การยับยั้งเพคติเนสของสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวดำ

Pectinase Inhibition of Protein Extracts from *Vigna radiata* (L.) Wilczek and *Vigna mungo* (L.) Hepper Seeds

พรศิริ เลี้ยงสกุล[1*] ประภาสิริ องค์รักษ์[1] ปลายมีน อำนวยชีวะ[2] กนกวรรณ เที่ยงธรรม[1] อนุรักษ์ อรัญญนาค[1] และประกิจ สมท่า[1]

Ponsiri Liangsakul[1*], Prapasiri Ongrak[1], Plaimein Amnuaycheewa[2], Kanokwan Teingtham[1] Anuruck Arunyanark[1], and Prakit Somta[1]

Received: July 25, 2023
Revised: November 3, 2023
Accepted: November 9, 2023

Abstract: Bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.) is one of the most problematic insects for the storage of mungbean. The insect pest secretes pectinase to break down pectin, a polysaccharide found in plant cell walls, enabling it to infiltrate, feed on, causing damage. The differences in resistance to bruchids among mungbean varieties could be associated with the inhibitory effects of pectinase activity. Therefore, the objective of this study was to examine pectinase inhibitory activity of protein extracted from two mung bean cultivars (KPS1 and KUML3) and one black gram cultivar (CN80). Effects of testing dose and heat stability of the protein extracts on the pectinase inhibition were also evaluated. The experimental results revealed that raw seeds from the three mungbean cultivars exhibited pectinase inhibition activity. However, the black gram cultivar CN80 showed the greatest inhibitory. Pectinase inhibition activity was increased proportionally with the rising quantity of protein extracts. Moreover, it was observed that boiling for 10 minutes resulted in a decrease in the enzyme inhibition capability of all protein extracts, yet with varied degree of diminution. This experiment illustrated that the genetics of mungbeans, the quantity used, and the preparation of protein extracts all had an impact on pectinase inhibition activity. Nevertheless, it is essential to conduct studies on the specific proteins associated with pectinase inhibition activity to gain better understanding of the mechanisms of resistance against bruchids. This understanding can be applied to mungbean breeding programs for bruchid resistance in the future.

Keywords: mung bean, black gram, protein extract, pectinase, pectinase-inhibiting protein

---

[1] ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[1] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Sean, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Kamphaeng Sean, Nakhon Pathom, 73140

[2] ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร อาหาร และสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ กรุงเทพฯ 10800

[2] Department of Agro-Industrial, Food, and Environmental Technology, Faculty of Applied Science, KMUTNB, Bangkok 10800

*Corresponding author: agrpsr@ku.ac.th

บทคัดย่อ: ด้วงถั่วเขียวเป็นแมลงศัตรูในโรงเก็บที่สำคัญ โดยด้วงถั่วเขียวมีการหลั่งเพคติเนสเพื่อย่อยเพคติน ซึ่งเป็นโพลิแซคคาไรด์ที่พบในผนังเซลล์พืช ทำให้สามารถเข้าไปกัดกินและทำลายเมล็ดถั่วเขียว ความต้านทานการเข้าทำลายของด้วงถั่วเขียวที่แตกต่างกันในถั่วเขียวแต่ละสายพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการยับยั้งเพคติเนส ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินกิจกรรมการยับยั้งเพคติเนส ผลของปริมาณที่ใช้ทดสอบ และความคงตัวต่อความร้อนของสารสกัดโปรตีนจากถั่วเขียวผิวมันสองพันธุ์ (KPS1 และ KUML3) และถั่วเขียวผิวดำหนึ่งพันธุ์ (CN80) ผลการทดลองพบว่า เมล็ดถั่วเขียวดิบทั้งสามพันธุ์มีกิจกรรมการยับยั้งเพคติเนส แต่ถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 แสดงกิจกรรมดังกล่าวสูงที่สุด กิจกรรมการยับยั้งเพคติเนสเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณสารสกัดโปรตีนที่เพิ่มขึ้น และยังพบว่า การต้มสารสกัดโปรตีนให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ของสารสกัดโปรตีนจากถั่วเขียวทั้งสามพันธุ์ลดลง แต่มีระดับการลดลงที่ต่างกัน การทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า พันธุกรรมถั่วเขียว ปริมาณ และการเตรียมสารสกัดโปรตีนมีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งเพคติเนส อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาชนิดของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเพคติเนส เพื่อให้เข้าใจกลไกความต้านทานด้วงถั่วเขียวเพิ่มขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้คัดเลือกถั่วเขียวให้มีความต้านทานด้วงถั่วเขียวต่อไปได้

คำสำคัญ: ถั่วเขียวผิวมัน, ถั่วเขียวผิวดำ, สารสกัดโปรตีน, เพคติเนส, โปรตีนที่ยับยั้งเพคติเนส

คำนำ

ถั่วเขียวเป็นพืชล้มลุกในวงศ์ถั่ว (Fabaceae หรือ Leguminosae) สามารถปลูกได้ตลอดปี แต่ช่วงที่นิยมปลูกกันมาก คือ ฤดูแล้งหลังการทำนาปี ต้นฤดูฝน และปลายฤดูฝนหลังเก็บเกี่ยวพืชไร่หลัก การจำแนกถั่วเขียวสามารถจำแนกตามลักษณะสีเปลือกนอกของเยื่อหุ้มเมล็ดออกเป็นสองประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ ถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiata*; mung bean หรือ green bean) ซึ่งเมล็ดมีสีเขียวและเป็นมัน และถั่วเขียวผิวดำ (*Vigna mungo*; black gram) ซึ่งเมล็ดมีสีดำและไม่เป็นมัน (สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2557) ปัจจุบันนิยมนำถั่วเขียวผิวดำมาเพาะถั่วงอกเนื่องจากให้ถั่วงอกที่มีลักษณะสีขาว มีความกรอบ และรสชาติดีกว่าถั่วงอกที่เพาะจากถั่วเขียวผิวมัน ในขณะที่นิยมบริโภคถั่วเขียวผิวมันเพื่อเป็นแหล่งของโปรตีนจากพืชเพื่อทดแทนโปรตีนจากสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการบริโภคร่วมกับธัญพืชจะทำให้ได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นครบตามความต้องการของร่างกาย เมล็ดถั่วเขียวยังประกอบด้วยสารอาหารที่ค่อนข้างสมดุล โดยนอกจากอุดมไปด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตแล้ว ยังประกอบด้วยใยอาหาร แร่ธาตุ และวิตามินหลายชนิด จึงเป็นที่นิยมนำมาบริโภคและมีการปลูกอย่างแพร่หลายในหลายประเทศในทวีปเอเชีย เช่น จีน อินเดีย บังคลาเทศ ปากีสถาน และ ไทย (Hou *et al*., 2019)

ถั่วเขียวผิวมันเป็นหนึ่งในพืชไร่เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยการผลิตถั่วเขียวผิวมันในปี พ.ศ. 2565 มีผลผลิตทั้งหมด 105,689 ตัน คิดเป็นผลผลิตต่อไร่ 151 กิโลกรัม (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2565) อย่างไรก็ตามการผลิตถั่วเขียวมักประสบปัญหาการเข้าทำลายของด้วงเจาะเมล็ดถั่วหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งโดยทั่วไปสามารถควบคุมได้โดยการอบหรือการรมด้วยสารเคมี แต่การใช้สารเคมีอาจเป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการปลูกถั่วเขียวสายพันธุ์ที่สามารถต้านทานการเข้าทำลายของแมลงรวมถึงเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงถือเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการควบคุมด้วงเจาะเมล็ดถั่ว (สถาพร และคณะ, 2554) โดยแนวทางหนึ่งของการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวคือ การศึกษายีนหรือกลไกที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มเพคติเนส (pectinase) เช่น polygalacturonase (PG) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยเพคติน โดย PG มีบทบาททำลายพันธะ α-(1-4)-glycosidic ที่เชื่อม

D-galacturonic acid กับสายโพลิเมอร์ homogalacturonan ซึ่งเป็นโครงสร้างหนึ่งของเพคตินที่อยู่ในผนังเซลล์พืช ส่งผลให้เซลล์แตกและเนื้อเยื่อของพืชถูกทำลาย หรือกล่าวคือเอนไซม์ PG ที่ถูกปล่อยออกมาโดยแมลงศัตรูพืช เช่น ด้วงเจาะเมล็ดถั่ว หรือโดยเชื้อสาเหตุโรคพืช ส่งผลให้แมลงหรือเชื้อศัตรูพืชนั้นสามารถเข้าไปใช้ประโยชน์จากเซลล์พืชต่อไปได้ (Kalunke *et al*., 2015; Chotechung *et al*., 2016) อย่างไรก็ตาม พบว่าพืชมีกลไกต่างๆ เพื่อป้องกันการถูกคุกคามจากแมลงศัตรูพืชหรือจุลินทรีย์ก่อโรค หนึ่งในกลไกเหล่านั้นคือการหลั่งตัวยับยั้ง (inhibitor) ซึ่งเป็นโปรตีนมายับยั้งการทำงานของ PG จึงถูกเรียกโดยรวมว่า polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) มีรายงานว่า PGIP ประกอบด้วยกรดอะมิโน leucine จำนวนมาก และเมื่อจับกับ PG ทำให้เกิดโครงสร้าง oligogalacturonides (OGs) ที่พบออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองของพืช (Cervone *et al*., 1989; Ridley *et al*., 2001; Ferrari *et al*., 2013)

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมามีการรายงานสมบัติการยับยั้ง PG ของ PGIP ที่แยกจากเนื้อเยื่อของพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ ถั่วแขก มันฝรั่ง พริกไทย และฝ้าย เป็นต้น (Kalunke *et al*., 2015) Chotechung *et al*. (2016) ศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง PGIP ในถั่วเขียว ในเบื้องต้นพบว่ามีความต่างกันของกรดอะมิโนที่บางตำแหน่งใน PGIPs จากพันธุ์ที่ต้านทานและพันธุ์ที่อ่อนแอต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว จึงอาจเป็นไปได้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ต่างกันอาจเป็นผลมาจากโครงสร้างของตัวยับยั้งที่ต่างกัน อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาสมบัติการยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม pectinase ของโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ที่ถูกปลูกอย่างแพร่หลายในประเทศไทย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติในการยับยั้ง pectinase ของเมล็ดถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ด

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่างเมล็ดถั่วเขียว

เมล็ดถั่วเขียวที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ KPS1 ถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ KUML3 และ ถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 (Figure 1) โดยเมล็ดถั่วเขียวทั้งสามพันธุ์ ได้จากแปลงทดลองของภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน ที่ทำการปลูกในฤดูปลูกระหว่างเดือนธันวาคม 2560 - กุมภาพันธ์ 2561 และเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ระยะสุกแก่ของถั่วเขียวแต่ละพันธุ์ นำไปตากแดดให้แห้ง (ความชื้น 10 – 12%) แล้วนำเมล็ดใส่ในถุงพลาสติกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

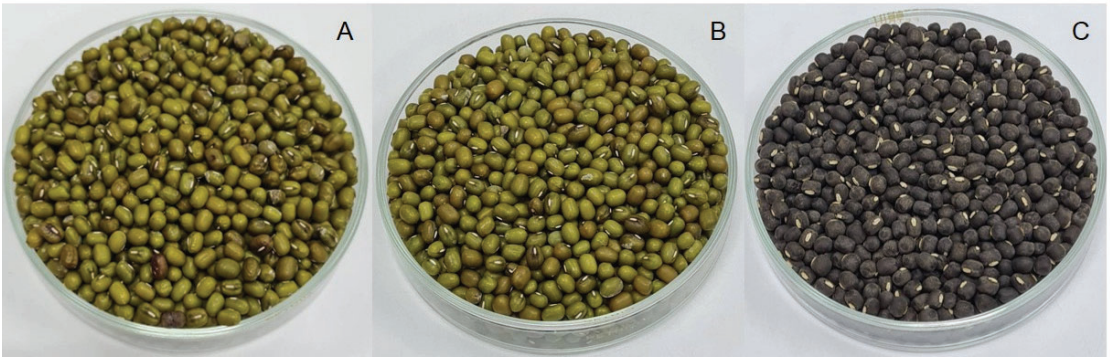

Figure 1 Mung bean seeds cultivars KPS1 (A) and KUML3 (B) and black gram seeds cultivar CN80 (C)

การสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียว

สกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวตามวิธีการของ Schacht *et al*. (2011) โดยนำตัวอย่างเมล็ดถั่วเขียวทั้งสามพันธุ์ พันธุ์ละ 1500 กรัม มาบดให้ละเอียด จากนั้นสุ่มตัวอย่างที่บดแล้วตัวอย่างละ 30 กรัม มาสกัดด้วย extraction buffer (10 มิลลิโมลาร์ MES, 1 โมลาร์ NaCl, pH 5.7) ในอัตราส่วน 1 : 5 (w/v) เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 20000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากเมล็ดถั่วเขียว ด้วยวิธี Bradford assay

เตรียมกราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin (BSA; Merck, USA) ความเข้มข้น 200 - 1400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลาย BSA แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร สารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียว 20 ไมโครลิตร และ Bradford dye reagent ปริมาตร 400ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลาย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader รุ่น Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, USA) นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไปคำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนในสารสกัดเมล็ดถั่วเขียวด้วยสมการจากกราฟมาตรฐาน ($y = 0.2761x + 0.2622$; $R^2 = 0.9964$)

การศึกษาสมบัติในการยับยั้ง pectinase ของสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียว

ดัดแปลงจากวิธีการของ Raiola *et al*. (2008) โดยนำตัวอย่างสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวผิวมันและถั่วเขียวผิวดำ ปริมาตร 10 20 และ 30 ไมโครลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube เติมสารละลาย activity buffer (50 มิลลิโมลาร์ sodium acetate pH 4.8 ที่มี 0.5% polygalacturonic acid (PGA, Sigma Life Science, Switzerland) และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม pectinase (0.86 Unit/mL) (Sigma Life Science, USA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม Milner-Avigard Cu reagent (NaCl 4 โมลาร์, sodium acetate 0.7 โมลาร์ และ $CuSO_4.5H_2O$ 20 มิลลิโมลาร์, pH 4.8) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 10 นาที นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu reagent : น้ำ (1 : 40) 800 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ปิเปตสารละลายปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader รุ่น Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, USA) นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณความเข้มข้นของ D-galacturonic acid จากสมการมาตรฐาน ($y = 0.0011x + 0.0969$; $R^2 = 0.9987$) จากนั้นคำนวณค่า activity ของ pectinase (Li *et al*., 2015) ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{Activity } (\mu\text{/mL}) = \frac{\mu\text{g D-galacturonic acid released}}{\text{enz. broth volume (mL) used x 194.1 xt}}$$

โดยที่ t = ระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

และ MW ของ D-galacturonic acid = 194.1 g/mol

ทำการทดลองอีกหนึ่งชุดการทดลองโดยใช้สารสกัดโปรตีนที่ผ่านการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วคำนวณค่า activity ของ pectinase เปรียบเทียบกับการทดลองที่ใช้สารสกัดโปรตีนที่ไม่ผ่านการต้ม การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง pectinase คำนวณจากสมการ

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{(pectinase activity of control (without protein extracts) - pectinase activity of sample)}}{\text{pectinase activity of control (without protein extracts)}} \text{ x } 100$$

การเตรียมกราฟมาตรฐาน D-galacturonic acid

เตรียมสารละลายมาตรฐาน D-galacturonic acid (Sigma-Aldrich, USA) ที่ความเข้มข้น 25 75 100 125 150 175 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน microcentrifuge tube เติม Milner-Avigard Cu reagent (NaCl 4 โมลาร์, sodium acetate 0.7 โมลาร์ และ $CuSO_4.5H_2O$ 20 มิลลิโมลาร์, pH 4.8) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 10 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที เติมสารละลายผสม Folin-Ciocalteu reagent : น้ำ (1 : 40) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตสารละลาย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน 96-well microplate ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader รุ่น Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, USA) บันทึกผลและสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสาร D-galacturonic acid

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลปริมาณ D-galacturonic acid กิจกรรม pectinase และร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ ด้วยแผนการทดลองแบบ 2×3×3 factorial in completely randomized design (CRD) และคำนวณค่าสถิติ F (F-value) และผลรวมทั้งหมดของความเบี่ยงเบนยกกำลังสอง (total sum of squares) คำนวณเป็นร้อยละเพื่อระบุสัดส่วนของความแปรปรวนซึ่งเป็นผลจากอิทธิพลของแต่ละปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ การต้มตัวอย่าง ปริมาณสารสกัดและพันธุ์ถั่วเขียว จากนั้นคำนวนค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error; SE) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยใช้โปรแกรม R (R-statistics) และ Microsoft excel ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้ง pectinase **ของสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียว**

ในปี 2021 Zhang *et al*. ได้รายงานโปรตีน PGIP 2 ชนิด ในถั่วเขียว ได้แก่ VrPGIP1 และ VrPGIP2 ว่าเกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว (*Callosobruchus maculatus*) ของถั่วเขียวพันธุ์ V2802 นอกจากนี้ยังมีรายงานโปรตีน VrD1 หรือ *V. radiata defensin* 1 ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์ VC6089 ว่าเป็นโปรตีนที่อุดมด้วยกรดอะมิโน cysteine และส่งผลต่อความต้านทานด้วงเจาะเมล็ดถั่ว (*C. maculatus*) เช่นกัน (War *et al*., 2017) และมีรายงานวิจัยว่าโปรตีน PGIP ที่แยกได้จากพืชชนิดอื่น เช่นผลเกรปฟรุต สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ PG (เอนไซม์ในกลุ่ม pectinase) ที่ได้มาจากเชื้อ *Penicilium italicum* และ *Botrytis cinerea* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในพืชตระกูลส้มได้ (D'hallewin *et al*., 2004) สำหรับการทดสอบสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ pectinase ของสารสกัดโปรตีน ใช้วิธีการวิเคราะห์ปริมาณของ D-galacturonic acid ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสารตั้งต้น polygalacturonic acid โดยเอนไซม์ แล้วนำมาคำนวณค่ากิจกรรม pectinase จากปริมาณสาร D-galacturonic acid ที่ได้โดยใช้สมการจากกราฟมาตรฐาน โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่น้อยกว่าค่าที่ได้จากการทดลองควบคุม (control) บ่งชี้ว่าเอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งโดยสารที่มีในตัวอย่าง ในการทดลองนี้ได้สกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ KPS1 และ KUML3 และถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ pectinase ซึ่งปริมาณโปรตีนในสารสกัดของถั่วเขียวทั้งสามพันธุ์ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Bradford assay มีค่าเท่ากับ 9.75 10.65 และ 8.55 mg/g dry weight ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ D-galacturonic acid กิจกรรม pectinase และร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ของตัวอย่างสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วทั้งสามพันธุ์ ที่แปรผันปริมาณสารสกัดในการทำการทดลอง และที่เปรียบเทียบผลของการผ่านการต้มในน้ำเดือด พบว่า ทั้งสามปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อปริมาณ D-galacturonic acid ต่อกิจกรรม pectinase และต่อร้อยละการยับยั้งเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) (Table 1)

นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วม (interaction) ระหว่างพันธุ์ถั่วเขียวกับปริมาณสารสกัดโปรตีน พันธุ์ถั่วเขียวกับการต้ม ปริมาณสารสกัดโปรตีนกับการต้ม รวมถึงพบอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์ถั่วเขียวกับปริมาณสารสกัดโปรตีนกับการต้มอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยระดับความแปรปรวนสูงสุดของปริมาณ D-galacturonic acid เกิดจากปริมาณสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวและการต้ม 42.15% และ 36.15% ตามลำดับ ระดับความแปรปรวนสูงสุดของกิจกรรม pectinase เกิดจากปริมาณสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวและการต้ม 42.13% และ 36.07% ตามลำดับ และระดับความแปรปรวนสูงสุดของร้อยละการยับยั้งเอนไซม์เกิดจากการต้มและปริมาณสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียว 40.03% และ 39.46% ตามลำดับ ในขณะที่ระดับความแปรปรวนของปริมาณ D-galacturonic acid กิจกรรม pectinase และร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ที่เกิดจากพันธุ์ถั่วเขียว และอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์ถั่วเขียวกับปริมาณสารสกัดโปรตีน พันธุ์ถั่วเขียวกับการต้ม ปริมาณสารสกัดโปรตีนกับการต้ม และระหว่างพันธุ์ถั่วเขียวกับปริมาณสารสกัดโปรตีนและการต้มค่อนข้างต่ำ 1.16% ถึง 6.99% ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าทั้งพันธุ์ถั่วเขียว ปริมาณสารสกัดโปรตีน และการต้ม รวมถึงอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยที่ศึกษาต่างมีอิทธิพลต่อปริมาณ D-galacturonic acid กิจกรรม pectinase และร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ แต่การต้มและปริมาณสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวมีอิทธิพลสูงสุดต่อค่าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งเอนไซม์ทั้งสาม

Table 1 Statistics F from the variance analysis and the percentage share of effects in the total sum of squares of an attribute for D-galacturonic acid content, pectinase activity and percentage inhibition

Source of variation		D-galacturonic acid content (μg/mL)			Pectinase activity (U/mL)			Percentage inhibition (%)		
	df	F		Share (%)	F		Share (%)	F		Share (%)
Boiling (B)	1	859.01	**	36.15	844.57	**	36.07	1,017.34	**	40.03
Extract volume (V)	2	500.83	**	42.15	493.27	**	42.13	501.44	**	39.46
Genotype (G)	2	71.44	**	6.01	71.09	**	6.07	71.54	**	5.63
B x V	2	38.87	**	3.27	38.09	**	3.25	41.81	**	3.29
B x G	2	31.63	**	2.66	30.87	**	2.64	31.93	**	2.51
G x V	4	41.53	**	6.99	41.29	**	7.05	41.32	**	6.50
G x V x B	4	7.41	**	1.25	7.30	**	1.25	7.39	**	1.16
Error	36			1.51			1.54			1.42
Total	53			100.00			100.00			100.00

**, significant for $P < 0.01$

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณสาร D-galacturonic acid กิจกรรม pectinase และร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ระหว่างพันธุ์ถั่วเขียว พบว่า สารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 ทำให้เกิด D-galacturonic acid และกิจกรรม pectinase น้อยที่สุดคือ 217.71 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.87 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 2A and 2B) ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติบ่งชี้ว่าพันธุ์มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว โดยพบว่าสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 แสดงกิจกรรม การยับยั้ง pectinase โดยเฉลี่ยของทั้งสามปริมาณที่ใช้ในการทดสอบสูงที่สุดที่

34.67% (Figure 2C) ในขณะที่สารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ KPS1 และ KUML3 แสดงกิจกรรมดังกล่าวโดยเฉลี่ยใกล้เคียงกันและอยู่ที่ประมาณ 25% หรือน้อยกว่าที่พบจากตัวอย่างเมล็ดถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 ประมาณ 1.4 เท่า ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์ KUML3 ที่มีปริมาณโปรตีนในสารสกัดสูงที่สุด ไม่ได้แสดงกิจกรรมยับยั้ง pectinase สูงที่สุด แสดงว่าในสารสกัดโปรตีนที่สกัดได้นั้นประกอบด้วยทั้งโปรตีนที่มีคุณสมบัติยับยั้ง pectinase และโปรตีนที่ไม่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้ และเป็นไปได้ว่าในสารสกัดโปรตีนของเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์ KUML3 มีปริมาณโปรตีนที่มีคุณสมบัติยับยั้ง pectinase ต่ำกว่าถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 จากการศึกษาอิทธิพลของการต้ม พบว่าการต้มสารสกัดของโปรตีนส่งผลให้เมื่อนำไปทดสอบมีประสิทธิภาพในการทำให้เกิด D-galacturonic acid และกิจกรรม pectinase เพิ่มสูงขึ้นมา 1.4 เท่า (Figure 3A and 3B) โดยส่งผลให้ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ลดลงไป 2.5 เท่า แต่ยังพบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวโดยเฉลี่ยเหลืออยู่ประมาณ 16% (Figure 3C) แสดงให้เห็นว่าการต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาทีส่งผลให้เกิดการเสียสภาพบางส่วนของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้ง pectinase ในถั่วทั้งสามพันธุ์ บ่งชี้ว่าการได้รับความร้อนและระดับความร้อนที่ได้รับส่งผลต่อกิจกรรมยับยั้ง pectinase ของถั่วเขียวทั้งสองประเภท ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ D'hallewin *et al*. (2004) ที่ได้ศึกษาผลของการให้ความร้อนต่อคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ PG ของโปรตีนสกัดจากผลเกรปฟรุต โดยพบว่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PG ของสารสกัดโปรตีนลดลง 43% เมื่อสารสกัดได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที และเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ PG ของสารสกัดโปรตีนลดลงอย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้กระบวนการเก็บเกี่ยวถั่วเขียวโดยทั่วไปก็เกี่ยวข้องกับการได้รับความร้อน เพราะมักทำโดยนำฝักถั่วเขียวที่สุกแก่ไปผึ่งแดดเพื่อลดความชื้นให้เหลือประมาณร้อยละ 11 - 13 จากนั้นจึงนำไปกะเทาะเมล็ด แล้วนำเมล็ดที่ได้ไปผึ่งแดดอีกครั้งเพื่อลดความชื้นให้เหลือประมาณร้อยละ 11 - 12 จึงเป็นที่น่าสนใจว่าในกระบวนการดังกล่าวส่งผลต่อการลดลงของกิจกรรมยับยั้ง pectinase ของถั่วเขียวอันจะมีผลต่อความทนทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่ว หรือต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชอย่างไร คณะผู้วิจัยจึงวางแผนศึกษาเรื่องดังกล่าวเพิ่มเติม นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติบ่งชี้ว่าปริมาณของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้ง pectinase ในส่วนสกัดโปรตีนมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อปริมาณ D-galacturonic acid กิจกรรม pectinase และร้อยละการยับยั้ง pectinase โดยการใช้สารสกัดโปรตีนเพิ่มขึ้น 2 เท่า จาก 10 ไมโครลิตร เป็น 20 ไมโครลิตร ส่งผลให้โดยเฉลี่ยแล้วทำให้เกิด D-galacturonic acid และกิจกรรม pectinase ลดลง 1.2 เท่า และส่งผลให้ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์เพิ่มขึ้น 2.3 เท่า ในขณะที่การใช้สารสกัดโปรตีนเพิ่มขึ้น 3 เท่า จาก 10 ไมโครลิตร เป็น 30 ไมโครลิตร ส่งผลให้โดยเฉลี่ยแล้วทำให้เกิด D-galacturonic acid และกิจกรรม pectinase ลดลง 1.5 เท่า และส่งผลให้ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์เพิ่มขึ้น 3.3 เท่า (Figure 4A - 4C) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกับรายงานวิจัยของ Zhang *et al*. (2021) ที่ได้แยกโปรตีน VrPGIP จากเมล็ดถั่วเขียวและนำไปทดสอบคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ PG ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม pectinase จากด้วงเจาะเมล็ดถั่วเขียว (*C. maculatus*) พบว่า ปริมาณโปรตีน VrPGIP ที่มากขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ PG เพิ่มขึ้น โดยสรุปปริมาณของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้ง pectinase ที่มากขึ้นส่งผลให้มีกิจกรรมการยับยั้ง pectinase ที่มากขึ้น หรือก็คือมีความเป็นไปได้ที่จะปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวให้มีการแสดงออกของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้ง pectinase เพิ่มมากขึ้นเพื่อให้มีความทนทานต่อด้วงเจาะเมล็ดถั่วและเชื้อสาเหตุโรคพืชมากขึ้น คณะผู้วิจัยวางแผนดำเนินการระบุโปรตีนที่มีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวโดยการทำบริสุทธิ์ทำการยืนยันด้วยเทคนิคแมสสเปกโตรเมทรี จากนั้นจึงทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของโปรตีนแต่ละตัวที่แยกได้ในลำดับถัดไป

เนื่องจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบอิทธิพลร่วมระหว่างทั้งสามปัจจัยที่ศึกษาต่อปริมาณ D-galacturonic acid กิจกรรม pectinase และร้อยละการยับยั้งเอนไซม์จึงทำการยืนยันเปรียบเทียบสมบัติการยับยั้ง pectinase ของสารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวทั้งสามพันธุ์ โดยทำการทดสอบสารสกัดโปรตีนที่ไม่ผ่านและที่ผ่านการต้ม ในปริมาณสารสกัดโปรตีนทั้งสามระดับร่วมกับการทดลองควบคุม (control) ผลการทดสอบยืนยันว่าสารสกัดโปรตีนปริมาณ 10 ไมโครลิตร ที่ผ่านการต้มเดือดนาน 10 นาที ของถั่วเขียวแต่ละพันธุ์ ทำให้ได้ปริมาณ D-galacturonicacid สูงกว่าหรือไม่แตกต่างกับการทดลองควบคุม (Figure 5A and 5B) ซึ่งแสดงว่าตัวอย่างดังกล่าวไม่แสดงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดโปรตีนในการทดสอบให้สูงขึ้นพบว่าปริมาณ D-galacturonic acid ที่วัดได้ลดลงต่ำกว่าการทดลองควบคุมในถั่วเขียวทั้งสามพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารสกัดมีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ โดยเฉพาะในตัวอย่างที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนมีปริมาณ D-galacturonic acid ต่ำกว่าเมื่อทดสอบด้วยตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อน และปริมาณ D-galacturonic acid ที่วัดได้มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ถั่วเขียว โดยที่สารสกัดโปรตีน ปริมาณ 30 µL ที่ผ่านการต้ม ของถั่วเขียวพันธุ์ KPS1 และ CN80 มีปริมาณ D-galacturonic acid ต่ำที่สุด และสารสกัดโปรตีนปริมาณ 30 ไมโครลิตร ที่ไม่ผ่านการต้ม ของถั่วเขียวพันธุ์ KUML3 และ CN80 มีปริมาณ D-galacturonic acid ต่ำที่สุด สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางสถิติก่อนหน้า (Figure 5A and 5B) และพบแนวโน้มเดียวกันในกิจกรรม pectinase (Figure 6A and 6B)

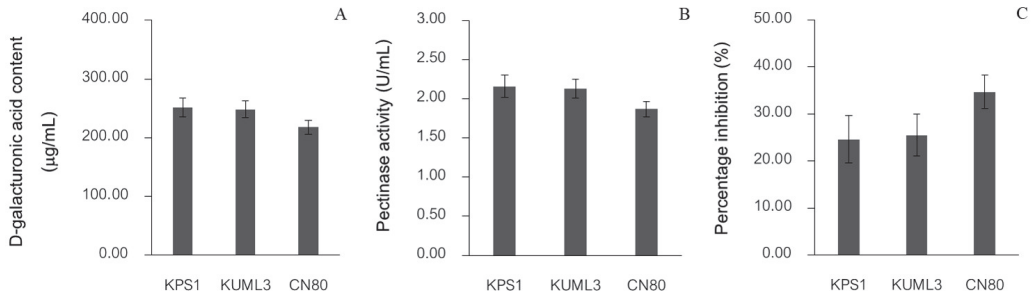

Figure 2 Mean comparison of seed protein extracts from three Vigna genotypes for D-galacturonic acid content (A), pectinase activity (B), and percentage inhibition (C). The error bars represent SE.

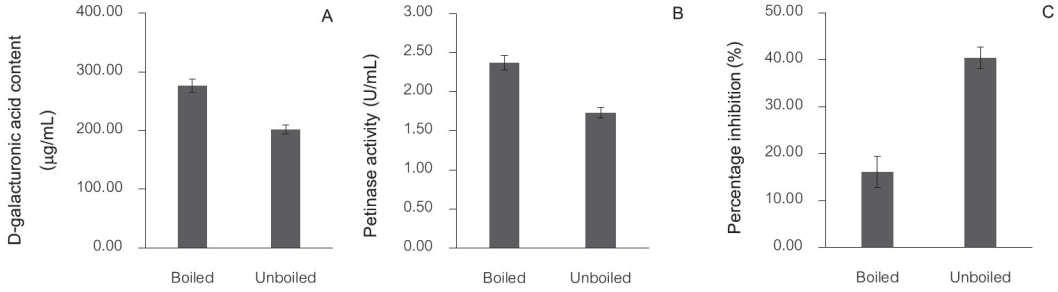

Figure 3 Mean comparison of boiled and unboiled Vigna seed protein extracts for D-galacturonic acid content (A), pectinase activity (B) and percentage inhibition (C). The error bars represent SE.

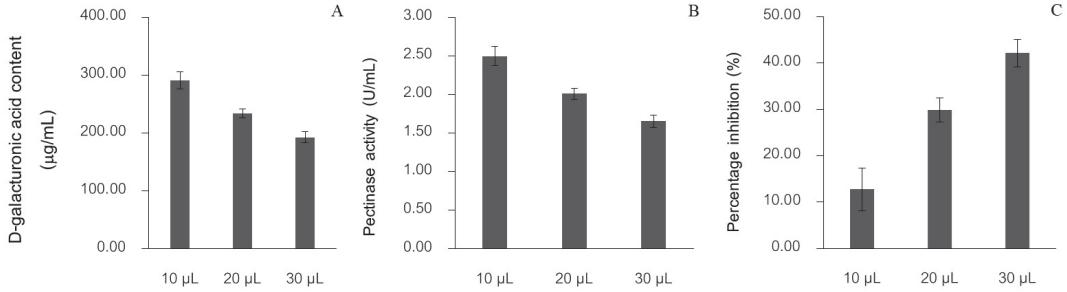

Figure 4 Mean comparison of Vigna seed protein extract from three testing volumes for D-galacturonic acid content (A), pectinase activity (B) and percentage inhibition (C). The error bars represent SE.

สำหรับร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ พบว่าสารสกัดโปรตีนปริมาณ 10 ไมโครลิตร ที่ผ่านการต้มมีร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ต่ำจนพบค่าที่คำนวณได้ติดลบในถั่วเขียวพันธุ์ KPS1 และ KUML3 (Figure 7A and 7B) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดโปรตีนในการทดสอบให้สูงขึ้นพบว่ามีร้อยละการยับยั้งเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นในถั่วเขียวทั้งสามพันธุ์ โดยสำหรับถั่วเขียวพันธุ์ KPS1 นั้นการเพิ่มปริมาณสารสกัดโปรตีนที่ผ่านการต้มในการทดสอบให้สูงถึง 30 ไมโครลิตร ส่งผลให้ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ใกล้เคียงกับผลการทดสอบด้วยสารสกัดโปรตีนที่ไม่ผ่านการต้มที่ปริมาณ 20 ไมโครลิตร เช่นเดียวกับถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 การเพิ่มปริมาณสารสกัดโปรตีนที่ผ่านการต้มในการทดสอบให้สูงถึง 30 ไมโครลิตร ส่งผลให้ร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ใกล้เคียงกับผลการทดสอบด้วยสารสกัดโปรตีนที่ไม่ผ่านการต้มที่ปริมาณ 10 ไมโครลิตร และ 20 ไมโครลิตร ในขณะที่ถั่วเขียวพันธุ์ KUML3 นั้นเมื่อเปรียบเทียบที่ปริมาณสารสกัดโปรตีนที่ใช้ในการทดสอบเดียวกัน พบว่าการผ่านการต้มส่งผลให้เกิดการลดลงของกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ที่ทั้งสามปริมาณที่ใช้ในการทดสอบ บ่งชี้ว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม pectinase ในถั่วเขียวพันธุ์ KUML3 เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเสียสมบัติการยับยั้งจากการต้มดังกล่าว เมื่อทำการทดสอบด้วยสารสกัดโปรตีนที่ไม่ผ่านการต้มที่ปริมาณ 10 ไมโครลิตร พบว่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ของถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 สูงกว่าของถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ KUML3 และของถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ KPS1 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบโดยใช้สารสกัดโปรตีนที่ไม่ผ่านการต้มที่ปริมาณ 20 ไมโครลิตร และ 30 ไมโครลิตร พบว่าถั่วเขียวทั้งสามพันธุ์แสดงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ใกล้เคียงกันโดยเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 40% และ 50% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาถั่วเขียวไม่ให้เกิดการเสียสภาพหรือการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม pectinase เป็นสิ่งสำคัญ ในขณะที่แม้ว่าถั่วเขียวแต่ละพันธุ์จะมีการแสดงออกของโปรตีนที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม pectinase แตกต่างกัน แต่หากสามารถปรับปรุงพันธุ์โดยเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนกลุ่มดังกล่าวได้จะทำให้ถั่วเขียวมีความสามารถในการต้านทานเพิ่มสูงขึ้น

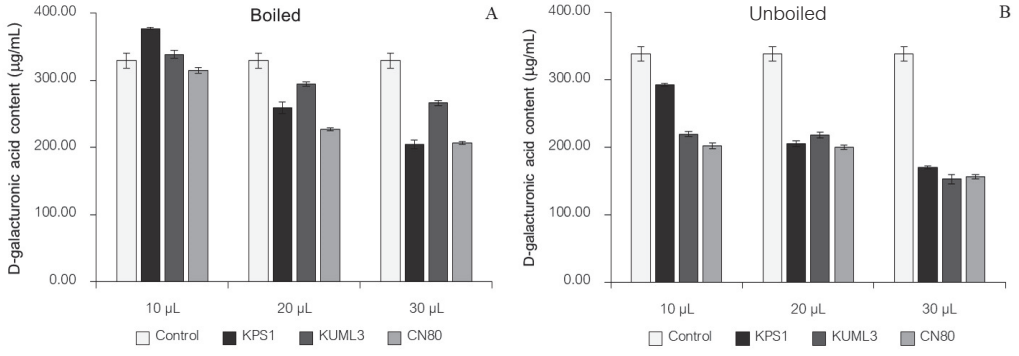

Figure 5 D-galacturonic acid content of boiled (A) and unboiled (B) seed protein extracts from three Vigna genotypes at different volumes compared with control. The error bars represent SE.

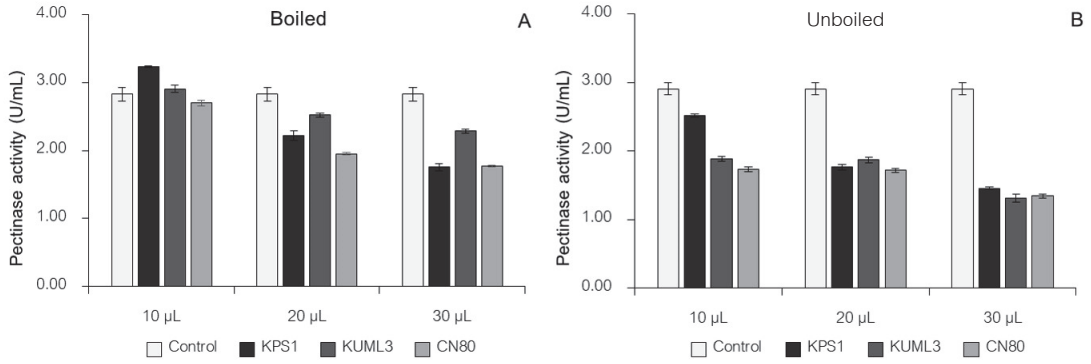

Figure 6 Pectinase activity of boiled (A) and unboiled (B) seed protein extracts from three Vigna genotypes at different volumes compared with control. The error bars represent SE.

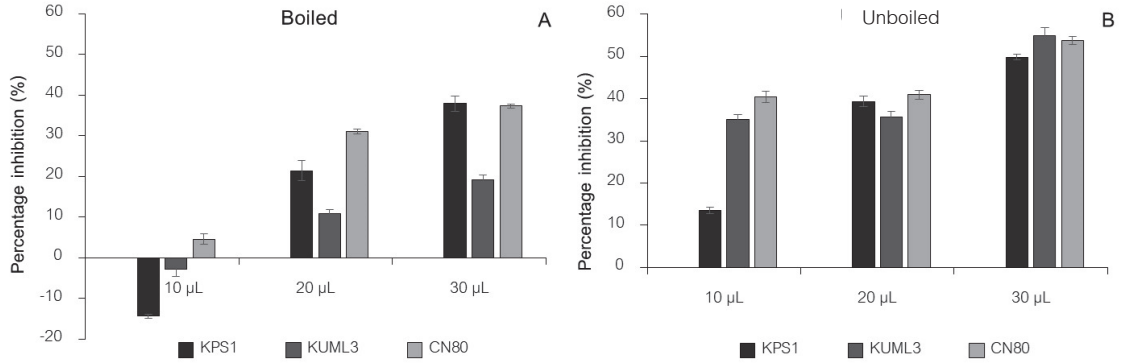

Figure 7 Percentage inhibition of boiled (A) and unboiled (B) seed protein extracts from three Vigna genotypes at different volumes compared with control. The error bars represent SE.

สรุป

สารสกัดโปรตีนจากเมล็ดถั่วเขียวผิวมันพันธุ์ KPS1 และ KUML3 และถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 ที่ทำการศึกษาแสดงสมบัติการยับยั้ง pectinase ในระดับที่ต่างกัน โดยเมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบพบว่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวเพิ่มสูงขึ้น และสามารถเพิ่มไปอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันได้ จึงสรุปได้ว่ามีความแปรผันของกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวในถั่วทั้งสามพันธุ์ และในการศึกษานี้ถั่วเขียวผิวดำพันธุ์ CN80 แสดงกิจกรรมการยับยั้ง pectinase มากที่สุด และกิจกรรมการยับยั้ง pectinase ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดที่ใช้ในการทดสอบของถั่วเขียวทั้งสามพันธุ์บ่งชี้ว่ามีความเป็นไปได้ในการคัดเลือกหรือปรับปรุงพันธุ์ต้านทานที่แสดงกิจกรรมการยับยั้ง pectinase สูง

จากการศึกษาผลของการให้ความร้อนโดยการต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือดนาน 10 นาที พบว่าการได้รับความร้อนรวมถึงระดับของความร้อนที่ได้รับทำให้กิจกรรมการยับยั้ง pectinase ของสารสกัดจากถั่วทั้งสามพันธุ์ลดลง แต่พบว่าโปรตีนหรือสารส่วนใหญ่ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม pectinase จากถั่วเขียวพันธุ์ KUML3 เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือเสียสมบัติการยับยั้งจากการต้มดังกล่าวมากที่สุด จึงสรุปได้ว่ามีความต่างกันในปริมาณของสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม pectinase ในถั่วเขียวทั้งสามพันธุ์ซึ่งคณะผู้วิจัยจะทำการศึกษาระบุชนิดและการเสียสภาพของโปรตีนที่แสดงกิจกรรมการยับยั้ง pectinase ในลำดับถัดไป และยังสรุปได้ว่าเก็บรักษาถั่วเขียวไม่ให้เกิดการเสียสภาพหรือการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม pectinase เป็นสิ่งสำคัญ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (รหัสโครงการ PRP6005020420) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่สนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2557. งานวิจัยและพัฒนาพันธุ์ถั่วเขียว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. แหล่งที่มา: https://www3.rdi.ku.ac.th/?p=6781 (3 มีนาคม 2566).

สถาพร โชติช่วง สมพงศ์ จันทร์แก้ว พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์ และประกิจ สมท่า. 2554. การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีนที่ควบคุมความต้านทานต่อด้วงถั่วในถั่วเขียว. แก่นเกษตร 39 ฉบับพิเศษ 3: 221-226.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2565. พืชไร่: ถั่วเขียว. สารสนเทศเศรษฐกิจการเกษตรรายสินค้า ปี 2565. 25-26.

Cervone, F., M. G. Hahn, G. De Lorenzo, A. Darvill and P. Albersheim. 1989. Host-pathogen interaction XXXIII. A plant protein converts a fungal pathogenesis factor into an elicitor of plant defense responses. Plant Physiology 90: 542-548.

Chotechung, S., P. Somta, J. Chen, T. Yimram, X. Chen and P. Srinives. 2016. A gene encoding a polygalactu ronase-inhibiting protein (PGIP) is a candidate gene for bruchid (Coleoptera: bruchidae) resistance in mungbean (*Vigna radiata*). Theoretical and Applied Genetics 129: 1673-1683.

D'hallewin, G., M. Schirra, A. L. T. Powell, L. C. Greve and J. M. Labavitch. 2004. Properties of a polygalacturonase-inhibiting protein isolated from 'Oroblanco' grapefruit. Physiologia Plantarum 120(3): 395-404.

Ferrari, S., D. V. Savatin, F. Sicilia, G. Gramegna, F. Cervone and G. De Lorenzo. 2013. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. Frontiers in Plant Science 4: 49.

Hou, D., L. Yousaf, Y. Xue, J. Hu, J. Wu, X. Hu, N. Feng and Q. Shen. 2019. Mung bean (*Vigna radiata* L.): bioactive polyphenols, polysaccharides, peptides, and health benefits. Nutrients 11: 1238.

Kalunke, R. M., S. Tundo, M. Benedetti, F. Cervone, G. De Lorenzo and R. D'Ovidio. 2015. An update on poly galacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein that protects crop plants against pathogens. Frontiers in Plant Science 6: 146.

Li, Q., A. M. Coffman and L. K. Ju. 2015. Development of reproducible assays for polygalacturonase and pectinase. Enzyme and Microbial Technology 72: 42-48.

Raiola, A., L. Sella, C. Castiglioni, V. Balmas and F. Favaron. 2008. A single amino acid substitution in highly s i m i l a r endo-PGs from *Fusarium verticillioides* and related Fusarium species affects PGIP inhibition. Fungal Genetics and Biology 45(5): 776-789.

Ridley, B. L., M. A. O'Neill and D. Mohnen. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. Phytochemistry 57: 929-967.

Schacht, T., C. Unger, A. Pich and K. Wydra. 2011. Endo- and exopolygalacturonases of *Ralstonia solanacearum* are inhibited by polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) activity in tomato stem extracts. Plant Physiology and Biochemistry 49(4): 377-387.

War, A. R., S. Murugesan, V. N. Boddepalli, R. Srinivasan and R. M. Nair. 2017. Mechanism of resistance in mungbean [*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek var. radiata] to bruchids, *Callosobruchus* spp. (Coleoptera: Bruchidae). Frontiers in Plant Science 8: 1031.

Zhang, Q., Q. Yan, X. Yuan, Y. Lin, J. Chen, R. Wu, C. Xue, Y. Zhu and X. Chen. 2021. Two polygalac turonase-inhibiting proteins (VrPGIP) of *Vigna radiata* confer resistance to bruchids (*Callosobruchus* spp.). Journal of Plant Physiology 258-259: 153376.