บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ลำไยเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่มีความสำคัญที่สุดของภาคเหนือ ซึ่งได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน น่าน เชียงราย แพร่ ลำปาง และพะเยา ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรภูมิภาคนี้มาก โดยเฉพาะจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งมีพื้นที่เพาะปลูกและผลผลิตมากที่สุด จากการสำรวจพันธุ์ลำไยในเขตภาคเหนือตอนบน 8 จังหวัด โดยการเลือกสุ่มสวนเกษตรกร พบว่า พันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกมากที่สุด คือ ลำไยพันธุ์ดอ (มิตรชัย ทาบุดดา, 2546) เป็นพันธุ์ที่ทางราชการส่งเสริมให้มีการปลูกกันมาก เนื่องจากเป็นพันธุ์เบาและให้ผลผลิตสูง (วรุณรักษ์ รายีนวล, 2539)

ลำไยเป็นผลไม้ที่มีรสหวาน แต่ไม่สามารถเก็บรักษาได้นาน เนื่องจากลำไยมักเกิดโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อรา ซึ่งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในลำไยที่มีการค้นพบ ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 เชื้อราสาเหตุของโรคที่แยกได้จากลำไย

ผู้วิจัย	บริเวณที่พบ	เชื้อราสาเหตุ
เสน่ห์ ชุมแสน (2530)	ผลลำไยที่เป็นโรคหลังการเก็บเกี่ยว	*Mucor, Rhizopus, Nigrospora, Alternaria, Penicilium, Aspergillus, Paecilomyces, Cephalosporium, Colletotrichum, Gloeosporium, Rhizoctonia* และ yeast
ดนัย บุญยเกียรติ (2531)	ผลลำไยที่เน่า	*Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Colletotrichum, Diplodia, Fusarium, Monilinia, Penicilium, Phomopsis, Rhizopus* และ *Sclerotinia*

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

ผู้วิจัย	บริเวณที่พบ	เชื้อราสาเหตุ
อนุมล นันทิยา (2531)	ผลลำไยที่เป็นโรค	*Fusarium, Aspergillus, Pestalotia, Alternaria, Curvularia* และ *Paecilomyces*
ธิดา ไชยวังศรี (2535)	ผลลำไยที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C	*Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Cladosporium* sp., *Fusarium* และ *Penicilium* sp.
พาวิน มะโนชัย (2543)	ผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยว	*Alternaria, Aspergillus, Cephalosporium, Cladosporium, Curvularia, Fusarium, Mucor, Nigrospora, Penicilium, Pestalotiopsis, Phomopsis, Rhizopus, Rhizoctonia* และ Yeast
Suwanakood (2007)	เปลือกและขั้วของผลลำไย	*Aspergillus, Cladosporium, Colletotrichum, Fusarium, Lasiodiplodia, Mucor, Penicilium, Pestalotiopsis, Phomopsis, Rhizopus, Trichoderma* และ *Verticillium*

จากการแยกเชื้อราในดอกและผลลำไยที่แสดงอาการผิดปกติก่อนการเก็บเกี่ยว และผลลำไยที่เป็นโรคผลเน่าหลังการเก็บเกี่ยว มีรายงานว่าพบเชื้อราในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเชื้อราที่พบบนดอกและผลลำไยนี้ อาจเป็นเชื้อที่ติดมาในช่วงที่ดอกบาน ทั้งนี้เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคก่อนการเก็บเกี่ยวน่าจะมีอิทธิพลต่อการเกิดโรคบนผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยวด้วย จึงส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลผลิตและการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ (ธิดา ไชยวังศรี, 2535)

สำหรับการผลิตและส่งออกลำไยในลักษณะของผลไม้สดไปยังต่างประเทศนั้นต้องใช้เวลาในการขนส่งนาน ส่งผลต่อคุณภาพของลำไย การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่ถูกวิธีจะทำให้เกิดรอยแผล เป็นการเปิดโอกาสให้เชื้อราเข้าทำลายได้ง่ายขึ้น มีการพยายามปรับปรุงและพัฒนาวิธีการบรรจุหีบห่อลำไยเพื่อการส่งออก แต่ก็ยังพบว่ามีปัญหาเรื่องโรคที่เกิดจากเชื้อรา ทำความเสียหายกับผลลำไยก่อนถึงมือผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีการใช้สารถนอมอาหารเพื่อช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา วิธีที่นิยมปฏิบัติในการถนอมลำไยสดในปัจจุบันคือการรมด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Sulfur dioxide ; SO_2) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ช่วยกำจัดแมลง และมีคุณสมบัติในการฟอกสี นอกจากนี้ยังช่วยยืดอายุในระหว่างการขนส่งและการจำหน่ายให้ยาวนานขึ้น แต่ปัญหาใหญ่ของการใช้ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์คือ ผลกระทบต่อผู้ที่สูดดมเข้าไป ซึ่งก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของกรด ทำให้เป็นอันตรายต่อระบบการหายใจ รวมทั้งมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม

ไคโตซาน (chitosan) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่เกิดจากการแยกหมู่อะซิติลออกจากไคตินธรรมชาติของเปลือกสัตว์พวกครัสเตเชียน ไคโตซานเป็นสารที่มีโครงสร้าง pH น้อยกว่า 5.5 ทั้งยังสามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ จึงมีผลต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของผลไม้ (Coleman and Manson, 1988) นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซานมีคุณสมบัติเป็นสารกันเชื้อราได้อีกด้วย โดยไคโตซานที่ผลิตเพื่อการค้าส่วนมากผลิตจากไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้งและปูด้วยวิธีทางเคมี โดยการแยกหมู่อะเซ็ททิลออกจากไคติน ด้วยการต้มกับสารละลายด่างเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เรียกวิธีนี้ว่า Deacetylation (Austin *et al*., 1981) สำหรับไคโตซานที่ได้จากวัตถุดิบเหล่านี้อาจมีปัญหาในการปนเปื้อนของโปรตีน หรือมีผลที่ได้จากการสกัด (yield) ต่ำหรือลักษณะทางกายภาพและเคมีของไคโตซานอาจไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้ปริมาณวัตถุดิบ (เปลือกกุ้งและปู) อาจเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล ทำให้ปริมาณและผลผลิตของไคโตซานไม่แน่นอน ดังนั้นจึงควรมีการผลิตไคโตซานจากแหล่งผลิตอื่นซึ่งสามารถควบคุมการผลิตได้ง่ายกว่า และคุณภาพของไคโตซานที่ผลิตได้มีความสม่ำเสมอ ซึ่งพบว่าผนังเซลล์จุลินทรีย์บางกลุ่มเช่น ยีสต์และเชื้อรามีการสะสมไคติน และไคโตซานค่อนข้างสูง ดังนั้นจุลินทรีย์ดังกล่าวน่าจะเป็นแหล่งผลิตไคโตซานได้อย่างดี (วรพจน์ สุนทรสุข, 2549)

ในธรรมชาติจะพบไคโตซานเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของราพวก Zygomycetes วงศ์ *Mucoraceae* ตัวอย่างเช่น *Absidia* spp., *Mucor* spp., *Phycomyces* spp. และ *Rhizopus* spp. (Shimahara *et al*., 1989) จากการศึกษาส่วนประกอบของผนังเซลล์ของ *Mucor rouxii* พบว่ามีไคโตซานอยู่ 33 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าไคโตซานที่สกัดได้จาก *M. rouxii* มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่

ระหว่าง 2×10^5 - 1.4×10^6 ดาลตัน มีค่า degree of deacetylation สูงกว่าไคโตซานที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมี (นวลพรรณ ณ ระนอง และคณะ, 2541)

ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้จึงศึกษาการใช้ไคโตซานจากเชื้อ *Mucor rouxii* เพื่อยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย ซึ่งอาจใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสารเคลือบผิวลำไยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. การผลิตไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน
2. การขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Mucor rouxii* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
3. ผลของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* และไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคโตซานที่ได้จากเชื้อรา *Mucor rouxii*
2. ทราบถึงประสิทธิภาพของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อ *Mucor rouxii* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย
3. ได้แนวทางการใช้ไคโตซานจากเชื้อรา เพื่อพัฒนาเป็นสารเคลือบผิวต่อไป

สมมติฐาน

สารกัดไคโตซานที่ผลิตจากเชื้อรา *Mucor rouxii* มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย

ขอบเขตของการวิจัย

ตัวแปร

ตัวแปรต้น ประสิทธิภาพของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ตัวแปรตาม	ผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย
ตัวแปรควบคุม	วิธีการสกัดไคโตซานจากเชื้อรา ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา เช่น ระยะเวลา อุณหภูมิ วิธีการทดลอง เป็นต้น

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* จากนั้นนำสารสกัดไคโตซานที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อศึกษาคุณสมบัติสารละลายไคโตซาน และทำการศึกษาผลของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อราและไคโตซานเชิงพาณิชย์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย

ข้อตกลงเบื้องต้น

1. ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Mucor rouxii* ไอโซเลท ATCC 24905 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตไคโตซาน จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
2. อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไคโตซาน คือ BG medium ซึ่งได้เติมแหล่งคาร์บอนลงไปคือแป้งข้าวเจ้า สูตรดัดแปลงจาก นวลพรรณ ณ ระนองและคณะ (2541)
3. การสกัดไคโตซานใช้วิธีการสกัดด้วยกรดแอซิติกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์
4. การทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ทดสอบโดยวิธี poisoned food technique
5. ศึกษาผลของความเข้มข้นของไคโตซานในระดับห้องปฏิบัติการ
6. สารสกัดไม่เจือจาง หมายถึง สารสกัดที่ได้จากการเตรียมครั้งแรก
7. สารมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวควบคุม คือ สารไคโตซานเชิงพาณิชย์

นิยามศัพท์เฉพาะ

สารละลายไคโตซาน หมายถึง สารละลายที่มีความเหนียว ใส ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Mucor rouxii* และเมื่อวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง FTIR analysis จะแสดงให้เห็นแถบที่ 3000-3500 cm^{-1} (NH bond) และ 1400-1650 cm^{-1} (C=O bond)

FT-IR spectrometer หมายถึง Fourier Transform Infrared เป็นหนึ่งในเทคนิคทางด้าน Infrared Spectroscopic ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกประเภทของสารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ และพันธะเคมีในโมเลกุล รวมถึงสามารถบอกองค์ประกอบที่มีอยู่ในโมเลกุลของสารผสมตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด