บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. การศึกษาการผลิตไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. rouxii* ในอาหาร BG medium และ PDB สูตรดัดแปลงแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งข้าวเจ้า ที่มีความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน พบว่า อาหาร BG medium ที่มีแป้งข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการผลิตไคโตซานได้สูงที่สุดในวันที่ 3 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 179.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณไคโตซาน 44.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดไคโตซานที่ได้มีค่า pH เท่ากับ 6.5 และค่าน้ำตาลรีดิวซ์ 749.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนผลการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. rouxii* ในอาหาร PDB ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 135.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณไคโตซาน 31.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดไคโตซานที่ได้มีค่า pH เท่ากับ 6.5 และค่าน้ำตาลรีดิวซ์ 3,978.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. การศึกษาการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Mucor rouxii* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. rouxii* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 2 ลิตร เพื่อขยายขนาดเซลล์ในการเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที พบว่า อาหาร BG medium ให้ผลการผลิตไคโตซานได้สูงที่สุดในวันที่ 3 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 286.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณไคโตซาน 137.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดไคโตซานที่ได้มีค่า pH เท่ากับ 6 และค่าน้ำตาลรีดิวซ์ 14,480.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M. rouxii* ในอาหาร PDB ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 743.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณไคโตซาน 106.69 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดไคโตซานที่ได้มีค่า pH เท่ากับ 6.5 และค่าน้ำตาลรีดิวซ์ 12,676.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. การศึกษาคุณสมบัติของสารละลายไคโตซานที่สกัดได้จากเชื้อรา *Mucor rouxii* ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

การวิเคราะห์และเปรียบเทียบสารประกอบของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* กับไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ด้วยเครื่อง FTIR analysis เพื่อดูความเหมือนหรือความแตกต่างระหว่างสารประกอบของไคโตซาน จากผล absorbance ของสาร พบว่า สารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ที่ได้มี functional group ใกล้เคียงกับไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) โดยมีหมู่สำคัญเหมือนกัน เช่น C=O stretching ของหมู่ amide ที่ประมาณ 1400-1650 cm^{-1} และหมู่ NH stretching ที่ประมาณ 3000-3500 cm^{-1} และหมู่ OH stretching ที่ประมาณ 1080-2885 cm^{-1}

เมื่อพิจารณาพื้นที่ระหว่าง C=O stretching ที่ประมาณ 1030-1070 cm^{-1} หมู่ amide ที่ประมาณ 1400-1650 cm^{-1} สามารถบอกถึงความเป็นไคตินและไคโตซานของสารว่ามีมากน้อยเพียงใด พบว่าพื้นที่ของหมู่ C=O stretching มีพื้นที่น้อยกว่า amide แสดงว่าสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* มีหมู่ acetyl อยู่น้อย จึงมีสารประกอบของไคโตซาน ที่สูงกว่าไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์)

4. การศึกษาผลของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* และไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ที่ระดับความเข้มข้นต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย

การศึกษาผลของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* และไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งเชื้อราที่ก่อโรคในลำไย หลังจากบ่มเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่า สารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ทุกระดับความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Colletotrichum* sp. และ *Aspergillus niger* จากลำไยได้สูงกว่าไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ในขณะที่สารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ทุกระดับความเข้มข้น มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Penicillium* sp. จากลำไย ได้ต่ำกว่าไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์)

อย่างไรก็ตามสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* ที่ระดับความเข้มข้นที่ 2.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Penicillium* sp. ได้ใกล้เคียงกับไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดไคโตซานจากเชื้อรา *M. rouxii* กับไคโตซานมาตรฐาน (เชิงพาณิชย์) ในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากลำไย พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากลำไย เท่ากับ 48.26 เปอร์เซ็นต์ และ 50.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Penicillium* sp จากลำไย เท่ากับ 53.49 เปอร์เซ็นต์ และ 56.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อภิปรายผล

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Mucor rouxii* ในอาหาร BG medium และ PDB สูตรดัดแปลงแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งข้าวเจ้า ที่มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลอง จะเห็นว่าอาหาร BG medium ที่มีแป้งข้าวเจ้าที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณไคโตซานสูงสุด 137.73 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับรายงานของ Hang (1990) ที่ได้เพาะเลี้ยง *Rhizopus oryzae* ในอาหารเหลวที่เติมแป้งข้าวเจ้า พบว่าอาหารเหลวที่เติมแป้งข้าวเจ้าให้ปริมาณไคโตซานสูงสุดถึง 700 มิลลิกรัมต่อลิตร และผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณไคโตซานที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Hang (1990) รายงานว่า *Rhizopus oryzae* ให้ผลผลิตไคโตซานสูงสุดในวันที่ 3 ของการเจริญ หลังจากนั้นปริมาณไคโตซานในเซลล์เริ่มลดลง เมื่อเปรียบเทียบระยะการเจริญของเซลล์กับปริมาณไคโตซานที่ได้พบว่า การผลิตไคโตซานจะสูงสุดเมื่อเซลล์เจริญในระยะต้นของ stationry phase ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ McGahren *et al.* (1984) รายงานว่า *Aspergillus coerulea* ให้ผลผลิตไคโตซานสูงสุดเมื่อเซลล์มีการเจริญในระยะ log phase ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากในระยะแรกของการเจริญ *Mucor rouxii* ต้องผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นจึงใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นเพื่อสร้างเซลล์ต่อไป นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์อีกด้วย และปริมาณไคโตซานที่สกัดได้จาก *Mucor rouxiii* ได้สูงกว่าที่ White *et al.* (1979) และ Arcidiacono *et al.* (1922) เคยรายงานไว้ นอกจากนี้นวลพรรณ ณ ระนอง และคณะ (2541) ศึกษาการผลิตไคโตซานจาก *Mucor rouxii* โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BG สูตรดัดแปลงโดยใช้แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเหนียว แป้งสาลี และแป้งข้าวเจ้า เป็นแหล่งคาร์บอนในฟลาสก์บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าอาหารเหลวที่เติมแป้งข้าวเจ้า 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณไคโตซานสูงสุด ในวันที่ 3 คือ 940 มิลลิกรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง 7.32 กรัมต่อลิตร

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราไคโตซานสามารถยับยั้งได้โดยผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ สุดคนึง พึ่มชัย (2546) ได้ทำการทดสอบไคโตซานต่อการเจริญเติบโตทางเส้นใยและการงอกของสปอร์เชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทางเส้นใยและการสร้างสปอร์ได้สูงสุด และปิยะวรรณ ขวัญมงคล (2551) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของไคโตซานพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. โดยเพาะเชื้อบน potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารละลายไคโตซานให้มีความเข้มข้น 0.05, 0.25, 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ไคโตซานพอลิเมอร์ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์

สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วน พรพิมล สีดำ (2549) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารไคติน-ไคโตซานกับเชื้อรา พบว่าสารไคติน-ไคโตซานที่ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิดคือ *Colletotrichum gloeosporoides* PenZ., *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp., *Sclerotium rolfsii* Sacc. และ *Ustilago scitaminea* Syd. ได้ 31.33, 69.89, 69.78 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Wongkaew and Pisawongprakan (2004) ได้ทดสอบไคโตซานกับเชื้อแบคทีเรีย *Clavibacter michiganese, E. cartovora, Xanthomonas campestris* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืชผักเขตหนาว ในส่วนของปฏิกิริยาที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ อาจเป็นเพราะคุณสมบัติของโมเลกุลไคโตซานที่มีประจุเป็นบวก และสามารถจับกับประจุลบของโมเลกุลโปรตีนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย จนทำให้ผนังเซลล์แตกหลุดออก Hu *et al.* (2003) รายงานว่าไคโตซานยังเป็นตัวตกตะกอนที่จับกับอะตอมของโลหะที่จำเป็นในเซลล์ของแบคทีเรีย จึงเป็นการไปขัดขวางการผลิตสารพิษ และการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เมื่อไคโตซานแทรกซึมเข้าสู่นิวเคลียสอาจส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ จึงทำให้แบคทีเรียชะงักการเจริญเติบโต และตายในที่สุด Reddy *et al.* (2000) กล่าวว่าไคโตซานอาจมีผลต่อการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราหรือมีผลต่อไปในการทำลาย DNA และ RNA ของเชื้อราด้วย Bautista *et al.* (2003) รายงานว่าเมื่อเคลือบมะละกอด้วยไคโตซาน จะสามารถยับยั้งการงอกของ grem tube ของเชื้อรา *C. gloeosporiodes* และกระตุ้นให้มะละกอสร้างกลไกการป้องกันตัว เช่น ชักนำให้สร้างสาร phytoalexins

ข้อเสนอแนะ

1. ในการวิจัยครั้งนี้ใช้สารสกัดชนิดเดียว การวิจัยครั้งต้องไปควรจะศึกษาผลของตัวทำละลายหลายชนิด

2. การศึกษาครั้งต่อไปควรพัฒนาเป็นสารเคลือบผิวและทำการทดสอบกับผลลำไยโดยตรง

3. ผลการทดสอบควรเพิ่มชุดควบคุม มาเปรียบเทียบว่าผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ได้มาจากกรดอะซิติกหรือไคโตซานที่สกัดได้