

การใช้ไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* เพื่อยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไย

USING OF CHITOSAN FROM *Mucor rouxii* FOR INHIBITION OF LONGAN FUNGAL PATHOGENS

ผู้วิจัย

น้ำค้าง สวัสดิ์ประดิษฐ์¹

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัลทิมา พิษย์²

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนิดา รัชเวทย์³

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG medium และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB สูตรดัดแปลงแป้งข้าวเจ้าเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ และทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 5 วัน พบว่า อาหาร BG medium ที่มีแป้งข้าวเจ้าที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการผลิตไคโตซานได้สูงที่สุดในวันที่ 3 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 179.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณไคโตซาน 44.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดไคโตซานที่ได้มีค่า pH เท่ากับ 6.5 ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ 749.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบสารประกอบของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* กับไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ด้วยเครื่อง FTIR spectrophotometer เพื่อดูความเหมือนหรือความแตกต่างระหว่างสารประกอบของไคโตซาน จากผลค่าการดูดกลืนแสงของสารพบว่า สารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ที่ได้ใกล้เคียงกับไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) โดยมีหมู่สำคัญเหมือนกัน เช่น C=O stretching ของหมู่ amide ที่ประมาณ $1400-1650\text{ cm}^{-1}$ และหมู่ NH stretching ที่ประมาณ $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ และหมู่ OH stretching ที่ประมาณ $1080-2885\text{ cm}^{-1}$ จากนั้นนำไคโตซานที่ได้ไปศึกษาผลของสารสกัดไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย พบว่า สารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ทุกระดับความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Aspergillus niger* จากลำไยได้สูงกว่าไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ในขณะที่สารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii*

¹ นักศึกษา สาขาวิชาการสอนวิทยาศาสตร์ (ชีววิทยา) หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

² ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

³ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

ทุกระดับความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* และ *Penicillium* sp. จากลำไย ไกล่เคียงกับไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์)

คำสำคัญ : ไคโตซาน, เชื้อรา, ชีวมวล, การสกัด, น้ำหนักเซลล์แห้ง

ABSTRACT

Chitosan production by *Mucor rouxii* was determined by using liquid culture technique, BG and PDB which was formula adapted using rice flour as a carbon-source with concentration of 1, 2, 3, 4 and 5 percent. and incubated for five days. It was found that BG medium added with 2% rice flour produced the most chitosan amount in the third day. Cell dry weight was 179.29 milligrams per millilitre. The quantity of chitosan was 44.36 milligrams per millilitre with pH of 6.5 and quantity of reducing sugar was 749.30 milligram per millilitre. Extracted chitosan from *M. rouxii* and commercial chitosan were compared by using FTIR analysis. The results showed that extracted chitosan from *M. rouxii* had functional groups similar to a commercial chitosan and also had some of the same functional groups e.g. C=O stretching of amide group at approximately $1400-1650\text{ cm}^{-1}$, NH stretching group at approximately $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ and OH stretching group at approximately $1080-2885\text{ cm}^{-1}$. After that effect of extracted chitosan from *M. rouxii* and commercial chitosan. The inhibition effect of *M. rouxii* chitosan on longan fungal disease was evaluated. It was found that extracted chitosan from *M. rouxii* at all concentration level provided higher effectiveness against *Colletotrichum* sp. and *Aspergillus niger* than commercial chitosan but could inhibit against *A. flavus* and *Penicillium* sp. With the same efficiency of commercial chitosan.

Keywords : Chitosan, Fungi, Biomass, Extraction, Dry Cell Weight

บทนำ

ลำไยเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของภาคเหนือ ซึ่งทำรายได้ให้แก่เกษตรกรทางภาคเหนือมากพันธุ์ลำไยที่นิยมปลูกกันมากที่สุดคือ ลำไยพันธุ์ดอ (มิตรชัย ทานุดตา, 2546) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ลำไยเป็นผลไม้ที่ประสบปัญหาโรคที่เกิดจากเชื้อรา ทำให้ลำไยไม่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน จึงส่งผลกระทบต่อคุณภาพการผลิตและการส่งออกยังต่างประเทศ (ธิดา, 2535) ที่ต้องใช้เวลานานในการขนส่ง การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่ถูกวิธีจะทำให้เกิดรอยแผลเปิดโอกาสให้เชื้อราทำลายได้ง่าย วิธีที่นิยมปฏิบัติในการถนอมลำไยในปัจจุบันคือ การรมด้วยแก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide; SO₂) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ช่วยกำจัดแมลง และมีคุณสมบัติในการฟอกสี นอกจากนี้ยังช่วยยืดอายุระหว่างการขนส่งและการจำหน่ายให้ยาวนานขึ้น แต่ปัญหาของการใช้แก๊สซัลเฟอร์ไดออกไซด์คือ ผลกระทบต่อผู้ที่สูดดม เป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ รวมทั้งมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม

ไคโตซาน (chitosan) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่เกิดจากการแยกหมู่อะซิติดออกจากไคตินธรรมชาติของเปลือกสัตว์พวกครัสเตเชียน ไคโตซานเป็นสารที่มีโครงสร้างที่มี pH น้อยกว่า 5.5 ทั้งยังสามารถควบคุมการผ่านเข้า-ออกของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ จึงมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของผลไม้ ไคโตซานเป็นสารกันเชื้อราได้ โดยไคโตซานที่ผลิตเพื่อการค้าผลิตจากไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้งและปูด้วยวิธีทางเคมี สำหรับไคโตซานที่เกิดจากวัตถุดิบเหล่านี้อาจมีปัญหาในการปนเปื้อนของ

โปรตีน ผลที่สกัดได้ต่ำหรือลักษณะทางกายภาพและเคมีของไคโตซานอาจไม่สม่ำเสมอ ทำให้ปริมาณและผลผลิตของไคโตซานไม่แน่นอน ดังนั้นจึงมีการผลิตไคโตซานจากแหล่งผลิตอื่นซึ่งสามารถควบคุมการผลิตได้ง่าย และคุณภาพของไคโตซานที่ได้มีความสม่ำเสมอ ซึ่งพบในผนังเซลล์จุลินทรีย์บางกลุ่ม เช่น ยีสต์ มีการสะสมไคตินและไคโตซานค่อนข้างสูง ดังนั้นจุลินทรีย์ดังกล่าวจึงเป็นแหล่งผลิตไคโตซานได้อย่างดี (วรพจน์ สุนทรสุข, 2549) จากการศึกษาลักษณะประกอบของผนังเซลล์ของ *Mucor rouxii* พบว่ามีไคโตซาน 33 เปอร์เซ็นต์ ไคโตซานที่สกัดได้จาก *M. rouxii* มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง $2 \times 10^5 - 1.4 \times 10^6$ ดาลตัน มีค่า degree of deacetylation สูงกว่าไคโตซานที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี (นวลพรรณ ณ ระนอง และคณะ, 2541)

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาการใช้ไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* เพื่อยับยั้งเชื้อราก่อโรคในลำไยซึ่งอาจเป็นแนวทางในการพัฒนาสารเคลือบผิวลำไยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลการผลิตไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารละลายไคโตซานที่สกัดได้จากเชื้อรา *M. rouxii* เปรียบเทียบกับไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์)
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* และไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย

ขอบเขตของการวิจัย

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตโคโคซาน คือ *M. rouxii* ATCC 24905 โดยได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตโคโคซาน คือ BG medium โดยมีแป้งข้าวเจ้าแหล่งคาร์บอน สูตรดัดแปลงจาก นวลพรรณ ณ ระนองและคณะ (2541)

3. ศึกษาผลของความเข้มข้นของโคโคซานต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไยในระดับห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เชื้อจุลินทรีย์
จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *M. rouxii* ATCC 24905 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตโคโคซาน

2. การเตรียมกลาสเปอร์เชื้อราเพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

เขียนใยรา อายุ 7 วัน ลงในอาหาร PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีส่วนประกอบด้วย Potato 200 กรัม Dextrose 20 กรัม น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 7 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ เติมน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 (0.05%) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ กรองสารละลายสปอร์ผ่านสำลีเพื่อแยกเส้นใยของราออก ตรวจนับจำนวนสปอร์โดยใช้ไมโครไฮโดมิเตอร์ ปรับความเข้มข้นสปอร์อยู่ระหว่าง $1-3 \times 10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3. ศึกษาสูตรอาหารและระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตโคโคซาน

เตรียมอาหาร BG medium ที่มีส่วนประกอบด้วย nutrient broth 8.0 กรัม yeast extract 0.1 กรัม KCl 0.1 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 กรัม น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH เท่ากับ 5 สูตรดัดแปลงจาก นวลพรรณและคณะ (2541) เติมน้ำข้าวเจ้า 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และเตรียมอาหาร (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำอาหารทั้งสองชนิดไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กลัสปอร์เชื้อราที่เตรียมไว้ลงไปในฟลาสก์ 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อหาน้ำหนักแห้งและสกัดหาปริมาณโคโคซาน ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อผลิตโคโคซาน โดยทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์ค่าพีเอช น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณโคโคซาน

4. การวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมของสารละลายโคโคซาน

พีเอช วัดค่าโดยเครื่อง pH - meter
น้ำตาลรีดิวซ์ โดยเครื่อง Brix refractometer

น้ำหนักเซลล์แห้ง นำตัวอย่างเชื้อรา มากรองเอาเซลล์ออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 น้ำใสที่ได้เก็บไว้วิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำไปอบที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

การสกัดโปรตีนจากเส้นใยรา
แยกผนังเซลล์เชื้อราให้บริสุทธิ์ นำเซลล์เชื้อรา

แช่แข็งมาทำการนึ่งฆ่าเชื้อกับ 1 N NaOH ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที น้ำหนักเปียกต่อ NaOH มีอัตราส่วน 1 : 20 ทำการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman no. 40 และล้างด้วยน้ำกลั่น

การสกัดโคโคซาน นำผนังเซลล์ที่ได้ไปสกัดโคโคซานโดยใช้กรดอะซิติก 1 N ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 48 ชั่วโมง บั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 8,000 รอบต่อนาที 30 นาที ล้างตะกอนโคโคซานด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำโคโคซานไปทำแห้งด้วยวิธี Lyophilization

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดโคโคซานในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp. ที่ก่อโรคในลำไย ทดสอบโดยวิธี culture disc technique

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วผสมสารสกัดโคโคซานจากเชื้อรา *M. rouxii* และโคโคซานมาตรฐาน (Zhengzhou Sigma Chemical., Ltd.) ลงในอาหาร PDA ให้ได้ความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเทอาหารที่ผสมสารสกัดโคโคซานลงในจานเลี้ยงเชื้อ ในส่วนของชุดควบคุมจะไม่ผสมสารสกัดโคโคซาน หลังจากผิวหน้าของอาหารที่ผสมสารสกัดและชุดเปรียบเทียบแห้งสนิท นำชิ้นวุ้นที่ได้จากการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะเส้นใยรอบโคโคโคนีเชื้อราที่มีอายุ 7 วัน วางลงบนผิวหน้าอาหารที่ผสมสารสกัดโคโคซาน นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใยมีสูตร ดังนี้

$$PIGR = \frac{(R_1 - R_2)}{R_1} \times 100$$

PIGR = เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย

R_1 = ความยาวรัศมีโคโคโคนีเชื้อสาเหตุโรคในชุดควบคุม

R_2 = ความยาวรัศมีโคโคโคนีเชื้อสาเหตุโรคชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษมสร้อยทอง, 2532)

> 75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก

61-75 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง

51-60 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง

≤ 50 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

สรุปและอภิปรายผล

1. การศึกษาการผลิตโคโคซานจากเชื้อรา *M. rouxii* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. rouxii* ในอาหาร BG medium และ PDB สูตรดัดแปลงใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งข้าวเจ้า ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน พบว่า อาหาร BG medium ที่มีแป้งข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการผลิตโคโคซานได้สูงที่สุดในวันที่ 3 มีปริมาณโคโคซาน 44.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในอาหาร PDB มีปริมาณโคโคซาน 31.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. rouxii* ในอาหาร BG medium และ PDB ที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นแตกต่างกัน

วันที่	ปริมาณโคโตซาน (mg/ml)									
	1 เปอร์เซ็นต์		2 เปอร์เซ็นต์		3 เปอร์เซ็นต์		4 เปอร์เซ็นต์		5 เปอร์เซ็นต์	
	BG	PDB	BG	PDB	BG	PDB	BG	PDB	BG	PDB
1	7.16	9.08	15.53	16.51	14.25	15.62	13.76	12.48	11.48	11.46
2	12.53	11.64	26.43	23.80	25.68	21.82	25.04	20.40	23.47	20.12
3	24.58	20.37	44.36	31.67	42.60	28.56	40.65	25.79	40.06	24.95
4	16.92	12.23	34.06	29.14	30.79	26.66	29.60	24.35	28.72	24.08
5	13.48	6.85	28.05	22.91	27.83	20.74	27.22	20.32	27.05	19.84

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. rouxii* ในอาหาร BG medium และ PDB สูตรดัดแปลง แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งข้าวเจ้าที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน พบว่า การเพาะเลี้ยง ในวันที่ 3 อาหาร BG medium ให้ผลการผลิต โคโตซานได้สูงที่สุด มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 179.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดโคโตซานที่ได้ มีค่า pH เท่ากับ 6.5 และค่าน้ำตาลรีดิวซ์ 749.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ส่วนผลการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. rouxii* ในอาหาร PDB ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 135.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณโคโตซาน 31.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดโคโตซาน ที่ได้มีค่า pH เท่ากับ 6.5 และค่าน้ำตาลรีดิวซ์ 3,978.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BG medium และอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB

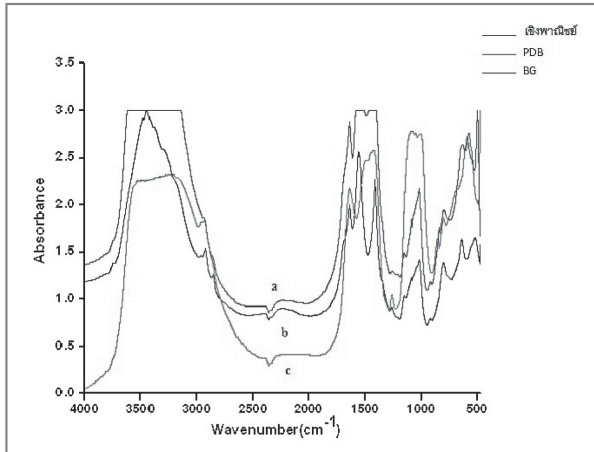
วันที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/ml)		ปริมาณโคโตซาน (mg/ml)		pH		น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	
	BG	PDB	BG	PDB	BG	PDB	BG	PDB
1	317.70	117.80	15.53	16.51	5	5	194.10	514.30
2	117.10	819.00	26.43	23.80	4	4.5	215.70	638.00
3	179.20	135.40	44.36	31.67	6.5	6.5	749.30	978.10
4	151.50	564.00	34.06	29.14	7	7.5	1,021.10	1,147.10
5	146.30	773.00	28.05	22.91	7	7	1,228.10	1,368.50

ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Hang (1990) ที่รายงานว่า *A. oryzae* ให้ผลผลิตโคโตซานสูงสุดในวันที่ 3 ของการเจริญ หลังจากนั้นปริมาณโคโตซานในเซลล์เริ่มลดลงเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญของเซลล์กับปริมาณโคโตซานที่ได้พบว่า การผลิตโคโตซานจะสูงสุดเมื่อเซลล์เจริญในระยะต้นของ stationary phase ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ McGahren (1984) ที่รายงานว่า *A. oryzae* ให้ผลผลิตโคโตซานสูงสุดเมื่อเซลล์มีการเจริญในระยะ log phase ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในระยะแรกของการเจริญ *M. rouxii* ต้องผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นจึงใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นเพื่อสร้างเซลล์ต่อไป ปริมาณโคโตซานที่สกัดได้จาก *M. rouxii* มีน้ำหนักและปริมาณที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งค่าที่ได้อาจสูงหรือต่ำกว่าที่เคยรายงานไว้ ทั้งนี้ เป็นผลเนื่องมาจากชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และวิธีการสกัดโคโตซานที่ต่างกันและเมื่อนำอาหาร BG medium และ PDB เปรียบเทียบกัน จะเห็นว่าอาหาร BG medium สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์และผลิตโคโตซานได้มากและระยะเวลาสั้นกว่าอาหาร PDB ผลการทดลองสอดคล้องกับผลการศึกษาของ นวลพรรณ และคณะ (2541) ได้รายงานว่า *M. rouxii* สามารถเจริญและให้ผลผลิตของโคโตซานระหว่าง 940–1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BG medium สูตรดัดแปลงที่มีแป้งข้าวเจ้า 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

2. การศึกษาคุณสมบัติของสารละลายโคโตซานที่สกัดได้จากเชื้อรา *M. rouxii* ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

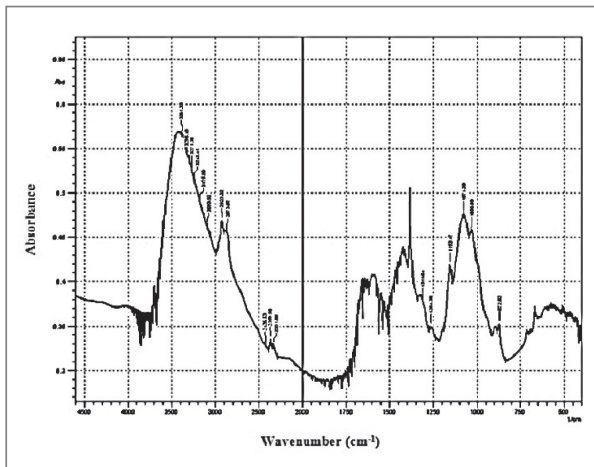
การวิเคราะห์และเปรียบเทียบสารประกอบของสารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* กับโคโตซานมาตรฐาน ด้วยเครื่อง FTIR spectrophotometer เพื่อดูความเหมือนหรือความแตกต่างระหว่างสารประกอบของโคโตซาน จากผล absorbance ของสาร พบว่า สารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ที่ได้มีหมู่ฟังก์ชันใกล้เคียงกับโคโตซานมาตรฐาน โดยมีหมู่สำคัญเหมือนกัน เช่น C=O stretching ของหมู่ amide ที่ประมาณ $1400\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ และหมู่ NH stretching ที่ประมาณ $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ และหมู่ OH stretching ที่ประมาณ $1080\text{--}2885\text{ cm}^{-1}$ ดังภาพที่ 1

เมื่อพิจารณาพื้นที่ระหว่าง C=O stretching ที่ประมาณ $1030\text{--}1070\text{ cm}^{-1}$ หมู่ amide ที่ประมาณ $1400\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ สามารถบอกถึงความเป็นโคตินและโคโตซานของสารว่ามีมากน้อยเพียงใด พบว่า พื้นที่ของหมู่ C=O stretching มีพื้นที่น้อยกว่า amide แสดงว่า สารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* มีหมู่ acetyl อยู่่น้อย จึงมีสารประกอบของโคโตซานที่สูงกว่าโคโตซานมาตรฐาน ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 1 FTIR spectrum ของโคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii*

- (a) *M. rouxii* เลี้ยงบนอาหาร BG (b) โคโตซานมาตรฐาน (เชิงพานิชย์)
(c) *M. rouxii* เลี้ยงบนอาหาร PDB



ภาพที่ 2 FT-IR spectrum ของโคโตซานจากเปลือกหอยเปลือกปู

ที่มา : World Journal of Science and Technology/www.worldjournalofscience.com/ 2013/1(4):43-48

3. การศึกษาผลของสารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* และโคโตซานมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย

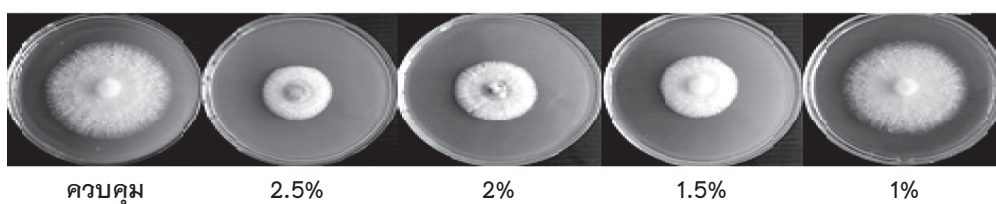
ประสิทธิภาพของโคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จากลำไย

ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จากลำไย ของสารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* และโคโตซานมาตรฐาน (เชิงพานิชย์) ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากป่นเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่า สารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ทุกระดับความเข้มข้น

มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จากลำไย ได้สูงกว่า ไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสูงกว่า ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จากลำไย

ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	ไคโตซานจากเชื้อรา <i>M. rouxii</i>		ไคโตซานเชิงพาณิชย์	
	การเจริญของเส้นใย (mm)	% การยับยั้ง	การเจริญของเส้นใย (mm)	% การยับยั้ง
1	47.39 ± 0.41	36.55	48.66 ± 0.34	14.43
1.5	43.54 ± 0.38	46.42	46.01 ± 0.22	23.52
2	39.31 ± 0.63	56.35	43.52 ± 0.37	31.58
2.5	37.44 ± 0.44	60.38	39.34 ± 0.39	44.09



ภาพที่ 3 การเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. จากลำไย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดไคโตซาน จากเชื้อรา *Mucor rouxi* ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์

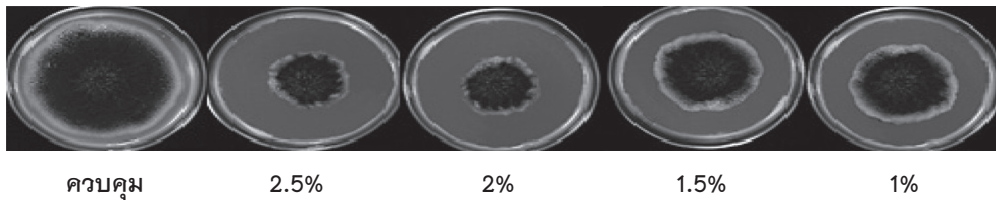
ประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* จากลำไย

ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* จากลำไย ของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* และไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มเชื้อ

เป็นเวลา 7 วัน พบว่า สารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ทุกระดับความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus niger* จากลำไย ได้สูงกว่าไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อราสูงกว่า ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพของโคโตซานต่อการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus niger* จากลำไย

ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	โคโตซานจากเชื้อรา <i>M. rouxii</i>		โคโตซานเชิงพาณิชย์	
	การเจริญของเส้นใย (mm)	% การยับยั้ง	การเจริญของเส้นใย (mm)	% การยับยั้ง
1	48.72 ± 0.21	36.01	48.31 ± 0.30	20.88
1.5	45.54 ± 0.34	44.09	46.34 ± 0.41	27.20
2	43.02 ± 0.27	50.10	43.20 ± 0.69	36.73
2.5	40.23 ± 0.45	56.37	40.70 ± 0.40	43.84



ภาพที่ 4 การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* จากลำไย บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารสกัดโคโตซาน จากเชื้อรา *Mucor rouxi* ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาลงของสารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* และโคโตซานมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่า สารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ทุกระดับความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *A. niger* จากลำไยได้สูงกว่าโคโตซานมาตรฐาน ในขณะที่สารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ทุกระดับความเข้มข้นที่ 2.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* และ *Penicillium* sp. ได้ใกล้เคียงกับโคโตซานมาตรฐาน โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดโคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* กับ

โคโตซานมาตรฐาน ในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* จากลำไย พบว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* จากลำไย เท่ากับ 48.26 เปอร์เซ็นต์ และ 50.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Penicillium* sp. จากลำไย เท่ากับ 53.49 เปอร์เซ็นต์ และ 56.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในส่วนของปฏิกิริยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *El Ghauth* (1997) ได้ทดสอบโคโตซานกับเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganense*, *E. cartovora*, *Xanthomonas campestris* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชผักเขตหนาว พบว่าคุณสมบัติของโมเลกุลโคโตซานที่มีประจุเป็นบวก และสามารถจับกับประจุลบของโมเลกุลโปรตีนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จนทำให้

ผนังเซลล์แตกหลุดออก Hu *et al.* (2007) รายงานว่าไคโตซานยังเป็นตัวตกตะกอนที่จับกับอะตอมของโลหะที่จำเป็นในเซลล์ของแบคทีเรีย จึงเป็นการไปขัดขวางการผลิตสารพิษและการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เมื่อไคโตซานแทรกซึมเข้าสู่นิวเคลียสอาจส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ จึงทำให้แบคทีเรียชะงักการเจริญเติบโต และตายในที่สุด ส่วน Reddy *et al.* (2000) กล่าวว่าไคโตซานอาจมีผลต่อการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา หรือมีผลต่อการทำลาย DNA และ RNA ของเชื้อราด้วย Bautista *et al.* (2003) รายงานว่าเมื่อเคลือบมะละกอด้วยไคโตซาน จะสามารถยับยั้งการงอกของ germ tube ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* และกระตุ้นให้มะละกอสร้างสาร phytoalexins ซึ่งเป็นสารที่มีกลไกในการป้องกันตัว

ข้อเสนอแนะ

1. ในการวิจัยครั้งนี้ใช้สารสกัดกรดอะซิติกเพียงชนิดเดียว การวิจัยครั้งต่อไปควรจะศึกษาผลของตัวทำละลายหลายชนิด
2. การศึกษาครั้งต่อไปควรพัฒนาเป็นสารเคลือบผิวและทำการทดสอบกับผลลำไยโดยตรง
3. ผลการทดสอบควรเพิ่มชุดควบคุมเปรียบเทียบว่าผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ได้มาจากการดอะซิติกหรือไคโตซานที่สกัดได้
4. ควรวิเคราะห์ขนาดโมเลกุล (MW) และความบริสุทธิ์ (%DD) ของไคโตซานจากแต่ละแหล่งที่มา

เอกสารอ้างอิง

- เกษม สร้อยทอง. การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2532.
- ธิดารัตน์ ไชยวงศ์ศรี. โรคของผลลำไยดอกก่อนและหลังเก็บเกี่ยว. หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2535.
- นวลพรรณ ธีระทอง และคณะ. การผลิตไคโตซาน *Mucor rouxii*. ภาควิชาชีวประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 2541.
- มิตรชัย ทาบุตรดา. การสำรวจพันธุ์ลำไยในภาคเหนือตอนบนและการสร้างฐานข้อมูลลำไย. หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2546.
- วรพจน์ สุนทรสุข. ไคโตซานจากจุลินทรีย์ : การผลิตคุณสมบัติการประยุกต์ใช้ (ระยะที่ 1-2). ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี, 2549.
- Bautista Banos S., M. H. Lopez, E. B. Molina, and Wilson. Effect of chitosan and plant extracts on *Collectorichum gloeosporioides* anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop protection. 22 : 1087–1092, 2003.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Wilson, C., Benhamou, N., Biochemical and cytochemical aspects of the interactions of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. Postharv. Biol. Technol. 12, 183–194, 2003.
- Hang, Y.D., Chitosan production from *Rhizopus oryzae*. Biotechnol. Lett. 12 : 911–912, 1990.
- Hu, S.G., C.H. Jou, and [et al.]. Protein absorption fibroblast activity and antibacterial properties of poly (3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) grafted with chitosan and chitooligosaccharid after immobilized with hyaluronic acid. Biomaterials. 24 (2007) : 2685–2693, 2007.
- McGahren, W.J., G.A. Perkinson, J.A. Growich, R.A. Leese and G.A. Ellestad. Chitosan by fermentation. Process Biochem. 19 : 80–90, 1984.
- Reddy Bhaskara, M., Belkacemi, K. and [et al.]. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology 20 : 39–51, 2000.