอนกระทู้ผักที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียม

6.1.1 นำหนอน จากแปลงผักเกษตรกร เช่น แปลงผักตระกูลกะหล่ำ แปลงดอกดาวเรือง แปลงถั่วฝักยาว แปลงข้าวโพด เป็นต้น มาเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ เลี้ยงด้วยอาหาร เทียม จนพัฒนาเป็นดักแด้ และตัวเต็มวัยให้ผสมพันธุ์กันและวางไข่

6.1.2 เมื่อหนอนฟักออกจากไข่ เลี้ยงต่อด้วยอาหารเทียม โดยศึกษาความเปลี่ยนแปลง ระยะเวลาของหนอนแต่ละวัยและปริมาณอาหารเทียมที่หนอนกินหมดในแต่ละวันของหนอนทั้ง 5 วัย และระยะเวลาของวงจรชีวิตหนอนในรุ่นที่ 1 เลี้ยงหนอนด้วยอาหารเทียมจนครบวงจรชีวิตเป็นรุ่นที่ 4 เพื่อให้เกิดความบริสุทธิ์ของของหนอนกระทู้ผัก ระยะเวลาของวงจรชีวิตหนอนและปริมาณการกิน อาหารที่แน่นอน

6.1.3 เลือกหนอนวัย 2 ในรุ่นที่ 4 มาทดสอบกับอาหารเทียมที่มีส่วนผสมของ Trypsin inhibitors ที่สกัดได้จากเมล็ดพืชต่อไป

6.2 ทดสอบ Trypsin inhibitors ต่อการพัฒนาของหนอนกระทู้ผัก

6.2.1 นำ Trypsin inhibitors ที่สกัดได้จากเมล็ดพืช 1 ชนิด มาผสมในอาหารเทียม (artificial diet) สำหรับเลี้ยงหนอน ที่ความเข้มข้น 0, 3, 6, 9 และ 12 trypsin inhibitor units/g (TIU/g)

6.2.2 หลังจากทีหนอนลอกคราบเป็นวัย 2 ได้ 1 วัน นำมาแยกออกไว้ในกล่องพลาสติก โดยไม่ให้อาหารเป็นเวลา 1 วัน จากนั้นแยกหนอนวัย 2 ใส่กล่อง 10 ตัว/กล่อง โดยให้อาหารเทียมที่ผสม TI ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำ 6 ซ้ำๆละ 10 ตัว ให้อาหารที่มี TIs ในปริมาณเท่ากันทุกความเข้มข้นเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นแยกหนอนใส่ถ้วยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร ลึก 2 เซนติเมตร ในปริมาณ 1 ตัว/ถ้วย ให้อาหารเทียมปกติโดยไม่มีส่วนผสมของ trypsin inhibitors เก็บข้อมูลการพัฒนาของหนอนในวันที่ 6 หลังได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของ TIs

6.3 เก็บข้อมูล

6.3.1 ระยะตัวหนอน

- น้ำหนักหนอนหลังทดสอบกับ TIs (mg/larvae)
- พัฒนาการของตัวหนอนวัยต่างๆ (วัน)
- จำนวนการตายของหนอน (%)
- จำนวนตัวหนอนที่เปลี่ยนจากตัวหนอนเป็นดักแด้ (%)

6.3.2 ระยะดักแด้

- น้ำหนักของดักแด้ (mg/ตัว)
- อายุดักแด้ (วัน)
- จำนวนการตายของดักแด้ (%)
- จำนวนดักแด้ที่เปลี่ยนจากดักแด้เป็นตัวเต็มวัย (%)

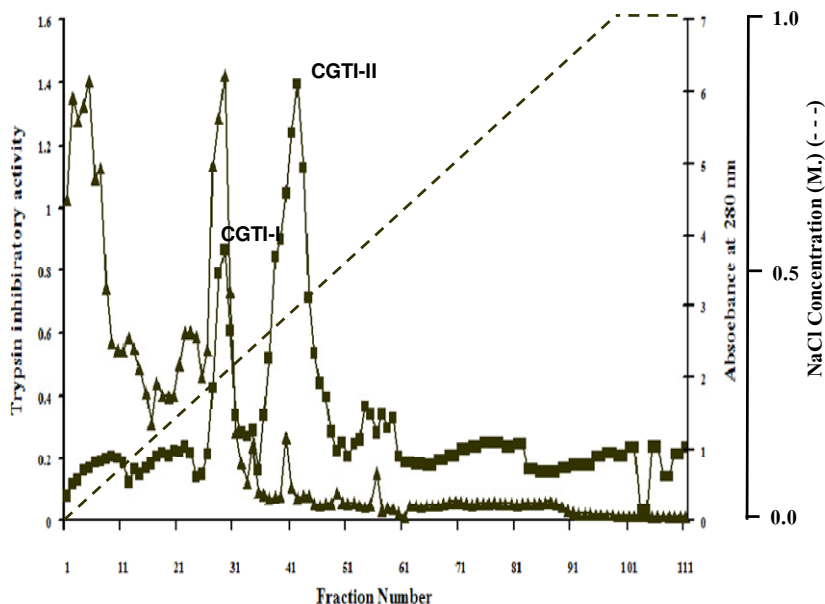
6.3.3 ระยะตัวเต็มวัย

- ความผิดปกติของตัวเต็มวัย (%)
- จำนวนไข่ที่วาง (ฟอง / แม่)
- จำนวนตัวหนอนที่ฟักออกจากไข่ (%)

ผลการทดลอง

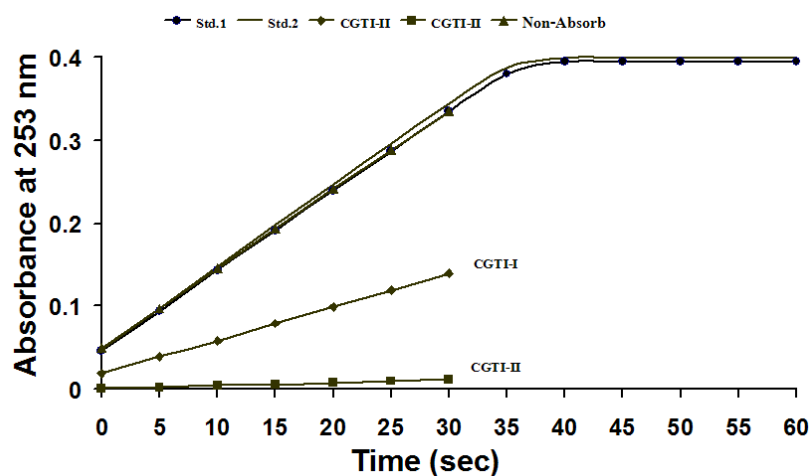
1. การสกัด trypsin Inhibitors จากเมล็ดตำลึง

หลังจากการหมักผลตำลึงสีแดงที่สุกแก่เต็มที่ด้วยน้ำนาน 48 h แยกเอาส่วนของเมล็ดไปปั่นละเอียด แยกส่วนของเปลือกและเนื้อเมล็ด พบว่า เมล็ดตำลึง 100 g มีส่วนของเปลือก 41.03 g และส่วนของเนื้อเมล็ด 43.59 g นำผงเมล็ดตำลึง 28 g มาสกัดและทำให้บริสุทธิ์เพื่อให้ได้ Trypsin inhibitors สารสกัด 219 ml ที่ได้หลังจากปรับ pH 3.5 ด้วย HCl (ตาราง 1) แยก Trypsin inhibitors ด้วยเทคนิค Ion Exchange Chromatography (IEC) เมื่อนำสารตัวอย่างที่เก็บหลังผ่าน IEC มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin โดยปฏิกิริยาที่ใช้ BApNA เป็นสารตั้งต้น สามารถตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งของเอนไซม์ Trypsin ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงและความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ trypsin ของแต่ละ fraction ที่สกัดได้จากเมล็ดตำลึง (■) แสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ของแต่ละ fraction (▲) แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

จากภาพที่ 4 สารสกัดจากเมล็ดตำลึงมีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin 2 ตำแหน่ง เรียกเป็น CGTI-I และ CGTI-II นำทั้ง 2 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์หาหน่วยการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin (Unit) โดยใช้ N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE.HCl) เป็นสารตั้งต้น ผลที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ของ CGTI-I และ CGTI-II เปรียบเทียบกับ standard curve (Std.1 และ Std. 2) และสารสกัด Non-Absorb

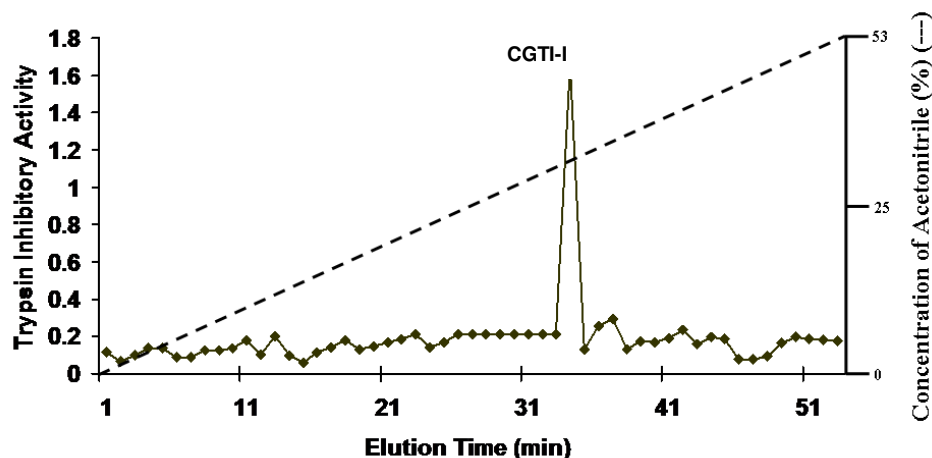
จากการคำนวณ พบว่าสารสกัด CGTI-I และ CGTI-II มีหน่วยการยับยั้งที่จำเพาะต่อเอนไซม์ trypsin คือ 8.21 และ 28.07 U/mg ตามลำดับ (ตาราง 1)

ตาราง 1 แสดงกิจกรรมของ TIs ที่สกัดได้จากเมล็ดตำลึง (CG; *Coccinia grandis integrifolium*)

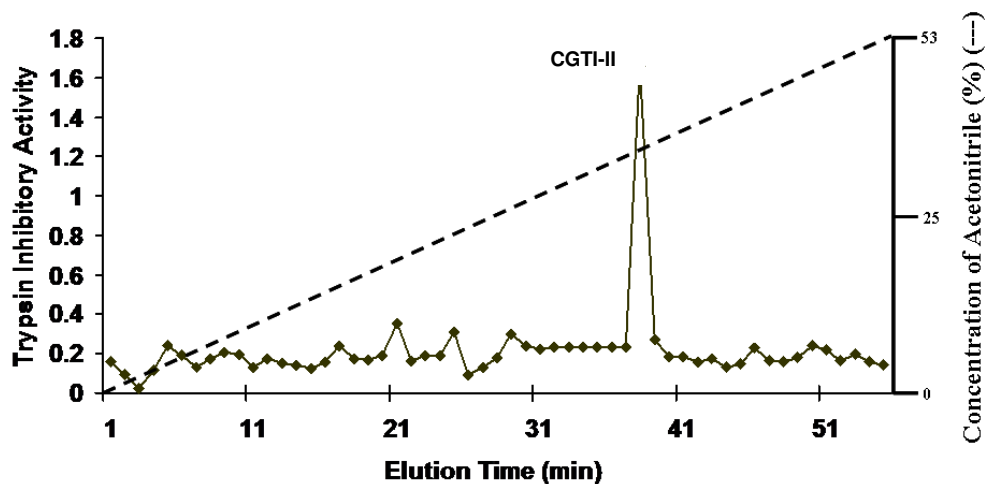
Sample	Amount			Specific		Percentage
	Volume (ml)	of protein (mg)	Inhibitory activity (U)	inhibitory activity (U/mg)	Purification fold	
Crude extract	219	808.11	2,625.61	3.25	-	-
SP						
CGTI-I	36	54.42	446.85	8.21	2.53	17.02
CGTI-II	72	52.78	1,481.32	28.07	8.64	56.42

SP: pooled fractions from SP-toyopearl

จากนั้นนำสารสกัด 2 ส่วนคือ CGTI-I และ CGTI-II ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) (UV detector รุ่น -8020 (TOSOH), pump HPLC L-7100, column Inertsil 5 μ m, 4.6 x 250 mm) เก็บตัวอย่างของสารสกัดที่ผ่าน RP-HPLC ทุกๆ peak นำไป freeze-Dry และละลายด้วย 300 μ l ของ 10 mM NH_4HCO_3 จากนั้นนำไปทดสอบ Trypsin Inhibitory Activity โดยใช้ BApNA เป็นสารตั้งต้น โดยใช้สารสกัด 50 μ l พบว่าจากสภาวะของ RP-HPLC ที่ใช้ในครั้งนี้ ทำให้ CGTI-I และ CGTI-II บริสุทธิ์ ถูกชะออกมาที่เวลา 34-36 นาที และ 38-40 นาที ตามลำดับ ดังภาพที่ 6 และ 7

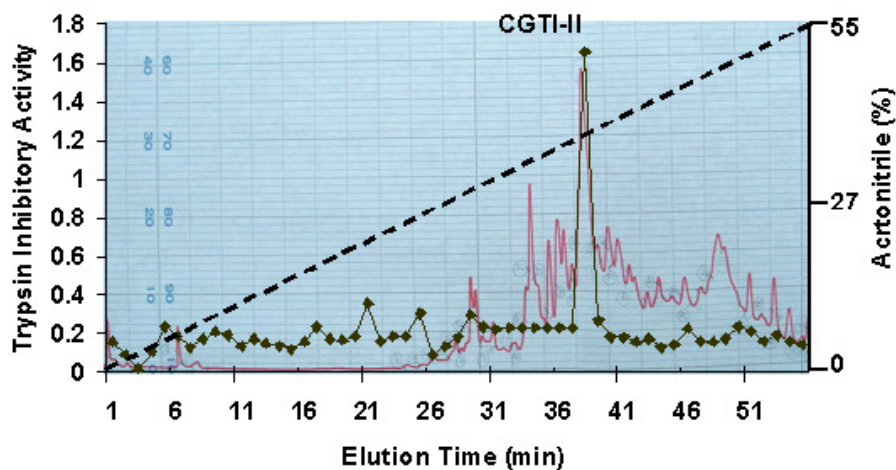


ภาพที่ 6 การแยกสาร CGTI-I ที่สกัดได้จากเมล็ดตำลึงด้วยเทคนิค reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC), (◆) แสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ trypsin และ (---) แสดงความเข้มข้นของ acetonitrile



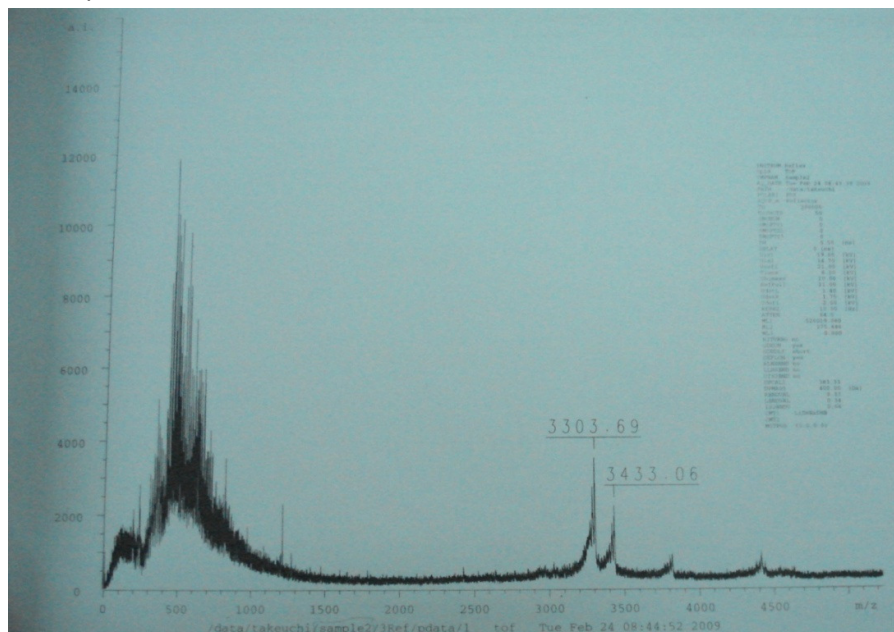
ภาพที่ 7 การแยกสาร CGTI-II ที่สกัดได้จากเมล็ดตำลึงด้วยเทคนิค reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC), (◆); แสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ trypsin, (---); ความเข้มข้นของ acetonitrile

จากการวิเคราะห์หาหน่วยการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Trypsin พบว่า CGTI-II มีกิจกรรมของ TI สูงจึงได้เลือกมาวิเคราะห์หาหน้าหนักโมเลกุล โดยนำ CGTI-II ไปผ่าน RP-HPLC อีกครั้ง ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 การแยกสาร CGTI-II ที่สกัดได้จากเมล็ดตำลึงด้วยเทคนิค reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) รอบที่ 2, (◆); แสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ trypsin, (---); ความเข้มข้นของ acetonitrile

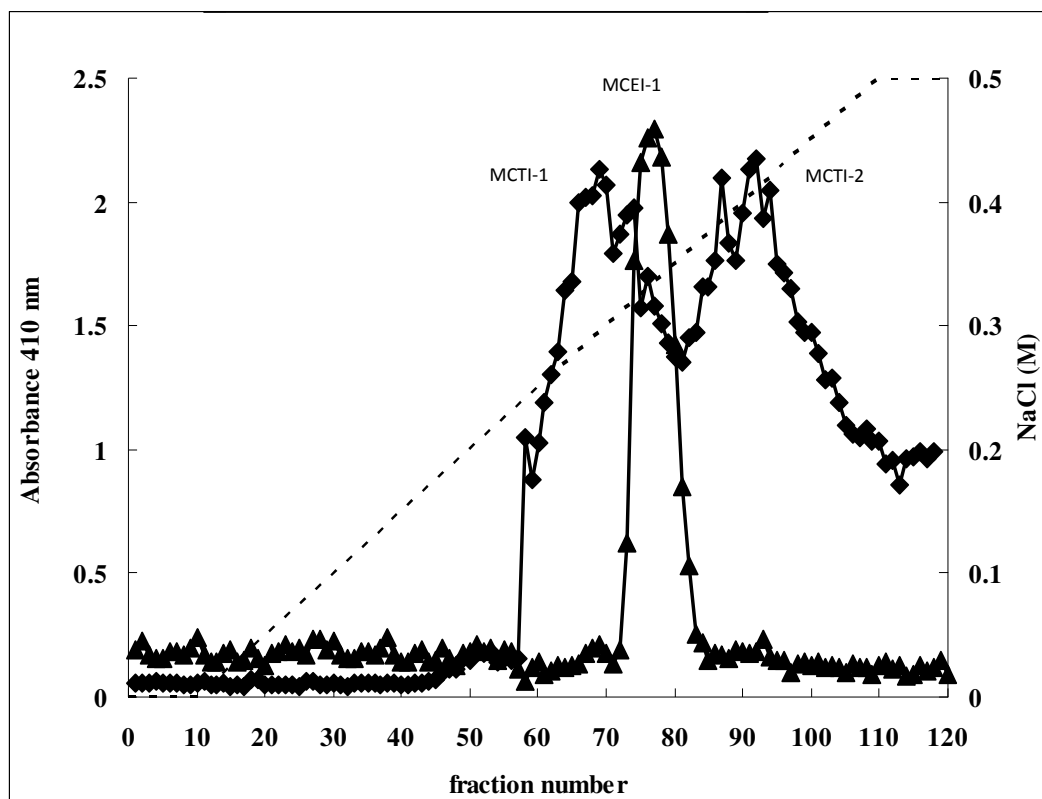
เก็บตัวอย่างสารที่มีกิจกรรมของ TIs นำมา freeze Dry แล้วละลายด้วย 300 μ l ของ 0.1 % Trifluoroacetic acid (TFA) นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลด้วย mass spectrometer พบว่า CGTI-II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3303.69 (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 น้ำหนักโมเลกุล CGTI-II จากสารสกัดเมล็ดตำลึงที่วัดด้วยเครื่อง mass spectrometer

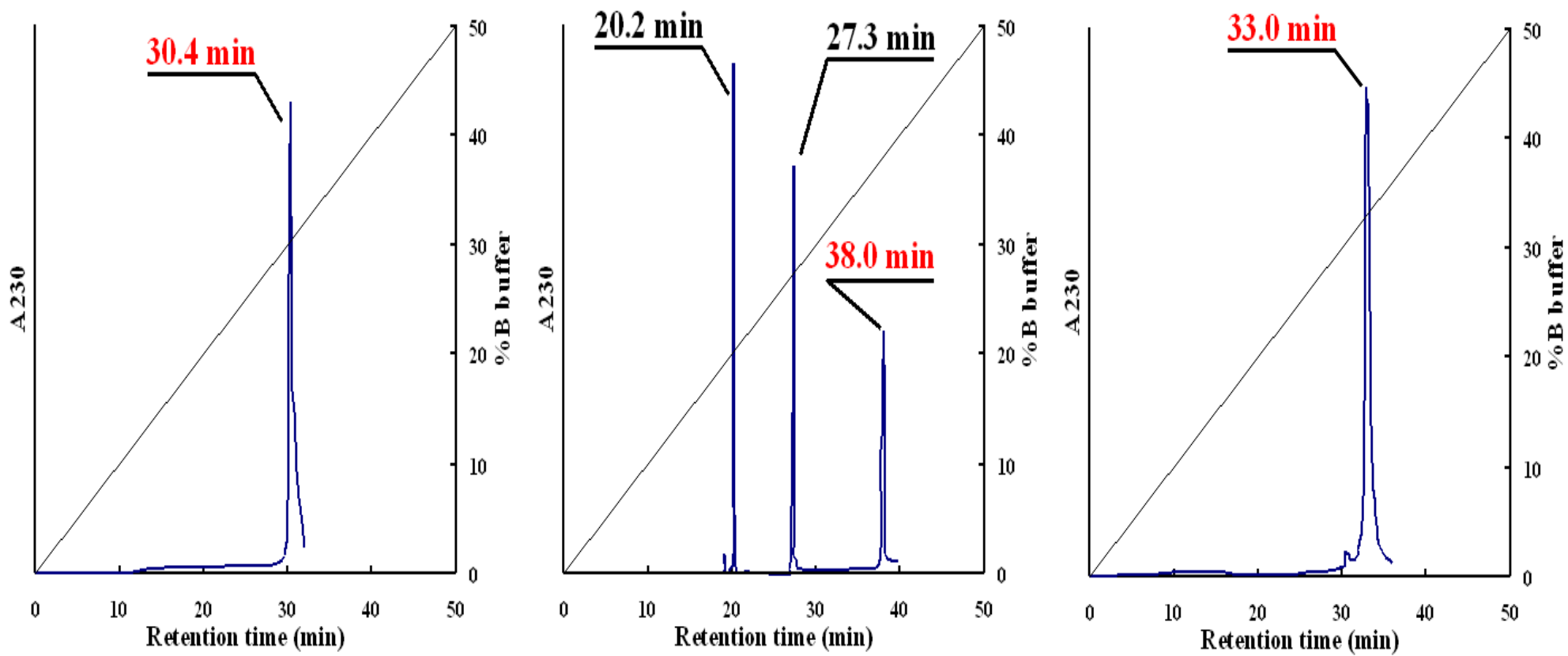
2. การสกัด trypsin Inhibitors จากเมล็ดมะระจีน

เมล็ดมะระกะเทาะเปลือกออก แยกเอาส่วนของเมล็ดไปปั่นละเอียด พบว่า เมล็ดมะระจีน 100 g มีส่วนของเปลือก 51 g และส่วนของเนื้อเมล็ด 49 g ในครั้งนี้ได้นำผงของเมล็ดมะระจีน 13 g มาสกัด Trypsin inhibitors สารสกัดปริมาตร 195 ml นำมาผ่านการแยกด้วยเทคนิค ion exchange chromatography (ตารางที่ 2) พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกัมมิกิจกรรมของ TI อยู่ 2 ตำแหน่ง คือ MCTI-I และ MCTI-2 อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบพบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ elastase ด้วย 1 ตำแหน่ง คือ MCEI-I ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 การแยกสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนด้วยเทคนิค ion exchange chromatography, (◆); การยับยั้งเอนไซม์ Trypsin, (▲); การยับยั้งเอนไซม์ Elastase, (---); ความเข้มข้นของ NaCl

จากภาพที่ 10 พบว่ามี 2 peaks ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง เอนไซม์ Trypsin เรียกว่า MCTI-1 และ MCTI-2 และอีก 1 peak ที่แสดงความสามารถของการยับยั้งเอนไซม์ Elastase เรียกว่า MCEI-1 นำไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยเทคนิค reverse-phase HPLC พบว่าภายใต้สภาวะที่ใช้ในครั้งนี้อย่าง MCTI-1, MCTI-2 และ MCEI-1 ถูกชะออกจากคอลัมน์ ด้วยเวลาที่แตกต่างกันคือ 30.4, 33.0 และ 38.0 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 11) หน่วยการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ของ MCTI-1 และ MCTI-2 เท่ากับ 81 และ 117 U/mg หน่วยการยับยั้งเอนไซม์ elastase ของ MCEI-1 เท่ากับ 147.80 U/mg (ตารางที่ 2) ขนาดโมเลกุลของ MCTI-1, MCTI-2 และ MCEI-1 เท่ากับ 3270, 3335 และ 3169 Da ตามลำดับ



ภาพที่ 11 โครมาโตแกรมของสารสกัด MCTI-1, MCTI-2 และ MCEI-1 จากเมล็ดมะขามที่ผ่าน Reverse-phase HPLC

ตารางที่ 2 แสดงกิจกรรมของ trypsin inhibitors และ elastase inhibitors ที่สกัดได้จากเมล็ดมะระขี้นก (Thai bitter gourd)

	Powder	Volume	Total	Protein	IA (U)		IA (U/mg protein)		specific activity		Inhibitory Yield (%)	
	(g)	(ml)	Protein (mg)	(mg/ml)	Trypsin	Elastase	Trypsin	Elastase	Trypsin	Elastase	Trypsin	Elastase
13												
Tris- HCl		240	2419.00	10.08	55569.00	38875.00	22.97	16.07	23.00	16.00	100.00	100
Heat 100 °C, 10 min	-	195	2811.00	14.42	51877.00	26885.00	18.45	9.56	18.00	10.00	93.00	69
pH 3.5 HCl	-	195	1825.00	9.36	38915.00	22023.00	21.32	12.07	21.00	12.00	70.00	57
IEC												
MCTI-I	-	59	79.00	1.34	6399.00	-	81.00			-	12.00	-
MCTI-2	-	91	130.00	1.43	15197.00	-	117.00			-	27.00	-
MCEI-I		40	62	1.55	-	9164.00	-	147.80		148	-	24

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ Trypsin Inhibitors ต่อการพัฒนาของหนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้ผักนั้น มีผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 3 อิทธิพลของ proteinase inhibitors จากเมล็ดมะระจีนกต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของหนอนเจาะสมอฝ้าย

Parameters	Control	3 TIU/g	6 TIU/g	9 TIU/g	12 TIU/g
Larval weight (mg/larvae)					
6DAT	5.3±0.19	4.4±0.15	3.5±0.17	2.8±0.14	3.8±0.19
8DAT	28.1±2.15	26.5±1.52	18.5±1.28	18.6±3.15	21.3±2.15
10DAT	37.3±3.15	34.9±2.45	31.4±3.45	23.4±3.18	21.4±3.17
Larval period (days)	18.0±0.65	18.0±0.87	17.0±0.54	17.0±1.19	17.0±0.60
Larval mortality (%)	0.0	0.0	40.0	10.0	10.0
Pupal weight (mg/pupa)	309.4±1.19	303.6±2.15	270.3±1.25	244.3±0.98	240.7±2.06
Pupal period (days)	15.0±0.65	14.0±0.87	16.0±0.70	15.0±0.80	14.0±0.72
Pupal mortality (%)	1.0	0.0	22.0	26.0	2.0
Malformed adults (%)	0.0	0.0	1.8	0.0	0.0
Fertility (eggs/female)	365.0±3.50	315.0±4.12	176.0±2.18	118.0±3.78	126.0±1.50
Fecundity (hatching %)	88.71	61.94	26.77	1.00	3.58

TIU= trypsin inhibitor unit, DAT= days after treatment

พบว่า การได้รับ TIs จากสารสกัดเมล็ดมะระจีนก ทำให้น้ำหนักหนอนเจาะสมอฝ้ายลดลงอย่างเห็นได้ชัด การได้รับสารระดับ 6 TIU/g ทำให้มีหนอนตายถึง 40 % สาร TIs จากเมล็ดมะระจีนก ความเข้มข้นสูงขึ้นไปทำให้น้ำหนักของดักแด้ลดลงตามลำดับ เมื่อหนอนได้รับสารความเข้มข้น 12

TIU/g ทำให้น้ำหนักตัวลดลงประมาณ 33 % ส่วนการตายของดักแด้นั้นพบว่า ความเข้มข้น 6 TIU/g และ 9 TIU/g ทำให้ดักแด้ตาย 22.0% และ 26.0% ตามลำดับ สาร TIs ความเข้มข้น 6, 9 และ 12 TIU/g ทำให้การวางไข่ของผีเสื้อลดลง 51.78 %, 67.67%, และ 65.48 % ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น ยังทำให้การฟักออกจากไข่ลดลงอย่างมาก คือ 69.82 %, 98.87 %, และ 95.96 %ตามลำดับ

ตารางที่ 4 อิทธิพลของ proteinase inhibitors จากเมล็ดตำลึงต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของหนอนกระทู้ผัก

Parameters	Control	3 TIU/g	6 TIU/g	9 TIU/g	12 TIU/g
Larval weight (mg/larvae)					
6DAT	9.3±2.05	9.0±0.52	7.5±1.17	7.8±0.54	6.4±0.49
8DAT	59.1±1.15	58.5±3.52	51.5±4.28	51.6±1.15	50.3±3.15
10DAT	139.3±18.15	132.9±12.05	130.4±21.45	113.4±23.18	95.4±13.15
Larval period (days)	17.0±0.75	18.0±0.95	18.0±1.04	18.0±1.95	18.0±0.50
Larval mortality (%)	0.0	8.0±0.45	11.0±1.25	11.0±0.85	15.0±0.92
Pupal weight (mg/pupa)	295.4±43.0	285.6±40.15	256.3±8.25	220.3±11.98	220.7±21.16
Pupal period (days)	16.0±0.55	17.0±1.87	18.0±1.70	18.0±0.80	18.0±0.82
Pupal mortality (%)	5.20	11.20	23.0	26.0	32.0
Malformed adults (%)	0.0	0.0	5.0	11.0	16.0
Fertility (eggs/female)	810.0±13.65	756.0±41.22	325.0±52.02	310.0±23.08	298.0±23.50
Fecundity (hatching %)	85.51	70.19	110.70	82.40	93.50

TIU= trypsin inhibitor unit, DAT= days after treatment

พบว่าสารสกัด Trypsin Inhibitors (TIs) จากเมล็ดตำลึง ทำให้น้ำหนักหนอนกระทู้ผักในวันที่ 6 และ 8 หลังการได้รับสาร ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ในวันที่ 10 หลังการได้รับสาร น้ำหนักหนอนลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 9 TIU/g และ 12 TIU/g น้ำหนักหนอนลดลง 18.59 % และ 31.51 % ตามลำดับ หนอนตาย 11.0 % และ 15.0 % สาร TIs จากเมล็ดตำลึงความเข้มข้นสูงจึงทำให้น้ำหนักของดักแด้ลดลงตามลำดับ น้ำหนักดักแด้ลดลงประมาณ 25 % เมื่อหนอนได้รับสารความเข้มข้น 9 TIU/g และ 12 TIU/g การตายของดักแด้นั้นมีมากขึ้นตามความเข้มข้นของสาร อยู่ระหว่าง 11-32 % สาร TIs ความเข้มข้น 6, 9 และ 12 TIU/g ทำให้การวางไข่ของผีเสื้อลดลงอย่างมาก คือ 59.88 %, 61.73 %, และ 63.21 % ตามลำดับ ส่วนการฟักออกจากไขนั้นพบว่ามียูธอยู่ระหว่าง 70.19 % ถึง 110.70 %

การที่ผีเสื้อจะสามารถเลี้ยงไข่จำนวนมากได้นั้นจำเป็นต้องใช้โปรตีนปริมาณที่เหมาะสม เมื่อกระบวนการ protein metabolism ถูกรบกวนในช่วงวัยหนอนทำให้แมลงไม่สามารถมีพัฒนาการที่ปกติได้ ส่งผลกระทบถึงปริมาณ และคุณภาพของไข่ การได้รับ Trypsin Inhibitors ที่สกัดจากเมล็ดมะระจีนกและเมล็ดตำลึงในวัยหนอน ส่งผลให้เกิดพัฒนาการที่ผิดปกติ และลดจำนวนไข่/แม่วิตลโลเจเนซิส การฟักออกจากไข่ ซึ่ง Telang และคณะ (2001) ศึกษาพบว่าการสะสมโปรตีนในช่วงวัยหนอนนั้นเป็นจุดวิกฤตต่อกระบวนการ vitellogenesis (กระบวนการสร้างไข่แดง) อย่างหนึ่ง จากรายงานของ Atiwetin และคณะ (2006) ที่มีการค้นพบว่า trypsin inhibitor ที่สกัดจากเมล็ดของ wax gourd (*Benincasa hispida*) มี 2 รูป (form) ที่เปลี่ยนแปลงไปมาได้ (cis-trans isomers) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อแมลงศัตรูพืชแต่ละชนิด แตกต่างกันได้ เนื่องจากแมลงมีการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อต่อต้านหรือทำลาย TIs ที่ได้รับ ซึ่งเป็นการทำลายสารพิษที่หนอนได้รับนั่นเอง

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะงานวิจัยในอนาคต

การสกัดหา TI จากเมล็ดมะระจีนกและเมล็ดตำลึง พบว่าพืชทั้ง 2 ชนิดตรวจสอบพบสารยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มของ serine โดยสารสกัดเมล็ดตำลึง พบ TIs อยู่ 2 ตำแหน่ง เรียกเป็น CGTI-I และ CGTI-II ซึ่งมีหน่วยการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ Trypsin คือ 8.21 และ 28.07 U/mg ตามลำดับ CGTI-II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3303.69 Da ส่วนผงของเมล็ดมะระจีนก ผ่านการแยกด้วยเทคนิค ion exchange chromatography พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกมีกิจกรรมของ TI อยู่ 2 ตำแหน่ง เรียกเป็น MCTI-I และ MCTI-2 อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบพบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ elastase ด้วย 1 ตำแหน่ง คือ MCEI-I เมื่อนำไปตรวจสอบขนาดโมเลกุลด้วยเทคนิค mass spectrometry พบว่า MCTI-1, MCTI-2 และ MCEI-1 มีขนาดโมเลกุล เท่ากับ 3270, 3335 และ 3169 Da ตามลำดับ และมีหน่วยการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ Trypsin เท่ากับ

สารสกัด trypsin inhibitors จากเมล็ดมะระจีนกและเมล็ดตำลึง เมื่อนำมาทดสอบกับแมลงศัตรูพืช 2 ชนิด คือ หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้ผัก นั้นพบว่า สารสกัด trypsin inhibitors มีผลกระทบต่อแมลงศัตรูพืชทั้ง 2 ชนิด ในทุกช่วงวัย ไม่ว่าจะเป็น ช่วงวัยหนอน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัย ตลอดจนการพัฒนาทางด้านการสืบพันธุ์ โดยจะเห็นได้ว่า สามารถทำให้น้ำหนักของหนอนลดลง การตายของดักแด้มีมากขึ้น และการวางไข่ของผีเสื้อที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด

การที่สารสกัด trypsin inhibitors จากเมล็ดพืชทั้ง 2 ชนิด เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก (ประมาณ 3000 Da) ทำให้มีความเป็นไปได้ค่อนข้างง่ายในการที่จะสอดแทรกขึ้นส่วนเปปไทด์เข้าไปเนื้อเยื่อของพืชเศรษฐกิจเพื่อกระตุ้นให้พืชเศรษฐกิจเหล่านั้นมีความสามารถในการป้องกันตัวเองและทำลายแมลงศัตรูสำคัญ เช่น หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้ผักได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Atiwetin, P., S. Harada and K. Kamei. 2006. Serine protease inhibitor from Wax Gourd (*Benincasa hispida*[Thumb] seeds. Biosci. Biotech. Biochem. 70; 743-745.
- Dwijendra, N.R. and P.R. Srinivasa. 1971. Evidence, isolation, purification, and some properties of a trypsin inhibitor in Lathyrus Sativus. J. Agr. Food Chem. 19; 257-259.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. of Biological Chemistry 193; 265-275.
- Telang, A, Y. Li, F.G. Noriega and M.R. Brown. 2006. Effects of larval nutrition on the endocrinology of mosquito egg development. J. of Experimental Biology 209; 645-655.

ภาคผนวก

การเตรียม resin column สำหรับ Ion exchange chromatography

1.1 เตรียมสารเคมีสำหรับล้าง resin (CM 52, SP-Toyopearl) และปรับสมดุล

0.1 N NaOH (Sodium Hydroxide, MW. 40)

0.1 N HCl (Hydro Chloric, MW. 36.46 (12 mol/L)

10 mM CH_3COONa pH 3.5 (Sodium acetate Anhydrous, MW.82.03)

5 mM Tris- HCl pH 8 (Tris) MW.121.14

1.2 สารเคมีที่ต้องใช้ในขั้นตอนการแยก TIs ด้วย IEC

เตรียม บัฟเฟอร์ A ด้วย 10 mM CH_3COONa ปรับ pH 3.5

เตรียม บัฟเฟอร์ B ด้วย 10 mM CH_3COONa ปรับ pH 3.5 ที่เติม 1 N NaCl

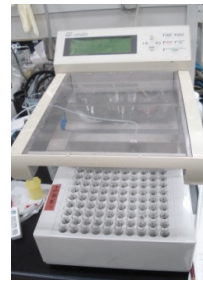
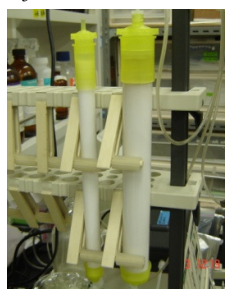
ขั้นตอนการแยก TIs ด้วยเทคนิค IEC

เตรียม resin column สำหรับโหลด สารละลายที่สกัดได้จากเมล็ดพืช

1. ล้าง resin ด้วย 0.1 M NaOH และล้างตามด้วยน้ำกลั่นวัดความเป็นกรดด้วยกระดาษลิตมัส (เบส) จากนั้นล้างด้วย 0.1 N HCl ล้างตามด้วยน้ำกลั่นวัดความเป็นเบสด้วยกระดาษลิตมัส (กรด) ปรับสมดุลด้วย 10 mM CH_3COONa

2. เท resin ลงใน column (2 mm x 21 mm; Tosoh, Tokyo, Japan) จากนั้นโหลดสารละลายลงใน Column ด้วยเครื่อง Ion Exchange Chromatography (ECONO PUMP)

3. เตรียม buffer A (10 mM CH_3COONa) และ buffer B (1 N NaCl ในสารละลาย 10 mM CH_3COONa) เพื่อแยกสารละลายออกจาก column



อุปกรณ์ที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดสาร TIs ด้วยเทคนิค IEC

ตารางที่ 1 สัดส่วนของบัฟเฟอร์ต่อเวลาที่ใช้ในการตั้งค่าแกร์เดียนเทคนิค Ion exchange chromatography

Time (min)	%A	%B	Flow (ml/min)
0	100	0	3
200	0	100	3
220	0	100	3

2. การเตรียม Buffer สำหรับเทคนิค RP-HPLC

แยก TIs บริสุทธิ์ด้วยเครื่อง reverse phase high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) (UV detector รุ่น -8020 (TOSOH), pump HPLC L-7100, column Inertsil 5 μ m, 4.6 x 250 mm) นีดสารในปริมาตร 2 ml โดยใช้สารละลาย Acetonitrile เป็นบัฟเฟอร์

ตารางที่ 2 แสดงสัดส่วนของการเตรียมบัฟเฟอร์ A และ บัฟเฟอร์ B ที่ใช้ในการแยก TIs บริสุทธิ์ด้วย RP-HPLC

Solution Buffer	H ₂ O ₂ (ml)	AN. (ml) (CH ₃ CN)	TFA (ml) (CF ₃ COOH)	Volumn
A buffer (1% AN.)	990	10	1	1 litter
B buffer (99% AN.)	10	990	1	1 litter

โดยตั้งค่าของความเร็วของการเคลื่อนที่ (Chart speed) 5 mm/min., Wave Range 230 nm, Range 1.28 ซึ่งเก็บตัวอย่างของสารสกัดที่ผ่าน RP-HPLC ทุกๆ peak

การเตรียมสารเคมีในการสกัด TIs จากเมล็ดพืช

การเตรียม Tris-HCl ปริมาตร 100 ml of 5 mM

1. เตรียม Tris-HCl 1000 ml โดยชั่ง Tris มา 0.6 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml
2. ปรับ pH 8 ด้วย HCl (Stirrer ไปด้วย) ได้ Tris-HCl ที่ pH 8 ละลายใน pellet ที่ de-fat แล้ว 10 g ต่อ Tris-HCl 100 ml

1. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

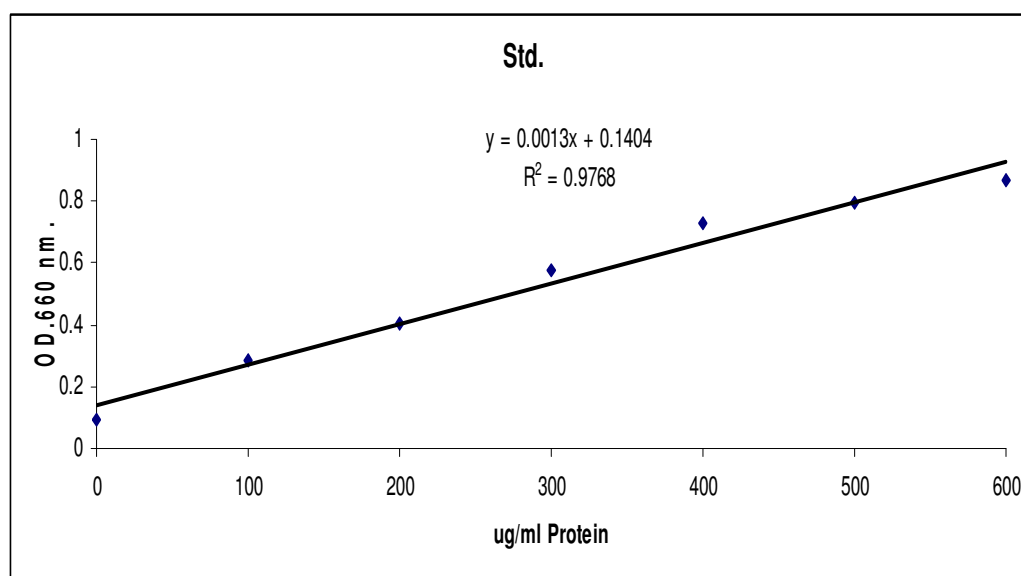
ตารางที่ 3 แสดงสัดส่วนสารที่เตรียมในการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธีการของ Lowry

Reagent A	Na ₂ CO ₃	0.1 N NaOH	SDS 0.5%	เตรียม
	20 g	1000 ml	5 g	1000 ml
Reagent B	CuSO ₄ .5H ₂ O	1% Sodium Potassium tartrate		เตรียม
	0.5 g	1000 ml		1000 ml
Reagent C	Reagent A	:	Reagent B	เตรียม
	50	:	1	20 ml
Reagent D	Folin	:	Distilled water	เตรียม
	1	:	1	2 ml
Protein Std.	BSA(1mg)	:	Distilled water	เตรียม
	1	:	1	0.5 ml

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงของ Protein Std. ที่วัดได้จากความยาวคลื่น 660 nm

Protein Std. (μg/ml)	ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 660 nm
0	0.0919
100	0.2819
200	0.4016
300	0.5789
400	0.7252
500	0.7941
600	0.8691

2.3 กราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน



ภาพที่ 1 แสดงสูตรกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

2. การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์

2.1 เตรียมสารเคมีทดสอบปฏิกิริยา BApNA

1. เตรียม Buffer (B) ด้วย 0.05 M Tris ที่เติม 0.02 M CaCl_2 (ปรับ pH 7.5 ด้วย HCl)
2. เตรียม 1 mM HCl ที่เติม (pH 3)
1. 3. เตรียม Trypsin soln. (T) โดยละลาย Trypsin ใน 1mM HCl pH 3 (20 mg/ml)
2. 4. เตรียม Substrate (S)

(S-1) เตรียม BApNA ละลายด้วย DMSO (43.5 mg/ml)

(S-2) ใช้ (S-1) ละลายด้วย (B) 100 เท่า (0.435 mg/ml)

3. 5. เตรียม 30% Acetic acid (A) เพื่อหยุดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin

ขั้นตอนการวิเคราะห์

นำสารสกัดที่แยกด้วยเทคนิค IEC แต่ละหลอดมาวิเคราะห์หากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ด้วยปฏิกิริยา BApNA เดิม (B) 60 μ l ที่เติม (สาร TIs ที่สกัดได้) 10 μ l และเติม (T) 20 μ l ใน micro plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ° C ใน shake plate นาน 5 นาที จากนั้นเติม (S-2) 150 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ° C ใน shake plate นาน 10 นาที หยุดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ด้วย 30% Acetic acid นำไปวัดค่า Absorbance ที่ 405 nm ด้วย micro-plate reader

2.2 เตรียมสารเคมีทดสอบปฏิกิริยา BAEE

การวิเคราะห์หาหน่วยการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin ด้วยปฏิกิริยา BAEE มีขั้นตอนการเตรียมสาร ดังต่อไปนี้

1. เตรียม Buffer (B) ด้วย 0.05 M Tris (เติม 0.02M CaCl_2) ปรับ pH 8 ด้วย HCl
2. เตรียม Trypsin soln. (T)
 - (T-1) ใช้ Trypsin ละลายด้วย 0.001 M HCl (0.4208 mg/ml)
 - (T-2) นำสารละลาย Trypsin (T-1) มาละลายด้วย (B) 20 เท่า
3. เตรียม Substrate (S) ใช้ 0.01 M BAEE.HCl ละลายด้วย (B) โดยใช้ 3.43 mg ของ BAEE.HCl + 1 ml ของ (B)

ขั้นตอนการทดสอบปฏิกิริยา BAEE

เตรียม standard curve โดยเติม (B) 500 μ l และ เติม (T) 500 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ° C นาน 4 นาที จากนั้นเติม (S) 50 μ l วัดค่า Absorbance ที่ค่าการดูดกลืน 253 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ตั้งค่าการเกิดปฏิกิริยา 60 วินาที จากนั้นทดสอบหน่วยการยับยั้ง Trypsin ของสารสกัดที่มีกิจกรรมการยับยั้ง (I) คือ สาร TIs ที่สกัดได้โดยเติม (B) 450 μ l เติม (T) 500 μ l และเติม (สาร TIs ที่สกัดได้) 50 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ° C นาน 4 นาที จากนั้นเติม (S) 50 μ l วัดค่า Absorbance ที่ 253 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ตั้งค่าการเกิดปฏิกิริยา 30 วินาที

ตัวอย่างการคำนวณหา TIU โดยปฏิกิริยา BAEE

1. ค่าที่ได้จากการวัด Abs 253 nm.
 - ค่าเฉลี่ยของ Abs stand. 0.24345
 - ค่าเฉลี่ยของ Abs sample

2. หาค่าเฉลี่ยของ TI ต่อ 1 unit

$$\text{โดยใช้สูตร 1 Unit} = \frac{(\text{Abs stand} - \text{Abs sample})}{\text{Abs stand}}$$

$$\text{หา Unit ของ TIs} = \frac{\text{ค่า 1 Unit} \times \text{ปริมาตรสารทั้งหมด}}{\text{ปริมาตรของ TI ที่ใช้}}$$

$$\text{หา mg ของ TIs} = \text{ปริมาณ Trypsin} \times \text{unit}$$

3. ตัวอย่างการคำนวณหา Unit ของ TIs

$$\text{ค่า Abs ของ CGTI-I คือ } 0.1397 - 0.0389 = 0.1008$$

$$\text{โดยใช้สูตร 1 Unit} = \frac{0.24345 - 0.10080}{0.24345}$$

$$= \mathbf{0.58595}$$

$$\text{หา Unit ของ TIs} = \frac{0.58595 \times 38 \text{ ml}}{0.05 \text{ ml}}$$

$$= \mathbf{445.322 \text{ unit}}$$

$$\text{หา mg ของ TIs} = 0.01052 \text{ mg} \times 445.322 \text{ unit}$$

$$= \mathbf{4.6845 \text{ mg}}$$

4. ตัวอย่างการคำนวณหา Unit ของ TIs

$$\text{ค่า Abs ของ CGTI-II คือ } 0.0113 - 0.034 = 0.0089$$

$$\text{โดยใช้สูตร 1 Unit} = \frac{0.24345 - 0.0089}{0.24345}$$

$$= \mathbf{0.963442}$$

$$\text{หา Unit ของ TIs} = \frac{0.96344 \times 72 \text{ ml}}{0.05 \text{ ml}}$$

$$= \mathbf{1387.36 \text{ unit}}$$

$$\text{หา mg ของ TIs} = 0.01052 \text{ mg} \times 1387.36 \text{ unit}$$

$$= \mathbf{14.595 \text{ mg}}$$

เก็บ Trypsin Inhibitors บริสุทธิ์ ที่ทราบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Trypsin มีหน่วยเป็น Unit ที่แน่นอนแล้ว ไป freeze dry เพื่อนำไปไว้ทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนศัตรูพืช

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงหมอนกระดูก

สูตรอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหมอนกระดูก ที่ดัดแปลงสูตรมาจากอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหมอนกระดูกของกรมวิชาการเกษตร ประกอบด้วย

1. Agar power	12 g.
2. Mung bean	195 g.
3. Dried brewer yeast	15 g.
4. Casein	4.5 g.
5. Ascorbic acid	4.5 g.
6. Sorbic acid	1.875 g.
7. Methyl hydroxyl benzoate	3.75 g.
8. Choline chloride	0.75 ml.
9. Formadehyde	3 ml.
10. Vitamin stock	15 ml.
11. Distilled water	1125 ml.
12. Streptomycin	0.15 ml.

หมายเหตุ: ใช้น้ำสำหรับต้มวุ้น 800 มล.

ขั้นตอนการเตรียม อาหารเทียมเพื่อทดสอบกับหมอนกระดูก

- 2.1 แช่เมล็ดถั่วเขียว 195 g เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้ละเอียด
- 2.2 ละลาย agar 15 g ในน้ำกลั่น 800 ml ด้วย microwave เป็นเวลา 5 นาที
- 2.3 ค่อย ๆ เติมส่วนผสมที่เหลือตามสัดส่วนทั้งหมดลงในสารละลาย agar และปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม
- 2.4 เทอาหารเทียมที่ผสมกันดีแล้วลงในถาดพลาสติกหนาประมาณ 1 นิ้ว
- 2.5 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปเลี้ยงหมอนกระดูก

ขั้นตอนการเตรียม TIs ในอาหารเทียมเพื่อทดสอบกับหมอนกระดูก

สารที่ผ่านการแยก TIs ด้วยเทคนิค IEC นำมาผ่านการ desalting ด้วยเครื่อง Ultra filtration membrane แล้วทำการ freeze dry ได้สาร CGTI ปริมาณ 0.1421 g

ตารางที่ 5 เตรียมสารเพื่อทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก ที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 6, 9 และ 12 TIU/g

Concentration(TIU/g)	เตรียมอาหาร ปริมาตร (ml)	ผสมปริมาตร TIU	ชั่ง TI (g)
0	100	0	0
3	100	300	0.0119
6	100	600	0.0239
9	100	900	0.0358
12	100	1,200	0.0478
รวม	500	3,000	0.1194

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. Manuscript submitted to ASIAN JOURNAL OF PLANT SCIENCES

1. Panida Arimatsu. Effect of Thai bitter gourd proteinase inhibitors on growth and development of *Helicoverpa armigera* Hubner. (in process)

2. Panida Arimatsu and Orrawan Sawangsook. Purification and Characterization of a Trypsin Inhibitor from *Momordica cochinchinensis* Spreng. Seed and its effects to *Spodoptera litura*. (in process)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ เชิงวิชาการ

การได้รับทุนวิจัยจากสกว. ในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้นำความรู้ ผลงานวิจัยที่ได้รับไปใช้ในการเรียน การสอน รายวิชา Plant Resistance to Disease and Insect Pests และวิชา Agricultural Biotechnology for Plant Production หลักสูตรปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

นอกจากนี้ยังได้สนับสนุนการทำวิจัยของนิสิตปริญญาโท คือ นางสาวอรรณ แสงสุข (วท.บ. เทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำเร็จการศึกษา ตุลาคม 2553) ในหัวข้อเรื่อง “ผลของสารสกัดหิปปัส อินฮิบิเตอร์จากพืชต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาการของหนอนกระทู้ผัก” โดยนิสิตเดินทางไปทำวิจัยร่วมกับ Associate Prof. Kamei Keiko, Kyoto Institute of Technology ประเทศญี่ปุ่น เป็นเวลา 2 เดือน และเดินทางไปร่วมทำวิจัยกับ ดร. สมพร มุลมั่งมี นักวิชาการ 8 ฝ่ายเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อีกด้วย ซึ่งเป็นโอกาสอันดีในการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ของประเทศไทย

3. อื่นๆ

นำเสนอผลงานรูปแบบโปสเตอร์

เรื่อง “Effect of trypsin inhibitor from Ivy gourd seeds on the growth and development of common cutworm” ในที่ประชุมวิชาการ “นักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553

บทความวิชาการ

อรวรรณ แสงสุข และ พนิดา อติเวทิน. 2010. สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอสจากพืช : กลไกที่พืชใช้ในการป้องกันตัวเองจากแมลง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 29 (2): 88-99.

ผลงานวิจัย

อรวรรณ แสงสุข พนิดา อติเวทิน สมพร มุลมั่งมี และปติพงษ์ ไต่บันลือภพ. 2553. สารสกัด trypsin inhibitors จากเมล็ดขี้กาแดง (*Gymnopetalum integrifolium* Kurz.). วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 41 (2) พิเศษ : in press.