

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานโครงการวิจัย
งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2546

การใช้เซลล์เชื้อรา *Monascus* sp. เป็นแหล่งวัตถุดิบ
สำหรับผลิตไคตินและไคโตซาน

Utilization of *Monascus* sp. cell as a raw material
for chitin and chitosan production

RCH
TP
2A8-65
C55

เลขานุ.....
เลขทะเบียน..... 73026
วัน,เดือน,ปี 27 ส.ย. 2550

ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11767480

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารร่วน MYS และ PDA ขณะที่ให้การเจริญลดลงเล็กน้อยในอาหารร่วน SS และ GYP และเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารเหลว MYS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้เซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 6 (6.8 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อเจริญในอาหารเหลว SS ให้การผลิตเส้นใยสูงถึง 11.23 กรัมต่อลิตร การเพิ่มความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังทำให้อาหารเหลวมีความหนืดสูงขึ้น จึงจำเป็นต้องย่อยแป้งมันสำปะหลังก่อนจากนั้นจึงนำไปเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเพิ่มเป็น 50 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อราเจริญเพิ่มเป็น 22.74 กรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 20 ลิตร ซึ่งให้ปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์แห้ง 27.8 กรัมต่อลิตร โครงสร้างเส้นใยเชื้อราเมื่ออายุน้อยจะมีองค์ประกอบไคโตซานน้อยกว่าเส้นใยอายุมาก เส้นใยเชื้อราย่อยสลายด้วยกรดฟอสฟอริกได้ง่ายกว่าเปลือกกุ้ง โดยย่อยสลายที่อุณหภูมิสูงขึ้น (จาก 40 เป็น 80 องศาเซลเซียส) และนานขึ้น (2 - 8 ชั่วโมง) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ไคติน โอลิโกเมอร์สายสั้นลง ส่วนการย่อยสลายเส้นใยเชื้อราด้วยเอนไซม์ไคตินเอสในระยะเวลาแรก ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น G3 และ G1 เล็กน้อย (2 วัน) แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปพบว่า G3 มีปริมาณลดลง และ G1 เพิ่มขึ้น ขณะที่ปริมาณ G2 คงที่ไปจนกระทั่งสิ้นสุดการย่อยสลาย การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคติน โอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อราต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส พบว่าความเข้มข้นและระยะเวลาการได้รับสารมีผลต่อการรอดชีวิต การงอกราก และความยาวราก เมื่อกล้วยไม้ได้รับผลิตภัณฑ์ไคติน โอลิโกเมอร์ A2 ที่ระดับความเจือจาง 1000 เท่า เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้ผลการรอดชีวิต และเจริญเติบโตดีที่สุด

ABSTRACT

The *Monascus* sp.KB20M1 indicated the higher growth rate in MYS and PDA agar than SS and GYP agar, in the same culture condition. Moreover, the cultivation in MYS broth gave the maximal cell mass at day-6 (6.8 g/l) on 250 rpm of shaking speed at 30°C. When using SS medium as a culture medium, the mycelium cell mass was increased to 11.23 g/l. The higher starch concentration added to the cultivation medium, the higher viscosity observation. Then, the partial digestion of cassava starch by enzymatic method was necessary. When using the partial digested cassava starch as a carbon source, the cell mass of *Monascus* sp.KB20M1 was increased to 22.74 g/l at cassava starch concentration of 50 g/l. The cultivation was also observed in 20-L fermenter which gave the maximum cell mass at 27.8 g/l. The mycelium structure of younger *Moanscus* sp.KB20M1 showed the lower level of chitosan than the elder one. The *Monascus* mycelium was more sensitive to the phosphoric acid digestion than the shrimp shell. The higher temperature and longer time-consuming presented the higher small molecules of chitooligomers concentration. However, the enzymatic digestion of *Monascus* mycelium by chitinase was conducted. It was indicated that the high amount of G3 and low G1 was observed at the early digestion period. Finally, the portion of G3 was reduced and G1 was maximized at the end of digestion period. However, the amount of G2 was found constantly through out the enzymatic digestion process. The bioactive activity of chitooligomers on *Phaleanopsis* was performed. It was found that the immersion of *Phaleanopsis* in the A2 chitooligomers product (at dilution of 1000- time for 3 hr.) showed the maximal vital and growth rate.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยการใช้เซลล์เชื้อรา *Monascus* sp. เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตโคตินและโคโตซานนี้ ดำเนินงานไปได้ด้วยดีโดยได้รับความสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2546 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ นอกจากนี้ยังขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. บุษบา ยงสมิทธิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ต่างๆ สำหรับการทดลองในโครงการนี้ และขอขอบคุณคณาจารย์ นักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการในการให้ความสะดวกในการทำวิจัย ในทุกๆ ด้านจนโครงการวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน.....	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....	4
2.1 ไคตินไคโตซาน	4
2.2 แหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตไคตินไคโตซาน	8
2.3 การผลิตไคตินไคโตซาน.....	10
2.4 คุณสมบัติทางชีวภาพของไคตินไคโตซาน โอลิโกเมอร์.....	15
2.5 เชื้อราโมแนสคัส	15
2.6 การเจริญและการสร้างเส้นใยเชื้อรา (mycelium formation and extension)	16
2.7 การย่อยสลายไคตินไคโตซาน ไคติเนส	18
2.8 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินไคโตซาน โอลิโกเมอร์ต่อพืช	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	22
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	22
3.2 พันธุ์กล้วยไม้.....	22
3.3 เอนไซม์ไคติเนส	22
3.4 อุปกรณ์.....	22
3.5 สารเคมี.....	23
3.6 วิธีการทดลอง	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	28
4.1 การเจริญของเชื้อรา <i>Monascus</i> sp. KB20M1 บนอาหารวุ้น MYS และ SS.....	28
4.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว MYS medium	29
4.3 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในอาหารเหลว SS medium	30
4.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสในถังหมักขนาด 20 ลิตร	31
4.5 การวิเคราะห์โครงสร้างโคตินโคโดซานในเส้นใยเชื้อรา.....	32
4.6 ศึกษาการผลิตโคติน โอลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์.....	34
4.7 ศึกษาการผลิตโคติน โอลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์โคติเนส.....	36
4.8 ศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโคติน โอลิโกเมอร์ต่อการเจริญในกล้วยไม้สกุลฟาแลนดอปซิส.....	39
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	47
5.1 สรุปผลการทดลอง	47
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	50
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก ก.....	59
ภาคผนวก ข.....	62

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1	ปริมาณโคตินสัมพัทธ์ในผนังเซลล์ของเชื้อบางชนิดในระยะต่างๆ	9
ตารางที่ 4.1	แสดงการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ KB20M1 บนอาหารวุ้น MYS SS PDA และ GYP	28
ตารางที่ 4.2	แสดงผลความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อปริมาณน้ำหนักเซลล์ที่ได้.....	31
ตารางที่ 4.3	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนออฟซิส เมื่อนำไปแช่ สารละลาย A1 A2 และ A3 ที่ระดับความเจือจาง 0-1000 เท่า เป็น เวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์.....	41
ตารางที่ 4.4	เปอร์เซ็นต์การเกิดรากใหม่ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนออฟซิส เมื่อนำไปแช่ สารละลาย A1 A2 และ A3 ที่ระดับความเจือจาง 0-1000 เท่า เป็น เวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์.....	42
ตารางที่ 4.5	ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนออฟซิส เมื่อนำไปแช่ สารละลาย A1 A2 และ A3 ที่ระดับความเจือจาง 0-1000 เท่า เป็น เวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์.....	42
ตารางที่ 4.6	เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนออฟซิส ที่มี เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปแช่ สารละลาย A1 A2 และ A3 ที่ระดับความเจือจาง 0-1000 เท่า เป็น เวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์.....	45

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	โครงสร้างของไคตินเปรียบเทียบกับเซลลูโลส.....	5
รูปที่ 2.2	การเรียงตัวของสายพอลิเมอร์ไคติน	6
รูปที่ 2.3	แสดงการย่อยสลายไคติน ณ ตำแหน่งหมู่อะซิทิล โดยสารละลายต่างเข้มข้น หรือ เอนไซม์ (ก) และ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย (ข).....	7
รูปที่ 2.4	แบบจำลองสายโซ่ไคโตซานแสดงพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intramolecular hydrogen bonding) และระหว่างโมเลกุล (intermolecular hydrogen bonding).....	8
รูปที่ 2.5	การผลิตไคตินและไคโตซานจากกระดองปู	13
รูปที่ 2.6	แสดงเมแทบอลิซึมของการสร้างและย่อยสลายไคตินในผนังเซลล์เชื้อรา	17
รูปที่ 2.7	แบบจำลองการเกิดปฏิกิริยาการสลายเฮกซะแซ็กคาไรด์ (hexasaccharide) ด้วยเอนไซม์ไคติเนส	19
รูปที่ 4.1	การเจริญของเชื้อรา <i>Monascus</i> sp.KB20M10 และปริมาณแป้ง ในอาหารเหลว MYS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	29
รูปที่ 4.2	แสดงผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังต่อการเจริญ.....	30
รูปที่ 4.3	การเจริญของเชื้อ <i>Monascus</i> sp.KB20M1 ในอาหารเหลว SS ด้วยถังหมักขนาด 20 ลิตร.....	32
รูปที่ 4.4	ผลการวิเคราะห์โครงสร้างไคตินไคโตซานในเส้นใยเชื้อราด้วย เครื่อง FT-IR.....	33
รูปที่ 4.5	แสดงคุณสมบัติของเส้นใยเชื้อ <i>Monascus</i> sp.KB20M1 ที่เวลาต่างๆ	34
รูปที่ 4.6	ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากเปลือกกุ้ง ซึ่งย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์.....	35
รูปที่ 4.7	ปริมาณไคติน โอลิโกเมอร์จากกรวยย่อยเส้นใยเชื้อรา <i>Monascus</i> sp.KB20M1 ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์	36
รูปที่ 4.8	ปริมาณไคติน โอลิโกเมอร์จากเปลือกกุ้งซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์ไคติเนส	37
รูปที่ 4.9	ปริมาณไคติน โอลิโกเมอร์จาก <i>Monascus</i> sp.KB20M1 ซึ่งย่อยด้วย เอนไซม์ไคติเนส	38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีความสามารถในการผลิต และส่งออก จนได้ชื่อว่าเป็นครัวของโลก ดังนั้นการพัฒนากระบวนการผลิตและการเพิ่มผลิตผลทางการเกษตรจึงเป็นสิ่งที่ควรได้รับความสนใจศึกษาและวิจัย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ของการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อทดแทนการใช้สารเคมี (ยาปฏิชีวนะ ปุ๋ยเคมี สารเคมีกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรคและแมลงศัตรู สารเคมีเร่งการเจริญ ฯลฯ) ที่ส่งผลเสียต่อสภาพแวดล้อม การค้าของจุลินทรีย์ก่อโรค และแมลงศัตรู และอาจมีการตกค้างของสารเคมีไปสู่ผู้บริโภค สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกำลังเป็นที่สนใจเพื่อใช้ทดแทนสารเคมี และทดแทนการนำเข้า อีกทั้งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีผลในวงแคบและจำเพาะเจาะจง จึงมีประสิทธิภาพสูงแม้ใช้ในปริมาณเล็กน้อย ซึ่งโคตินและโคโตซานจัดเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ยอมรับในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ การเกษตร การเพาะเลี้ยง และอนุบาลสัตว์เศรษฐกิจ อาหารและยา เครื่องสำอาง บำบัดน้ำเสีย เป็นต้น การใช้ประโยชน์โคตินและโคโตซานอย่างแพร่หลายเนื่องจากไม่มีความเป็นพิษ (non toxic) เข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) และย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) โดยทั่วไปแล้วโคโตซานมีการนำไปใช้ประโยชน์มากกว่าโคตินเนื่องจากคุณสมบัติการละลายน้ำได้ดีกว่า ดังนั้นโคโตซานจึงได้รับความสนใจเพื่อศึกษาคุณสมบัติในแง่ต่างๆ ต่อการนำไปใช้ประโยชน์ โดยบางรายงานการวิจัยพบว่าคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโคโตซานเป็นผลมาจากความยาวของโมเลกุล โดยเฉพาะความยาวในระดับหน่วยย่อย 1-50 โมเลกุล (oligomer)

ความแพร่หลายของการใช้โคตินโคโตซานในอุตสาหกรรมต่างๆ ทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ ซึ่งเป็นผลมาจากวัตถุดิบของการผลิตโคตินโคโตซานมาจากเปลือกกุ้ง-ปู แม้ว่าประเทศไทยสามารถส่งออกสินค้าประเภท กุ้ง ในปี 2546 มีปริมาณถึงกว่า 234,000 ตัน คิดเป็นมูลค่าเกือบ 72,000 ล้านบาท (<http://www.fisheries.go.th/foreign/average42-46/exportshrimp.xls>) (และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี) แต่ว่าเปลือกกุ้งซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกุ้ง ที่ใช้เพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตโคตินโคโตซานนั้นกลับไม่เพียงพอต่อความต้องการ เนื่องจากฤดูกาลเพาะเลี้ยงกุ้ง (วงชีวิตของกุ้ง) และพื้นที่ประกอบการเพาะเลี้ยง เพื่อแก้ปัญหาดังนั้นจึงได้มีการวิจัยหาแหล่งวัตถุดิบทดแทนสำหรับการผลิตโคตินโคโตซาน จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ได้แก่ แมลงเปลือกแข็ง และจุลินทรีย์ในกลุ่ม ยีสต์ และรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการวิจัยนี้เป็นการใช้ประโยชน์จากเส้นใยเชื้อราโมแนสคัส ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตสัฟฟอนอาหาร โดยศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้เส้นใยเชื้อราเพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตไคตินโคโตซาน สำหรับทดแทนการใช้เปลือกกุ้งเป็นวัตถุดิบ และนำไคตินโคโตซานที่ได้จากเส้นใยเชื้อรามาศึกษาวิธีการย่อยสลายเพื่อผลิตไคตินสายสั้นในรูปของไคตินโมเลกุลต่ำ (chitooligomers) ที่มีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาการผลิตเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp. ที่สภาวะเหมาะสมโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร จากนั้นนำเส้นใยเชื้อรามาศึกษากระบวนการสกัดไคตินโคโตซานเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไคตินสายสั้นๆ จากนั้นจึงนำไปศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งทางชีวภาพต่อพืช และเชื้อราก่อโรคบางสายพันธุ์ต่อไป

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการใช้ประโยชน์จากเส้นใยเชื้อราโมแนสคัส ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ และไม่ก่อให้เกิดสารภูมิแพ้ ได้แก่ *Monascus* sp. KB20M1 โดยนำมาเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเส้นใยในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร เมื่อศึกษาได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใย จึงนำเส้นใยเหล่านั้นไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับกระบวนการสกัดไคตินโคโตซาน ไคตินที่แยกได้จากเส้นใยจะนำไปศึกษาการย่อยสลายด้วยกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ไคตินโอลิโกเมอร์ต่อไป และท้ายที่สุดจึงนำมาศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อกล้วยไม้

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

- 1.4.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. 20M1 ในฟลาสก์ และถังหมัก
- 1.4.2 ศึกษาสัญญาณวิทยาของเชื้อรา *Monascus* sp. 20M1 ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์รูปภาพ
- 1.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณไคตินโคโตซานในเส้นใยเชื้อราด้วยเครื่อง FTIR
- 1.4.4 การสกัดแยกไคตินโคโตซานจากเส้นใยเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.4.5 การย่อยสลายไคตินเพื่อผลิตไคติน โอลิโกเมอร์ด้วยกระบวนการทางเคมี และกระบวนการทางชีวภาพ
- 1.4.6 นำไคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลาย มาศึกษาคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการเจริญของกล้วยไม้

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แหล่งวัตถุดิบทดแทนการใช้เปลือกกุ้งสำหรับการผลิตไคติน โอลิโกเมอร์ ซึ่งมีผล การออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการเจริญของกล้วยไม้ และยับยั้งเชื้อราก่อโรค



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

แนวโน้มการใช้ประโยชน์จากไคติน (chitin) และไคโตซาน (chitosan) ได้รับความนิยมมากขึ้นทั้งภายในประเทศ และต่างประเทศ เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ การเกษตร การเพาะเลี้ยงและอนุบาลสัตว์เศรษฐกิจ อาหารและยา เครื่องสำอาง บำบัดน้ำเสีย เป็นต้น การใช้ประโยชน์ไคตินและไคโตซานอย่างแพร่หลายเนื่องจากไม่มีความเป็นพิษ (non toxic) เข้ากันได้ทางชีวภาพ (biocompatible) และย่อยสลายโดยกระบวนการทางชีวภาพ (biodegradable) โดยทั่วไปแล้วไคโตซานมีการนำไปใช้ประโยชน์มากกว่าไคตินเนื่องจากคุณสมบัติการละลายน้ำได้ดีกว่า ซึ่งคุณสมบัติของไคโตซานละลายน้ำเริ่มได้รับความสนใจศึกษารายละเอียดเพิ่มมากขึ้น โดยบางการวิจัยพบว่าคุณสมบัติทางชีวภาพของไคโตซานเป็นผลมาจากความยาวของโมเลกุลสายสั้นๆ ในระดับ oligomer ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ กระตุ้นให้พืชสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenesis-related (PR) protein) (Selitrennikoff, 2001) ควบคุมการออกฤทธิ์ของยา (drug releasing) โดยใช้ร่วมในการผลิตยาแบบ nano-encapsulation (Yang และคณะ, 2000) กระตุ้นการซ่อมแซมผิวหนังที่เกิดบาดแผล (Biagini และคณะ, 1991)

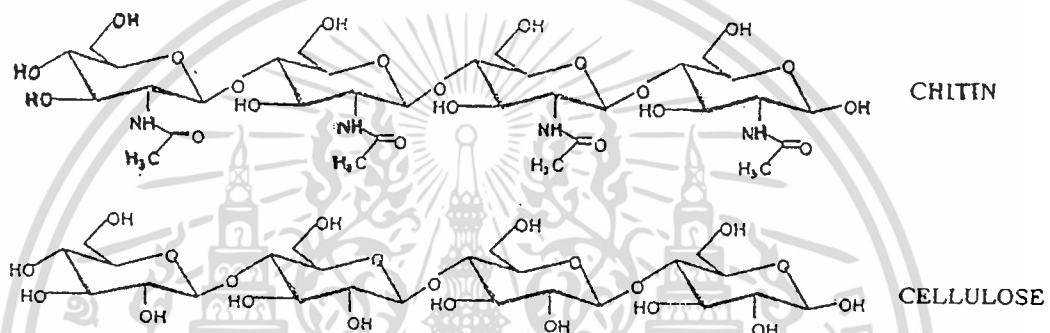
2.1 ไคตินไคโตซาน

ไคติน มีชื่อทางเคมีว่า poly- β (1,4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose และมีสูตรทั่วไปคือ $(\text{CH}_2 \text{ H}_3 \text{ N O}_5)_n$ โครงสร้างเป็นแบบพอลิแซคคาไรด์มีสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรต แสดงในรูปที่ 2.1 ไคตินพบในธรรมชาติโดยมีปริมาณมากเป็นที่สองรองจากเซลลูโลส ซึ่งสารประกอบไคตินพบมากในเปลือกและโครงสร้างแข็งที่ห่อหุ้มร่างกายของสัตว์จำพวก กุ้ง ปู แมลง และยังพบในส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเห็ดรา และ ยีสต์ ซึ่งมีหน้าที่ปกป้องและให้ความแข็งแรง (รัฐ, 2544; Chatterjee และคณะ, 2005; Win และ Stevens. 2001)

ไคตินมีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในพืช เพียงแต่หน่วยย่อยที่มาประกอบขึ้นเป็นไคตินนั้นต่างออกไปจากหน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นเป็นเซลลูโลส หน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นมาเป็นเซลลูโลส คือ น้ำตาลกลูโคส (glucose) ส่วนหน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นเป็นไคติน คือ น้ำตาลเอ็นอะเซทิลดีกลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์พอลิเมอร์ ในกลุ่มของพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นโดยระบบอัตโนมัติของศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข หากมีข้อผิดพลาดประการใดขออภัยเป็นอย่างสูง และขอสงวนสิทธิ์ในเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

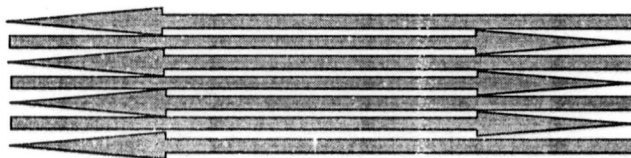
เป็นแกนหลัก (backbone) มีธาตุไนโตรเจนและกลุ่มอะเซทิลเกาะอยู่ภายในโมเลกุล เรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า 1-4 ไกลโคซิดิก (β 1,4-glycosidic bond) แต่ละหน่วยโมเลกุลของกลูโคสที่มีหมู่อะมิโนกับหมู่อะเซทิลเกาะกันเป็นกลุ่มของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน หรือเรียกว่า พอลิเมอร์ของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน (มีสัดส่วนของหน่วยย่อยเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนมากกว่าหน่วยย่อยกลูโคซามีน) (อังคณา, 2540; Aly และคณะ, 2001; Tokuyasu และคณะ, 2000; Kamst และคณะ, 1999; Kren และคณะ, 1998)



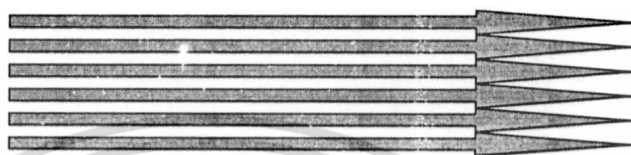
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไคตินเปรียบเทียบกับเซลลูโลส

ที่มา : รัฐ พิชญากูร (2544)

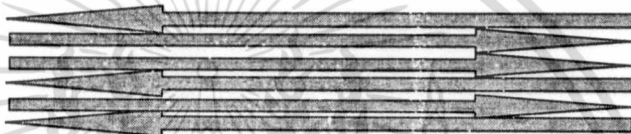
สารไคตินที่พบในธรรมชาติมีโครงสร้างต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยสายของไคตินมีการจัดเรียงตัวได้หลายแบบซึ่งมีความแข็งแรงต่างกันไป ลักษณะโครงสร้างของไคตินในธรรมชาติแบ่งได้ 3 แบบ คือ 1) แบบอัลฟา (alpha-chitin หรือ α -chitin) เป็นแบบที่สายพอลิเมอร์จัดเรียงตัวกลับไปมาซ้อนกัน สายพอลิเมอร์เรียงตัวแน่น และแข็งแรง มีความสมบูรณ์ในด้านพันธะไฮโดรเจนทั้งภายใน และระหว่างสายโซ่อย่างเป็นระเบียบทำให้ไคตินไคโตซานมีโครงสร้างเสถียรสูงดังรูปที่ 2.2 (ก) 2) แบบเบต้า (beta-chitin หรือ β -chitin) เป็นแบบที่สายพอลิเมอร์เรียงตัวในทิศทางเดียวกัน สายพอลิเมอร์เรียงตัวได้ไม่แน่นมากแสดงในรูปที่ 2.2 (ข) 3) แบบแกมมา (gamma-chitin หรือ γ -chitin) เป็นแบบที่สายพอลิเมอร์เรียงตัวไม่เป็นระเบียบไปในทิศทางเดียวกันบ้าง กลับทิศทางกันบ้างแสดงในรูปที่ 2.2 (ค) (รัฐ, 2544; สุวานูญ และคณะ, 2544)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 2.2 การเรียงตัวของสายพอลิเมอร์ไคติน

(ก) แบบอัลฟาไคติน

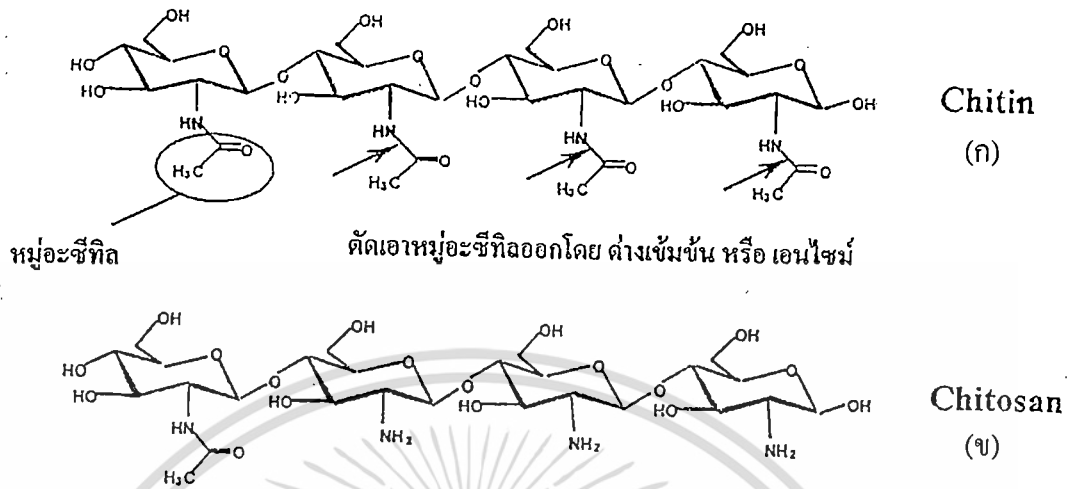
(ข) แบบเบต้าไคติน

(ค) แบบแกมมาไคติน

ที่มา : คัดแปลงจาก รัฐ พิษณุกร (2544)

ไคตินสามารถนำมาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยการกำจัดอะเซทิล (acetyl group) ออกจากน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนที่เป็นหน่วยย่อยของไคตินได้โดยการใช้ด่างเข้มข้น หรือ เอนไซม์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการตัดกลุ่มอะเซทิลออกจากน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน(แสดงดังรูปที่ 2.3) ซึ่งทำให้สมบัติหลายประการของไคตินเปลี่ยนแปลงไป เมื่อกำจัดหมู่อะเซทิลของไคตินออกไปมากกว่าครึ่งหนึ่ง หรือคิดเป็นร้อยละ 50 ขึ้นไป จะได้สารที่มีสมบัติละลายได้ดีในกรดอินทรีย์อ่อน เช่น กรดน้ำส้มสายชู (acetic acid) กรดแลกติก (lactic acid) ที่พบในนมเปรี้ยว และ กรดซิตริก (cirtic acid) ที่พบในมะนาว หรือ พีชตระกูลส้ม สารใหม่ หรือ อนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการกำจัดหมู่อะเซทิลออกจากไคติน เรียกว่า “ไคโตซาน” (รัฐ, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แสดงการย่อยสลายไคติน ณ ตำแหน่งหมู่อะซีทิล โดยสารละลายต่างเข้มข้น หรือ เอนไซม์ (ก) และ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย (ข)

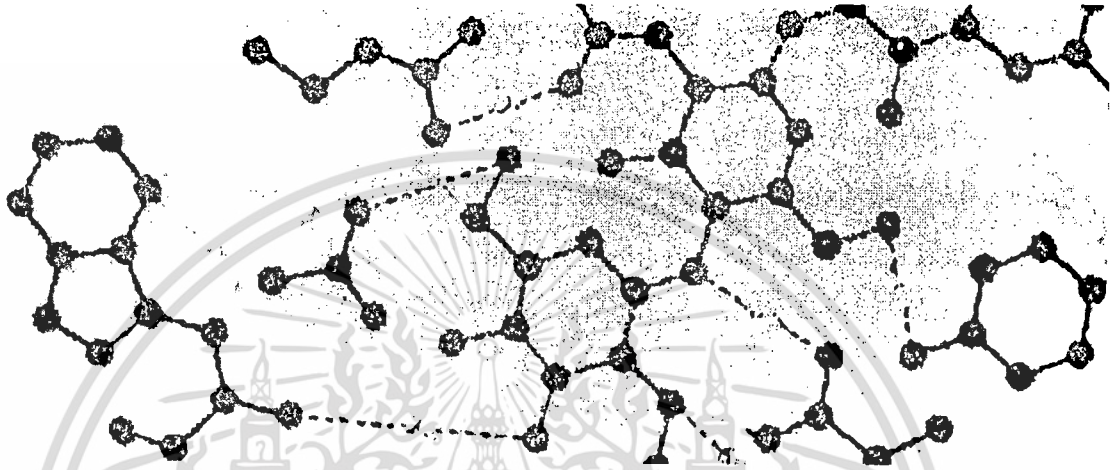
ที่มา : รัฐ พิษณุกร (2544)

ไคโตซานมีชื่อทางเคมีว่า poly- β (1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose หรือ พอลิเมอร์ ที่มีหน่วยย่อยชนิดน้ำตาลกลูโคซามีน (polymer monomer glucosamine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการย่อยสลายหมู่อะซีทิลออกจากพอลิเมอร์ของไคติน เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า กระบวนการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) บางครั้งเรียกไคโตซานว่า ดีอะเซทิลเลชันไคติน (deacetylation chitin) เนื่องจากหมู่อะซีทิล (acetyl group ; CO-CH₃) ของไคตินถูกตัดออกเหลือเพียงหมู่เอมิโน (amino group) บนคาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส (pyranose) ไคโตซานมีคุณสมบัติไม่ละลายในตัวทำละลายที่เป็นกรดหรือด่าง รวมทั้งกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดซัลฟูริก ไม่ว่าจะมีความเข้มข้นเท่าใดที่อุณหภูมิห้อง และไม่สามารถละลายในน้ำที่มีค่าความเป็นกรดต่างสูงกว่า 6.5 เนื่องจากโครงสร้างที่มีพันธะไฮโดรเจนซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 2.4 แต่ถ้านำไคโตซานมาบดแห้งกับกรดอินทรีย์ จะได้ไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ (water soluble chitosan) ถ้าหมู่อะซีทิลที่ถูกย่อยสลายหรือกำจัดไปประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์จะได้ไคโตซานชนิดที่เป็นไคโตซานซึ่งไม่มีหมู่อะซีทิล (full deacetylated chitosan) คุณสมบัติของไคโตซานที่ต่างจากพอลิเมอร์อื่น ได้แก่ เป็นประจุบวก (cationic polyelectrolyte) เนื่องจากมีหมู่เอมิโนอิสระ (-NH₂) บนคาร์บอนตำแหน่งที่สอง ทำให้ไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ กรดฟอร์มิกมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-100 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายที่ดีของไคโตซาน และนอกจากนี้ไคโตซานยังมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ เช่น เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาดูเท่านั้น เมื่อนำมาใช้ในเชิงพาณิชย์โดยไม่ได้รับอนุญาตให้ถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(biopolymers) ที่สามารถย่อยสลายได้เองโดยกระบวนการทางธรรมชาติ (biodegradable) เป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูง และมีโครงสร้างสายตรงของเอมีน (linear amine) ที่ทำปฏิกิริยาหรืออยู่ในรูปเกลือของกรดต่างๆ ได้ง่าย (นันทนา, 2542)



รูปที่ 2.4 แบบจำลองสายโซ่โคโตซานแสดงพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intramolecular hydrogen bonding) และระหว่างโมเลกุล (intermolecular hydrogen bonding)

ที่มา : Houston และคณะ (2002)

2.2 แหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตไคตินโคโตซาน

การนำไคตินและโคโตซานไปใช้อย่างกว้างขวางนี้เองทำให้เกิดปัญหาของแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตไคตินและโคโตซาน ซึ่งปัจจุบันแหล่งวัตถุดิบมาจากเปลือกกุ้งเป็นสิ่งสำคัญ ทำให้มีข้อจำกัดต่อการนำไปใช้เนื่องจากเปลือกกุ้งมีสารภูมิแพ้ และพบว่าบางช่วงเวลาอาจมีปริมาณเปลือกกุ้งไม่เพียงพอต่อความต้องการทำให้ราคาเปลือกกุ้งสดสูงมาก เพราะเกี่ยวกับวงจรชีวิตของกุ้ง และพื้นที่การเลี้ยงกุ้ง ส่งผลให้เกิดปัญหาการรุกรานพื้นที่ใช้ประโยชน์สำหรับขยายการผลิตการใช้วัตถุดิบสำหรับผลิตไคตินและโคโตซานอาจได้มาจากแมลงเปลือกแข็ง ซึ่งมีไคตินสะสมระหว่างชั้น exo-cuticle และ endo-cuticle ในรูปของสารประกอบโปรตีนที่แยกออกจากกันค่อนข้างยาก ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการใช้แมลงเปลือกแข็งเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตไคตินและโคโตซาน สำหรับแหล่งวัตถุดิบอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจคือจุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราพบว่าผนังเซลล์มีไคตินเป็นองค์ประกอบประมาณ 10-30 เปอร์เซ็นต์ (แสดงในตารางที่) ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และสภาพเซลล์ของเชื้อรา (Bartnicki, 1968; Tan และคณะ, 1996) เชื้อรากำลังเป็นที่

เอกสารนี้สนใจเนื่องจากการเจริญที่รวดเร็วของเซลล์ขนาดเล็ก และโครงสร้างของไคตินในผนังเซลล์มีไม่ต่างกันใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงสร้างที่ซับซ้อนน้อยกว่าเปลือกกุ้งเพราะมีองค์ประกอบอื่นๆ ในสัดส่วนต่ำกว่า ส่งผลให้การสกัดไคติน และไคโตซานมีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการนำเซลล์เชื้อราเพื่อมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไคตินและไคโตซาน ควรเป็นผลพลอยได้จากการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตสารต่างๆ โดยที่เซลล์เชื้อราเป็นของเหลือทิ้ง (by-product) จากกระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพ

ตารางที่ 2.1 ปริมาณไคตินสัมพัทธ์ในผนังเซลล์ของเชื้อบางชนิดในระยะต่างๆ

Fungus	Stage	Chitin (%)
<i>Mucor rouxii</i>	Mycelium	9.4
	Sporangiophore	18.0
	Sporangiospores	2.1
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Mycelium	23.7
	Conidia	36.2
<i>Neurospora crassa</i>	Mycelium	8.0-11.9
	Conidia	7.4-9.0
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Mycelium	19.5-42
	Conidia	11.4
<i>Trichoderma viride</i>	Mycelium	12.0-22.0
	Conidia	0

ที่มา : Herrera และคณะ (1991)

ไคตินและไคโตซานผลิตได้จากสัตว์ที่มีกระดองและเปลือกเช่น ปู กุ้ง ปลาหมึก นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จาก ยีสต์ รา และสาหร่าย โดยน้ำหนักโมเลกุลของไคตินและไคโตซานจากสัตว์มีกระดองนั้นจะสูง (ประมาณ 1.5×10^6 ดาลตัน) ในขณะที่ไคโตซานที่ได้จากราจะมีน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง-ต่ำ (medium-low) คือประมาณ $1.0 - 12.0 \times 10^4$ ดาลตัน ซึ่งไคตินและไคโตซานน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง-ต่ำนี้ สามารถนำไปใช้ในรูปของผง เพื่อทำหน้าที่ในการดูดซับคอเลสเตอรอล (cholesterol) และนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านทางการแพทย์ได้ ไคตินและไคโตซานที่ผลิตด้วยวิธีทางเคมีมีผลของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารไคตินและไคโตซาน ซึ่งส่งผลต่อการยอมรับทางอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น การผลิตแผ่นฟิล์มย่อยสลายสารชีวภาพ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Biodegradable film) การผลิตสารเพื่อใช้ทางการแพทย์และเภสัช เป็นต้น ประกอบกับข้อจำกัดเรื่องความเหมาะสมของฤดูกาลของแหล่งผลิต ดังนั้นจึงมีการผลิตไคตินและไคโตซานด้วยวิธีทางชีวภาพขึ้น โดยการใช้วัตถุดิบจากเชื้อรา ไคตินเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของรา (Bartnicki, 1968; Tan และคณะ, 1996) ข้อดีของไคตินและไคโตซานที่ผลิตได้จากรา คือ ผลิตภัณฑ์จากเชื้อราปราศจากสารที่ก่อให้เกิดการอาการแพ้ สามารถควบคุมน้ำหนักโมเลกุล และระดับของการกำจัดหมู่อะเซทิล (Deacetylation) ของไคโตซานทำได้โดยการควบคุมกระบวนการหมักและพารามิเตอร์ต่างๆ ในกระบวนการผลิต และนอกจากนี้ผลพลอยได้จากการผลิต คือ เบต้า-กลูแคน (β -glucan) ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ได้อีกด้วย

2.3 การผลิตไคตินไคโตซาน

ไคตินไคโตซานที่ผลิตได้จากวัตถุดิบต่างๆ เช่น เปลือกกุ้ง-ปู แมลง หรือจุลินทรีย์ (เชื้อรา ยีสต์ แบคทีเรีย) มักมีกระบวนการคล้ายกัน เริ่มต้นการกำจัดโปรตีนและสารอื่นๆ ที่ผสมหรือติดมากับวัตถุดิบ จากนั้นจึงนำไปแยกสาร โครงสร้างแข็ง (สารประกอบเคลือบ) ออกไปเพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ไคติน ซึ่งไม่ละลายน้ำ ไคตินที่ได้สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตไคโตซาน โดยนำมากำจัดหมู่อะเซทิล (acetyl group) ที่อยู่ในหน่วยย่อย (sub-unit) ของโครงสร้างหลัก การกำจัดหมู่อะเซทิลนี้ทำให้คุณสมบัติของไคโตซานละลายน้ำได้ดีกว่าไคติน จึงส่งผลให้มีการนำไปใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย กระบวนการผลิตไคตินไคโตซานแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ ได้แก่ การผลิตไคตินไคโตซานด้วยกระบวนการทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ

2.3.1 การผลิตไคตินไคโตซานด้วยกระบวนการทางกายภาพ

กรรมวิธีการผลิตไคตินไคโตซานโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้ ความร้อน (Thermal degradation) คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic) หรือรังสีพลังงานสูง (radiation) ได้แก่ รังสีแกมมา Vårum และคณะ (2001) พบว่าไคตินและไคโตซานสามารถย่อยสลายได้ที่อุณหภูมิสูงในสภาวะที่มีอากาศ โดยสายพอลิเมอร์มีการสลายตัวที่อุณหภูมิสูง 100 ถึง 120 องศาเซลเซียส Sato และคณะ (2003) พบว่าที่สภาวะอุณหภูมิ (120 - 180 องศาเซลเซียส) และความชื้นสูง โดยไม่มีตัวเร่งปฏิกิริยา สามารถย่อยสลายไคตินและไคโตซานที่ไม่อยู่ในรูปผลึกแข็ง (Amorphous chitin และ Amorphous chitosan) แต่ไม่สามารถย่อยสลายไคตินผงและไคโตซานผงในรูปผลึกได้ การย่อยสลายไคตินและไคโตซาน โดยรังสีแกมมาเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถย่อยสลายไคโตซานได้ในปริมาณมากด้วยวิธีการที่ง่ายและสะดวก (Chirachanchi และ Yoksan.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2002) Choi และคณะ (2002) ศึกษาการย่อยสลายสารละลายไคตินและไคโตซานเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ ในกรดอะซิติกเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความหนืด (Viscosity) 20 ถึง 100 เซนติพอยต์ (centipoint) ด้วยรังสีแกมมาจากธาตุโคบอลต์-60 (Co-60) เข้มข้น 2 ถึง 200 กิโลเกรย์ (K Gy) พบว่าเมื่อใช้ไคโตซานที่มีความหนืด 100 เซนติพอยต์ และความเข้มของรังสี 100 กิโลเกรย์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไคโตซานต่อกัน 2 โมเลกุล (Dimer) และ 3 โมเลกุลต่อกัน (Trimer) ปริมาณสูงสุด แต่เมื่อความเข้มของรังสีสูงกว่า 100 กิโลเกรย์ พบว่าผลิตภัณฑ์เกิดปฏิกิริยาเกิดสีน้ำตาล (Browning reaction) Siri-Upathum, (2002) ทำการศึกษาการย่อยสลายแผ่นไคโตซาน (Chitosan flake) 10.0 เปอร์เซ็นต์ ในกรดอะซิติก 2.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยรังสีแกมมาเข้มข้น 100 กิโลเกรย์ สามารถแยกไคโตซานโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุล 60 ถึง 100 กิโลดาลตัน โดยมีระดับการกำจัดหมู่อะเซทิลมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และระดับการย่อยสลายสายพอลิเมอร์ 8 ถึง 10

2.3.2 การผลิตไคตินไคโตซานด้วยกระบวนการทางเคมี

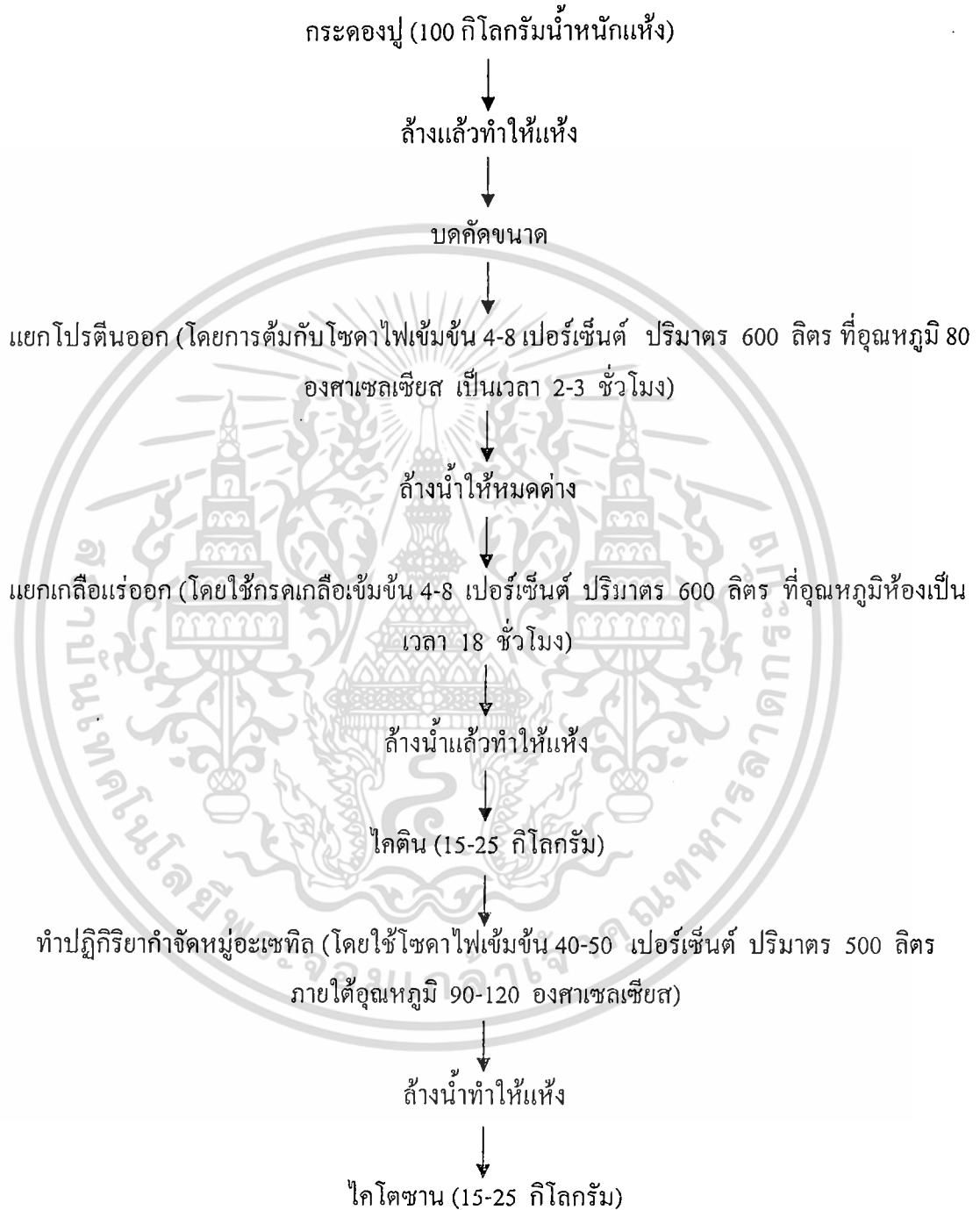
Chang และคณะ (2000) ศึกษาการย่อยสลายไคตินโดยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4.0 นอร์มอล และ 7.0 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส ในเวลา 300 นาที พบว่าการใช้อุณหภูมิและความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกสูงในเวลาอันสั้น เป็นสภาวะที่เหมาะสมในย่อยได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกเมอร์ Vårum และคณะ (2001) พบว่ากรดไฮโดรคลอริกสามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของเอนอะซิทิลกลูโคซามีน 2 โมเลกุล และพันธะระหว่างโมเลกุลของเอนอะซิทิลกลูโคซามีนกับโมเลกุลกลูโคซามีน เร็วกว่าพันธะที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของกลูโคซามีน 2 โมเลกุล Novikov, (2003) รายงานว่าการย่อยสลายสายพอลิเมอร์ไคตินและไคโตซานด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 36 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 ถึง 80 องศาเซลเซียส มีอัตราการลงเมื่อพอลิเมอร์มีระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล (Deacetylation) สูงขึ้น กรรมวิธีการผลิตไคโตซานโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีในสภาวะรุนแรงและอุณหภูมิสูง (thermochemistry) คือ การย่อยสลายเพื่อกำจัดกลุ่มอะเซทิลออกจากด้วยสารละลายต่างเข้มข้น ที่อุณหภูมิสูงภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ซึ่งปริมาณผลได้ไคโตซานขึ้นกับปริมาณการเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะเซทิลที่แตกต่างกันตามปริมาณกลุ่มอะเซทิลที่ถูกย่อยสลายคิดเป็นหน่วยร้อยละ หรือเรียกว่า “เปอร์เซ็นต์ DD” (อังคณา, 2540; Sashiwa และคณะ, 2003)

อุตสาหกรรมการผลิตไคตินและไคโตซานจากเปลือกของสัตว์น้ำ เช่น เปลือกปู เปลือกกุ้ง ที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ โดยนำเศษเปลือกมาผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) เจือจาง เพื่อละลายโปรตีน จากนั้นจึงปรับค่าความเป็นเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สว่นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดค้างของสารละลายให้เป็นกลาง แล้วจึงนำตะกอนมาทำให้แห้ง ส่วนที่เหลือนำมาปรับด้วย สารละลายไฮโดรคลอริก (hydrochloric) เจือจาง เพื่อละลายคาร์บอเนต (carbonate) ที่อยู่ใน โครงสร้างเปลือกให้เป็นแคลเซียมคลอไรด์ การเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะเซทิลในโครงสร้างของ ไคตินเริ่มต้นเมื่อเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40-50 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้อุณหภูมิ 90- 120 องศาเซลเซียส ซึ่งจากกระบวนการนี้จะได้ไคโตซาน ตัวอย่างการผลิตไคโตซานจาก กระดองปูในทางอุตสาหกรรมดังรูปที่ 2.5 (พิมพ์ทิพย์, 2542)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 การผลิตไคตินและไคโตซานจากกระดองปู

ที่มา : พิมพิททิพย์ โภชนะวิทย์ (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 การผลิตไคตินไคโตซานด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

การผลิตไคตินไคโตซานด้วยกระบวนการทางชีวภาพ จัดเป็นแนวทางที่พัฒนาขึ้น เพื่อแก้ปัญหาการผลิตโดยกระบวนการทางเคมี ซึ่งมีข้อด้อยต่างๆ ได้แก่ ชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้มีหลากหลาย และไม่สามารถควบคุมได้ นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่นการใช้กรดเข้มข้น และอุณหภูมิสูง การประยุกต์ใช้กระบวนการทางชีวภาพเพื่อผลิตไคตินไคโตซานสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์ หรือเอนไซม์จำเพาะที่สามารถย่อยสลายเปลือกกุ้ง-ปู ไปเป็นไคตินไคโตซาน ในสภาพพีเอชเป็นกลาง และอุณหภูมิปกติ อีกทั้งสามารถกำหนดชนิดและความยาวพอลิเมอร์ไคตินไคโตซานได้อีกด้วย แต่กระบวนการทางชีวภาพให้อัตราการผลิตต่ำ และต้นทุนค่อนข้างสูง นับว่าเป็นปัญหาสำคัญ การใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสลายเปลือกกุ้ง-ปู ด้วยวิธีทางชีวภาพเพื่อผลิตไคตินและไคโตซาน ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่สำคัญ ขั้นตอนแรกเป็นการใช้เอนไซม์ชนิดย่อยภายในโมเลกุล (endochitinase enzyme) ได้แก่ chitinase และ chitosanase ซึ่งย่อยวัตถุดิบประเภทไคติน และไคโตซาน (ตามลำดับ) ได้เป็นไคตินโมเลกุลสั้นลง (chitooligomers) ที่ประกอบด้วย N-acetyl glucosamine (GlcNAc) และ glucosamine (GlcN) จากนั้นขั้นตอนมาจึงใช้เอนไซม์ชนิดย่อยภายนอกโมเลกุล (exochitinase) เพื่อย่อยไคตินโมเลกุลสั้นให้ได้เป็นโมเลกุลเดี่ยวของ N-acetyl glucosamine (GlcNAc) หรือ glucosamine (GlcN) (Sakai และคณะ, 1991) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความจำเพาะสูง สามารถกำหนดชนิดและขนาดพอลิเมอร์ไคตินไคโตซาน แต่ข้อด้อยอยู่ที่เอนไซม์ที่ใช้ย่อยวัตถุดิบ พบว่ามีราคาแพง และประสิทธิภาพต่ำ ทั้งในแง่ของกิจกรรมการย่อยสลายต่ำ ใช้เวลานาน และความคงตัว ดังนั้นการปรับปรุงประสิทธิภาพของเอนไซม์จึงได้รับความสนใจอย่างมาก แนวทางหนึ่งที่น่าเป็นไปได้จึงมุ่งไปที่การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไคตินไคโตซาน ร่วมในกระบวนการผลิต โดยควบคุมอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม และยังคงความสามารถในการเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นไคตินไคโตซานก่อน แล้วจึงย่อยสลายต่อไปเป็นพอลิเมอร์ขนาดที่ต้องการตามชนิดของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตได้นั่นเอง Krairak และ Budda (2002) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไคตินจากเปลือกกุ้งได้เป็น โมเลกุลไคตินสายสั้นๆ (chitooligomers) ที่สามารถละลายน้ำได้ดี ได้แก่ chitotriose (NAG₃) และ chitotetraose (NAG₄) ดังนั้นจึงนำเซลล์ในสภาพดังกล่าวเพื่อใช้ทดสอบการย่อยวัตถุดิบที่อยู่ในรูปของเซลล์เชื้อราให้กลายเป็นไคตินและไคโตซานขนาดโมเลกุลตามต้องการต่อไป

2.4 คุณสมบัติทางชีวภาพของไคตินไคโตซานโอลิโกเมอร์

แม้ว่าไคตินและไคโตซานนิยมนำไปใช้อย่างกว้างขวาง แต่การผลิตมีขั้นตอนมากและต้องอาศัยความร้อนสูงในสภาพเป็นด่างรุนแรง ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมโดยตรง ดังนั้นนักวิจัยเริ่มให้ความสนใจการใช้ประโยชน์จากไคติน โดยการเตรียมไคตินเป็นโมเลกุลสั้นๆ เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ โดยพบว่าโมโนเมอร์ (monomer) ของไคตินเป็น N-acetyl glucosamine มีคุณสมบัติให้ความหวาน ขณะที่โมโนเมอร์ของไคโตซานคือ glucosamine มีรสขม Sashiwa และคณะ (2002) พบว่า N-acetyl glucosamine สามารถใช้บำบัดโรคไขข้ออักเสบ (osteoarthritis) และใช้เป็นยารับประทาน (oral administration) ได้ดีกว่า glucosamine สำหรับ oligomer ในกลุ่ม chitohexaose สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และยับยั้งมะเร็งได้อีกด้วย (Suzuki และคณะ, 1991) สำนักงานอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ให้การรับรองว่าไคตินมีคุณสมบัติไม่เป็นพิษเช่นเดียวกับไคโตซาน และสามารถออกฤทธิ์ฆ่าไส้เดือนฝอยได้ (McCurdy, 1991) ปัจจุบันจำนวนผู้วิจัยเกี่ยวกับการผลิตไคตินโมเลกุลสั้นๆ ได้เพิ่มจำนวนขึ้น โดยมุ่งศึกษาคุณสมบัติเป็นสำคัญ

2.5 เชื้อราโมแนสคัส

งานวิจัยนี้ให้ความสนใจไปที่เชื้อราโมแนสคัส (*Monascus* sp.) เนื่องจากเป็นเชื้อราที่สร้างสีผสมอาหาร ซึ่งมีการผลิตระดับอุตสาหกรรมในญี่ปุ่น และเยอรมัน อีกทั้งไม่มีประวัติสร้างสารพิษ ดังนั้นการนำเซลล์เชื้อราโมแนสคัสเพื่อมาใช้ผลิตไคตินและไคโตซานจึงเป็นการนำเซลล์ที่เหลือทิ้งจากการผลิตเพื่อมาแปรรูปให้เป็นสารที่มีประโยชน์ และเป็นการเพิ่มคุณค่า สำหรับประเทศไทยได้ทำการวิจัยเรื่องการผลิตสีจากเชื้อราโมแนสคัสอย่างต่อเนื่อง และมีแนวโน้มสำหรับการผลิตในระดับนำร่อง (pilot plant) โดยใช้เชื้อราโมแนสคัสผลิตสีผสมอาหารโดยนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง และแป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหาร เชื้อราโมแนสคัสจัดอยู่ใน Class Ascomycetes Subclass Plectomycetidae Order Eurtials (Alexopoulos และ Mims, 1979) ซึ่งสามารถสร้างสารสีได้หลายชนิด เช่น สีแดง สีเหลือง หรือสีส้ม ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ ชนิดสายพันธุ์ แหล่งอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง และวิธีการเลี้ยงเชื้อ

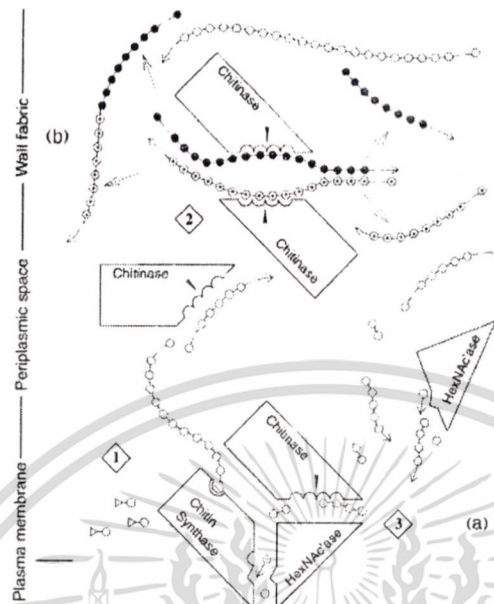
บุษบา และวรรณภา (2528) และ บุษบา และคณะ (2531) Yongsmith และคณะ (1990) ได้วิจัยคัดเลือกเชื้อราโมแนสคัสที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน (ซึ่งวัตถุดิบดังกล่าวมีการผลิตมากในประเทศ) และได้พัฒนาสายพันธุ์เชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมแนสคัสให้สามารถผลิตสีแดง และสีเหลืองจนให้ผลผลิตสูงที่สุด พร้อมทั้งศึกษาทดสอบความเป็นพิษเพื่อยืนยันความปลอดภัยของเชื้อราดังกล่าว ดังนั้นการนำเซลล์เชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ประโยชน์จึงไม่มีผลของความเป็นพิษ นอกจากนี้ยังได้ปรับปรุงพัฒนากระบวนการเลี้ยงเชื้อโมแนสคัสในอาหารเหลวให้เหมาะสมต่อการสร้างสี ซึ่งให้ผลการเจริญที่ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 30-35 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตร การเตรียมเซลล์เชื้อราโมแนสคัสโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว SS medium (Yongsmith และคณะ 1994) แบบครั้งเดียว (batch cultivation) และแบบให้อาหาร (fed-batch cultivation) (Krairak และคณะ 1991; Yongsmith และคณะ, 1994; Krairak และคณะ, 1997; Krairak และคณะ, 1998; Krairak และคณะ, 1999; Krairak และคณะ, 2000) ทำให้ได้เซลล์เชื้อราเพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับการทดลองผลิตโคตินและโคโตซานจากเซลล์เชื้อรา แต่อย่างไรก็ตามลักษณะทางสรีระวิทยาของเซลล์เชื้อราโมแนสคัสในแต่ละระยะของการเจริญพบว่าเซลล์มีลักษณะแตกต่างกันออกไปซึ่งน่าจะส่งผลต่อการย่อยเซลล์ของเชื้อรา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาความเป็นไปได้สำหรับนำไปใช้เส้นใยเชื้อราโมแนสคัสเป็นแหล่งวัตถุดิบเพื่อผลิตโคตินและโคโตซานทดแทนเปลือกกุ้ง และการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของโคตินและโคโตซาน โมเลกุลต่ำ

2.6 การเจริญและการสร้างเส้นใยเชื้อรา (mycelium formation and extension)

รูปที่ 2.6 แสดงขั้นตอนเมแทบอลิซึมควบคู่ไปกับกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง และย่อยสลายโครงสร้างโคตินภายในบริเวณผนังเซลล์เชื้อราที่มีการเจริญ โดยแบ่งพื้นที่รอบๆ ผนังเซลล์ออกเป็น 3 ส่วน ซึ่งสัมพันธ์กับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ส่วนที่ 1 plasma membrane ส่วนที่ 2 periplasmic space และส่วนที่ 3 wall fabric เอนไซม์ 3 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ประกอบด้วย chitin synthase (Chs), chitinase และ β -N-acetylhexosaminidase (HexNAc'ase) (a) และเอนไซม์เกี่ยวกับการย่อยสลาย (b) จนกระทั่งได้เป็นสารโมเลกุลเดี่ยว (monomer) ระบบการย่อยสลายโคตินส่งผลกระทบต่อตรงต่อการย่อยโคติน และกระบวนการ transglycosylation ที่ดำเนินไปพร้อมๆ กัน ซึ่งทั้ง 2 กลไกถือเป็นกุญแจสำคัญ (Dora และคณะ, 2003) ส่วน (a) ของแบบจำลองแสดงความเกี่ยวข้องของการสังเคราะห์โคติน ส่วน (b) แสดงให้เห็นทั้งที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโคตินไปพร้อมๆ กับกิจกรรมการย่อยสลาย และ/หรือ ไกลโคซิเลชัน (hydrolysing/transglycosylating action) ของโคโตซาน จนกระทั่งไปสิ้นสุดที่การแตกหักของสายโซ่พอลิเมอร์จนได้เป็นหน่วยย่อย (monomer)



รูปที่ 2.6 แสดงเมแทบอลิซึมของการสร้างและย่อยสลายไคตินในผนังเซลล์เชื้อรา
ที่มา Dora และคณะ (2003)

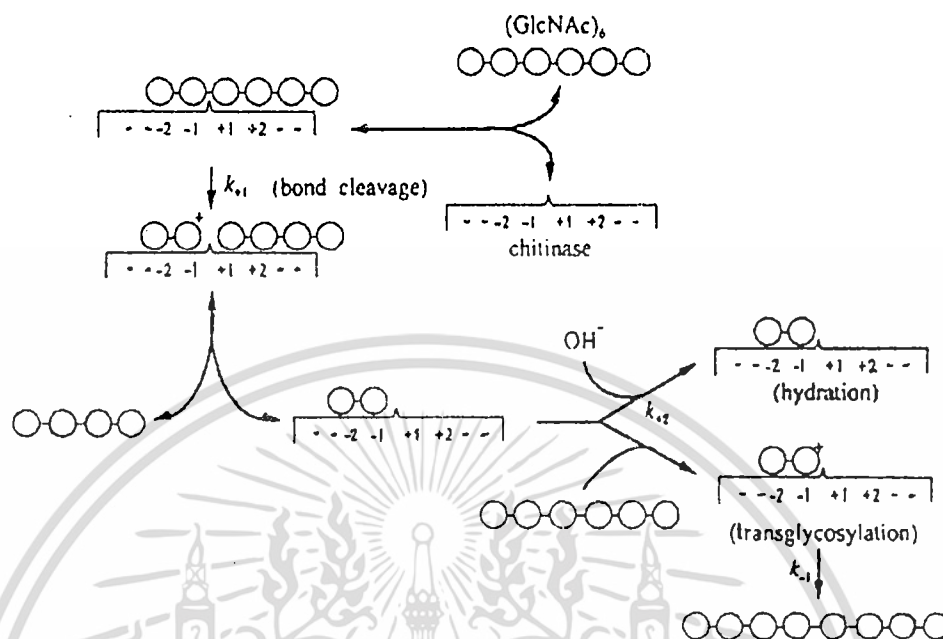
เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไคตินทั้งในส่วน (a) และ (b) พบว่ามีความแตกต่างๆ ในแง่ของชอบ (affinity) ระหว่างความยาวสายสเตอร์ท และคุณสมบัติบางอย่างของสายสเตอร์ท (Rast และคณะ, 1991) การทำงานที่สอดคล้องกันระหว่างส่วน (a) และ (b) แสดงได้เป็น 4 ขั้นตอน ได้แก่ (1) การสังเคราะห์ใหม่ของไคติน (de novo synthesis) จากการทำงานของเอนไซม์ Chs ที่ได้รับการกระตุ้น (2) การจัดรูปแบบใหม่ (remodeling) ของส่วนที่เพิ่มขึ้นมา เช่นเดียวกันกับการสร้างสายโซ่ไคติน และรวมไปถึงกิจกรรมเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ ไคติเนส และ HexNAc'ase ที่เกี่ยวข้องกับ transglycosylating/hydrolysing (3) การดำเนินกิจกรรมย่อยสลายไคติน ส่งผลให้เพิ่มจำนวนสายโซ่สั้นๆ ของ chito-oligomers และ N,N₀-diacetylchitobiose (chitobiose) ที่เพียงพอต่อความต้องการเพื่อไปใช้ในกิจกรรมของ chitinase และ Hex-NAc'ase และเกี่ยวข้องกับ Chs และ (4) การยับยั้งของ chitobiose ต่อ HexNAc'ase-mediated ส่งผลให้เกิดการสร้างหน่วยย่อย GlcNAc ที่เพียงพอสำหรับกิจกรรมการสังเคราะห์ไคติน และ GlcNAc ที่เหลือก็นำไปใช้สำหรับ transglycosylation เพื่อเปลี่ยนแปลงเป็นตัวรับ (acceptors) ที่เหมาะสม (Rast และคณะ, 2003)

2.7 การย่อยสลายไคตินไคโตซาน ไคตินเนส

การย่อยสลายไคตินไคโตซานเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไคตินไคโตซานโอลิโกเมอร์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสายพอลิเมอร์สั้นๆ ซึ่งส่งผลดีต่อการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในแง่ของการละลายน้ำที่เพิ่มขึ้น และยังมีลักษณะจำเพาะในด้านการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เจาะจงต่อสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ทั้งในสัตว์ และพืช การย่อยสลายไคตินไคโตซานซึ่งจัดเป็นพอลิเมอร์สายยาว มีขนาดโมเลกุลประมาณ 10^6 หน่วย ที่ไม่ละลายน้ำ ไปเป็นพอลิเมอร์สายสั้นๆ ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 100 หน่วย เรียกว่า โอลิโกเมอร์ สามารถทำได้โดยการใช้เอนไซม์ หรือสารละลายกรด ย่อยสลายพันธะภายในโมเลกุล เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคตินและไคโตซาน พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทั้งในสัตว์และจุลินทรีย์ที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบจะสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ทั้งสิ้น เนื่องจากต้องใช้ในขั้นการลอกคราบ หรือเม็งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต ส่วนสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีไคตินไคโตซานเป็นองค์ประกอบก็สามารถพบเอนไซม์เหล่านี้ได้เช่นกัน เอนไซม์ย่อยสลายไคตินและไคโตซานจะมีสมบัติและการทำงานที่แตกต่างกันออกไป จึงสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ตามความแตกต่างด้านคุณสมบัติและการทำงาน ได้แก่ (รัฐ, 2544)

2.7.1 เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase : EC 3.2.1.14, glycosylhydrolase family 18 and 19)

เอนไซม์เร่งการย่อยสลายไคตินบริเวณปลายสาย และภายในสาย ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนต่อกัน 2 โมเลกุล (ไคโตไบโอส, chitobiose,) น้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนต่อกัน 3 โมเลกุล (ไคโตไตรโอส, chitotriose) หรือ สายไคตินสั้นๆ (short oligomers) ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดสายโมเลกุลจำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยสลายดังแสดงในรูปที่ 2.6 เอนไซม์ไคตินเนสแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แฟมิลี 18 และ 19 ตามกลไกการเกิดปฏิกิริยา และโครงสร้างของเอนไซม์ (Sasaki และคณะ. 2002)



รูปที่ 2.7 แบบจำลองการเกิดปฏิกิริยาการสลายเฮกซะแซ็กคาไรด์ (hexasaccharide) ด้วยเอนไซม์ไคตินเนส

ที่มา : Sasaki และคณะ (2002)

2.7.2 เอนไซม์เฮกโซซามินิเดส หรือ เอนไซม์ไคโตไบเอส (hexosaminidase หรือ N-acety-beta-hexoaminidase หรือ chitinase : EC 3.2.1.52, glycosylhydrolase family 3 and 20) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการย่อยสลายไคตินจากบริเวณปลายสาย หรือ เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคโตไบเอสแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน 2 โมเลกุล (รัฐ, 2544)

2.7.3 เอนไซม์ไคโตซานเนส (chitosanase : EC 3.2.1.132, glycosylhydrolase family 46) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการย่อยสลายสายไคโตซาน โดยไม่ย่อยสลายสายไคตินและให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคซามีน หรือ น้ำตาลกลูโคซามีน 2 โมเลกุล (รัฐ, 2544; Shimono และคณะ, 2002)

2.7.4 เอนไซม์ไคตินดีอะเซทิลเลส (chitin deacetylase : EC 3.5.1.41) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายหมู่อะเซทิลออกจากโมเลกุลของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนในพอลิเมอร์ของไคติน ทำให้ไคโตซานที่มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายหมู่อะเซทิลในระดับแตกต่างกัน และจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปของกรดอะซิดิกอิสระ (Win และ Stevens. 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดแล้ว พบว่าเอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme หรือ Endo- β -N-acetylmuramidase ; EC 3.2.1.17) (Kurita และคณะ, 2000; นันทนา, 2542; Masaki และคณะ, 1981; Fukamizo และคณะ, 1986) เอนไซม์เพคตินเอส (Pectinase ; EC 3.2.1.15) เอนไซม์เปปซิน (Pepsin) เอนไซม์ปาเปน (Papain) เอนไซม์โปรเนส (Pronase) (Kumar และ Tharanathan, 2004) เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulose) เอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase) เอนไซม์ไลเปส (Lipase) (Sukwattanasinitt และคณะ, 2002) สามารถย่อยสลายไคตินและไคโตซานได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ไคตินเอส

2.8 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินไคโตซานโอลิโกเมอร์ต่อพืช

ปัจจุบันการค้นคว้าและวิจัยถึงประโยชน์ของไคตินและไคตินโอลิโกเมอร์ (N-acetylchitooligomer) ในด้านต่างๆ เป็นไปอย่างกว้างขวาง เช่น ในด้านการเกษตร ได้มีผลงานวิจัยในหลายประเทศพบว่า โอลิโกเมอร์ดังกล่าวมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการทำงานของยีนในพืช ช่วยให้พืชเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์โปรตีนที่เสริมสร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม elicitor โดยการกระตุ้นกระบวนการป้องกันตัวเองโดยยีนเซลล์เจ้าบ้านของพืชให้สร้างเอนไซม์เพื่อต้านทานต่อโรคบางชนิดได้ ได้แก่ ยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความแข็งแรง การซ่อมแซม หรือ การปรับปรุงเปลี่ยนแปลงสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค และสร้างสารมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (phytoalexin) ตัวอย่างเช่น stilbene เป็นสารที่องุ่นสร้างขึ้น เพื่อต่อต้านเชื้อราก่อโรคในองุ่น (Fritzscheier และ Kindl, 1981; Robina และคณะ, 2002) นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถชักนำให้พืชสร้างกลไกการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (pathogenesis related proteins) ได้แก่ กลุ่มของเอนไซม์ที่เป็นตัวยับยั้ง (inhibitor) เช่น เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์โปรติเอส กลุ่มของเอนไซม์ที่เป็นตัวย่อยสลาย เช่น เอนไซม์ไคตินเอส เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เป็นต้น (Mauch และ Staehelin, 1989; Mason และ Davis, 1997; Agrawal และคณะ, 2002) Yamada และคณะ (1993) รายงานว่า chitopentose (GlcNAc)₆ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสาร phytoalexins ในข้าวเจ้าที่เลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอย (suspension culture)

ด้านการแพทย์ พบว่าโอลิโกเมอร์ของไคตินมีคุณสมบัติในการต้านมะเร็ง กระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ป้องกันการติดเชื้อโรคบางชนิดในหนูทดลอง (mice) รายงานวิจัยคุณสมบัติการต่อต้านการเกิดมะเร็ง (antitumorigenic property) ของโอลิโกเมอร์ไคติน โดยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งผ่านการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immuno-enhancing effect) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

effect) Suzuki และคณะ (1986) พบว่า chitotetraose (GlcNAc)₄ จนถึง chitoheptose (GlcNAc)₇, แสดงการตอบสนองสูงมากต่อ peritoneal exudates cells ใน BALB/c mice ในขณะที่ chitobiose – chitopentose (GlcN₂-GlcN₆) ไม่แสดงสมบัติดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่า chitooligomer และ chitosanoligomer (โพลิโกเมอร์ของไคตินและไคโตซาน) ได้แก่ (GlcNAc)₆ และ (GlcN)₆ ให้ผลยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอก (tumor) ชนิด allogenic และ syngenic ในหนูทดลอง รวมถึงเซลล์เนื้องอกชนิด sarcoma 180 solid tumor และ MM46 solid tumor ซึ่งผลดังกล่าวมีผลต่อหนูทดลองไม่ได้เป็นการฆ่าเซลล์เนื้องอกด้วยโพลิโกเมอร์โดยตรง การศึกษาของ Tokoro และคณะ (1988) พบว่า (GlcNAc)₆ และ (GlcN)₆ สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกชนิด Meth-A solid tumor ที่ปลูกถ่ายให้หนูทดลอง BALB/c และไม่มีผลกระทบชนิด antimetastatic effect ของ (GlcNAc)₆ ต่อหนูทดลองที่เป็นโรค Lewis lung carcinoma โพลิโกเมอร์ไคตินยังแสดงสมบัติกระตุ้นระบบป้องกันการติดเชื้อก่อโรคบางชนิดในหนูทดลอง โดยยับยั้งการติดเชื้อ *Listeria monocytogenes* เนื่องจากการกระตุ้น interferon-λ และ interleukin 2 โดยเม็ดเลือดขาวกลุ่ม macrophage ที่ได้รับ (GlcNAc)₆ (Shahidi และคณะ, 1999) หน่วยย่อยของไคติน ได้แก่ N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) สามารถเสริมสร้างและรักษาโรคที่เกี่ยวกับไขข้อและกระดูกเสื่อม (ostrioarthritis) และ inflammatory bowel disease รวมทั้งได้รับการส่งเสริมให้มีการนำมาใช้แทนสารพวก glucosamine (GlcN) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ proteoglycan ในกระดูกอ่อน ผิวหนังและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และมีการผลิตออกมาจำหน่ายในทางการค้าในรูปเกลือกลูโคซามีนซัลเฟต เนื่องจากสารพวกกลูโคซามีนมีรสขม ในขณะที่ GlcNAc มีรสหวาน ทำให้สะดวกต่อการบริโภค และพบว่ากลูโคซามีนบางส่วนจะถูกเปลี่ยนเป็น GlcNAc โดยวิถีเมทาบอลิซึมของร่างกาย (Sashiwa และคณะ, 2001)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 เป็นเชื้อราที่กลายพันธุ์มาจากเชื้อราสายพันธุ์พ่อแม่ *Monascus* sp. KB11304 ซึ่งผ่านการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 20 นาที ทำให้ไม่สร้างสีทั้งในเส้นใย และในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Yongsmith และคณะ, 2000) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. บุญบา ยงสมิทธิ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

3.2 พันธุ์กล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส (*Phalaenopsis*) ซึ่งเจริญและเพิ่มจำนวนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารวุ้น MS จนกระทั่งได้ส่วนยอด และราก นำมาคัดเลือกเฉพาะต้นที่มีจำนวนใบ (2-3 ใบ) ความสูง (1.5-2.0 เซนติเมตร) และจำนวนราก (1-2 ราก) ใกล้เคียงกัน เพื่อใช้ทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลายไคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1

3.3 เอนไซม์ไคตินเนส

crude enzyme ของไคตินเนส ที่ได้จากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยก (รหัสหมายเลข 6.0) ในอาหารเหลว chitin medium ที่บรรจุในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณ $1.0 - 2.0 \times 10^7$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และเก็บส่วนใสเพื่อใช้เป็นสารละลายเอนไซม์ไคตินเนส สำหรับทดสอบการย่อยสลายไคตินเป็นโอลิโกเมอร์ (Krairak และ Budda, 2002, สมชาย และธีระพันธ์, 2549) (แสดงในภาคผนวก ก.)

3.4 อุปกรณ์

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave) Tomy ; SS-325, Japan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Hermle ; Z383K, Germany
 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) Astec Microflow ; ABS 1200, UK
 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) Binder ; BD 240, Germany
 เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) Gallenkamp ; T490188, UK
 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Shimadzu ; UV 1201 V, Japan
 เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง Mettler Toledo ; PG 803, Switzerland
 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง Mettler Toledo ; และ AG 204, Switzerland
 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) Cyberscan ; 2000, Singapore
 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) Memmert ; 600, Germany
 เครื่องแยกของเหลวความดันสูง (HPLC) Shimadzu ; Japan ประกอบด้วย
 ส่วนควบคุมอัตราการไหลของเฟตเคลื่อนที่ ; LC-10 AD VP
 ส่วนวัดการดูดกลืนแสง UV ; SPD-10 A VP
 ส่วนประมวลผลและบันทึกผล ; C-R7Ae plus
 อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water incubator shaker) ; Memmert, Germany
 เครื่องทำแห้งแบบสูญญากาศ (freeze dry) Labconco; LYPH-LOCKL, USA
 เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) Perkin Elmer; spectrum
 GX, USA ประกอบด้วย
 เครื่องวัดแสงอินฟราเรด (IR detector) ;
 เครื่องบันทึกสเปกตรัม (recorder หรือ readout devices) ;
 โกร่งอะเกต (agate mortar) พร้อมสาก
 เครื่องอัดขนาด 15 ตัน
 กล้องจุลทรรศน์ Nikon และชุดถ่ายภาพ Olympus (japan)

3.5 สารเคมี

อาหาร MYS (malt yeast extract starch medium)

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์อิมิตัวในเมธานอล

สารละลายฟีนอล (phenol) เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

กรดซัลฟูริกเข้มข้น (sulfuric acid)

สารละลายอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile)

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนำมาใช้เพื่อประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

สารละลายบอเรนพฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

สารโพแทสเซียมโบรมีน (potassium bromine)

ไคตินจากเปลือกกุ้ง ขนาด 45 ไมโครเมตร ; Siambionet, Thailand.

ไคตินจากแกนหมึก ; Siambionet, Thailand.

ไคโตซาน (chitosan sample) ; Seafresh chitosan (Lab) company limited , Thailand.

A-acetyl-D-glucosamine (G1) ; Sigma, USA

Chitobiose (G2) ; Seikagaku corporation, Japan

Chitotriose (G3) ; Seikagaku corporation, Japan

Chitotetraose (G4) ; Seikagaku corporation, Japan

Chitopenose (G5) ; Seikagaku corporation, Japan

Chitohexaose (G6) ; Seikagaku corporation, Japan

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS SS PDA และ GYP

เลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 บนอาหารวุ้น MYS SS PDA และ GYP (ภาคผนวก ก.) โดยใช้ชิ้นวุ้นที่เจาะด้วยค็อกบอร์เรอร์ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 1 ชิ้น วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา และบันทึกลักษณะเส้นใยเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิทัล

3.6.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว SS medium

นำเชื้อรา *Monascus* sp.KB 20M1 ที่เจริญบนอาหารวุ้น MYS โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นด้วยค็อกบอร์เรอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 4 ชิ้น (เชื้อเริ่มต้น) ใ้ลงในอาหารเหลว SS ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือ และน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในอาหารเหลว SS medium

นำเชื้อเริ่มต้นของเชื้อรา *Monascus* sp.KB 20M1 มาศึกษาการแปรผันความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการเจริญ โดยนำแป้งมันสำปะหลังไปย่อยด้วยเอนไซม์ Thermamyl เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 75-90 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 30.0 – 60.0 กรัมต่อลิตร และใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 40.0 กรัมต่อลิตร นำอาหารทดสอบปริมาตร 150 มล. บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มล. หลังจากกลึงเชื้อ แล้วนำไปหมักบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที บันทึกการเจริญที่เวลา 7 วัน

3.6.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อรา โมแนสคัสในถังหมักขนาด 20 ลิตร

การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp.KB 20M1 ในถังหมักขนาด 20 ลิตร โดยศึกษาเริ่มจากเตรียมเชื้อเริ่มต้น (inoculum) ให้เชื้อราเจริญในพลาสติกขนาด 500 มล. บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในถังหมักขนาด 20 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SS ปริมาตร 10 ลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที การเลี้ยงเชื้อใช้ความเร็วการกวน 500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 0.75 VVM และใช้ silicone เป็นสารกำจัดฟอง บันทึกผลการเจริญที่เวลาต่างๆ และศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิทัลเพื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี image analysis สำหรับนำสภาพของเซลล์เชื้อราในแต่ละช่วงเวลากการเจริญไปศึกษาการย่อยสลายเพื่อให้ได้เป็นไคตินต่อไป

3.6.5 วิเคราะห์โครงสร้างไคตินและไคโตซานในเส้นใยเชื้อรา

นำเส้นใยเชื้อราอบแห้งมาบดให้ละเอียด (ขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร) แล้วเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อิ่มตัวในเมทานอล (ภาคผนวก ก) ในอัตราส่วนเส้นใยเชื้อรา 1 กรัม ต่อสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อิ่มตัวในเมทานอล 20 มิลลิลิตร (1:20) ผสมสารละลายตลอดระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทิ้งให้ตกตะกอน 1 คืน นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านใยแก้ว แล้วตกตะกอนไคตินด้วยน้ำกลั่น เก็บตะกอนไคตินที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบสูญญากาศ จากนั้นบดให้ละเอียดแล้วนำไปวิเคราะห์โครงสร้างไคตินและไคโตซานด้วยเครื่อง FT-IR (ภาคผนวก ข)

3.6.6 ศึกษาการผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งวัตถุดิบ (โคตินจากเปลือกกุ้ง โคตินจากแกนหมึก และ เส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.20M1 ขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร) 1.0 กรัม ใส่ในพลาสติกขนาด 120 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยจุกยาง นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 60 และ 80 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0 2 4 6 และ 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้กรองผ่านใยแก้ว เก็บส่วนในสมาปรับพีเอชให้เป็นกลาง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาโคตินโอลลิโกเมอร์ที่ได้ด้วยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข)

3.6.7 ศึกษาการผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยเอนไซม์โคตินเอส

ซึ่งวัตถุดิบ (โคตินจากเปลือกกุ้ง โคตินจากแกนหมึก และ เส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.20M1 ขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร) 3 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 30 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วเติมสารละลายบอเรทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 (ปลอดเชื้อ) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ในอัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์ 3 ส่วนต่อสารละลายตัวอย่าง 1 ส่วน ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลายบอเรทบัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 (ปลอดเชื้อ) ในอัตราส่วนของสารละลายบอเรทบัฟเฟอร์ 3 ส่วนต่อสารละลายตัวอย่าง 1 ส่วน บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน วิเคราะห์หาปริมาณโคตินโอลลิโกเมอร์ที่ได้ด้วยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข)

3.6.8 ศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านการเจริญในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส

นำกล้วยไม้ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ล้างบริเวณรากด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดอาหารเพาะเลี้ยงออกให้หมด จากนั้นแช่กล้วยไม้ในสารละลายโคตินโอลลิโกเมอร์ที่ความเจือจาง 1 เท่า 10 เท่า 50 เท่า 100 เท่า และ 1000 เท่า (โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นสารละลายควบคุม) เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วซบให้แห้งนำไปเพาะเลี้ยงในเรือนอนุบาลกล้วยไม้เป็นเวลา 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือนำไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สัปดาห์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงต่างๆ 2 สัปดาห์ โดยการถ่ายภาพ การนับจำนวนยอด จำนวน
ราก และ ความวิดยาวรากเกิดใหม่



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M1 บนอาหารวุ้น MYS และ SS

เลี้ยงเชื้อ *Monascus* sp. KB20M1 บนอาหารวุ้น MYS SS PDA และ GYP แบบ point inoculation ป้มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาลักษณะของโคโลนีและเส้นใย และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เวลาต่างๆ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ KB20M1 บนอาหารวุ้น MYS SS PDA และ GYP

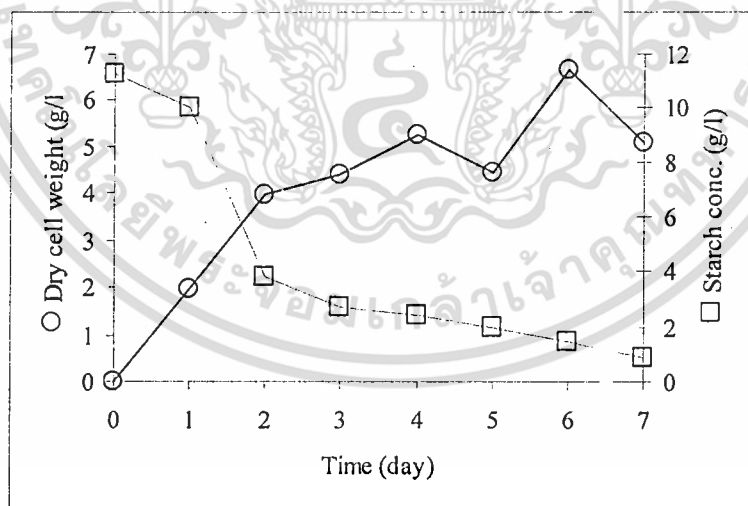
ระยะเวลา (วัน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) บนอาหารวุ้น			
	MYS	SS	PDA	GYP
1	0.4	0.4	0.4	0.4
2	1.2	0.5	0.6	0.5
3	1.9	0.8	1.1	1.0
4	2.5	1.2	1.5	1.4
5	2.8	1.7	2.2	1.9
6	3.1	2.2	2.8	2.4
7	3.6	2.9	3.4	2.9

ลักษณะการเจริญของเชื้อ *Monascus* sp. KB20M1 จะใกล้เคียงกับสายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 คือให้เส้นใยลักษณะฟูมาก สีขาว พบรอยพับตามแนวรัศมีรอบ ๆ โคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด ไม่พบการสร้างสารสีใด ๆ ทั้งในเส้นใยและในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังพบลักษณะการเจริญบนอาหารวุ้น GYP ที่แตกต่างไปจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ๆ และไม่พบในเชื้อราสายพันธุ์อื่น คือโคโลนีจะยกสูงขึ้นจากพื้นจานเพาะเชื้อ พบรอยพับตามแนวรัศมีรอบ ๆ โคโลนีได้เมื่อเชื้ออายุน้อย ๆ แต่เมื่ออายุมากขึ้นรอยพับดังกล่าวพบได้ชัดเจนในบริเวณใกล้ ๆ กับก้อนเชื้อเท่านั้น

เชื้อราหลายพันธุ์ KB20M1 สร้างเส้นใยลักษณะบอบบาง ยาวเรียว และแตกแขนง เป็นเส้นใยยาว ๆ จำนวนมาก ขนาดเส้นใยของเชื้อราแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอยู่ในช่วง 2-8 ไมครอน สำหรับการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ พบการสร้างโคนิเดียรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีรอยตัดที่ฐาน โคนิเดียผนังบาง ไม่มีสี จำนวนมาก โดยสร้างต่อกันเป็นลูกโซ่ ตั้งแต่ 1-12 โคนิเดีย สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้าง cleistothecium รูปร่างกลมได้ จำนวนมากกว่าสายพันธุ์อื่น และขนาดแตกต่างกันไปในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยวัดขนาดได้ 15-46 ไมครอน สามารถมองเห็น ascospore ที่บรรจุอยู่ภายใน

4.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว MYS medium

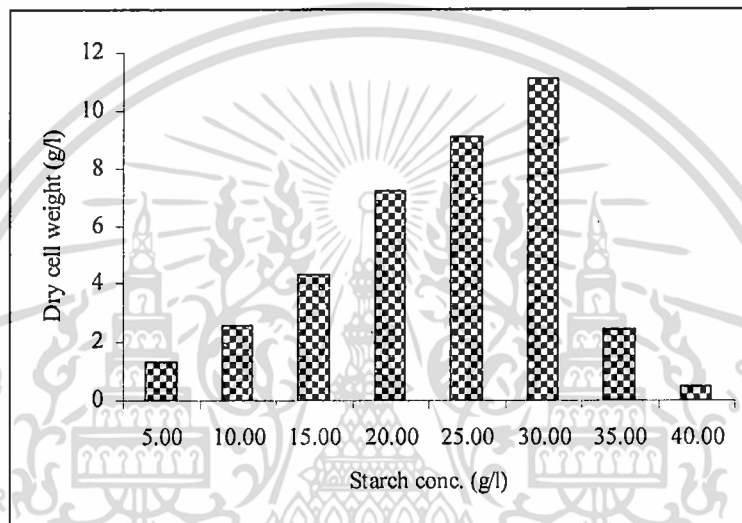
เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ในอาหารเหลว MYS medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 เจริญในลักษณะเพลเลทเป็นเส้นใยขนาดเล็กยาวสานกันไปมา และค่อยๆ เพิ่มปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งไปเรื่อยๆ จนกระทั่งได้ปริมาณสูงสุดในวันที่ 6 ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 6.8 กรัมต่อลิตร สามารถใช้แป้งได้ ทำให้แป้งเหลืออยู่เพียง 1.1 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M10 และปริมาณแป้ง ในอาหารเหลว MYS บน เครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.3 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในอาหารเหลว SS medium

เมื่อนำเชื้อ *Monascus* sp.KB20M1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลัง และแป้งถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน (ตามลำดับ) (SS medium) โดยแปรผันความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 5.0 ถึง 50.0 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 แสดงผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังต่อการเจริญ

การเจริญของเชื้อ *Monascus* sp.KB20M1 ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ปริมาณ 30.0 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้อาหารมีความหนืดสูง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเป็น 40.0 และ 50.0 กรัมต่อลิตร ทำให้การเจริญได้ปริมาณเส้นใยลดลง เนื่องจากความหนืดที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การแพร่ของออกซิเจนในอาหารเหลวลดลง นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังในอาหารเหลวยังส่งผลทางกายภาพต่อการฆ่าเชื้อของอาหารเหลว เพราะความหนืดที่เพิ่มขึ้นทำให้การเดือดของของเหลวเปลี่ยนแปลง และเกิดฟองง่ายขึ้น จึงเกิดการล้นของฟองไปเปื้อนจุกสำลี หรือฝาถังหมัก ซึ่งก่อให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ภายนอก แนวทางหนึ่งที่ใช้แก้ปัญหานี้จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ย่อยโมเลกุลแป้งเพื่อลดความยาวพอลิเมอร์ และความหนืด ทำให้การเกิดฟองลดลง ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในอาหารเหลว SS จำเป็นต้องนำแป้งมาย่อยด้วยเอนไซม์ Thermamy1 ที่อุณหภูมิ 75-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายแป้งไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ปริมาณ 30.0 – 60.0 กรัม

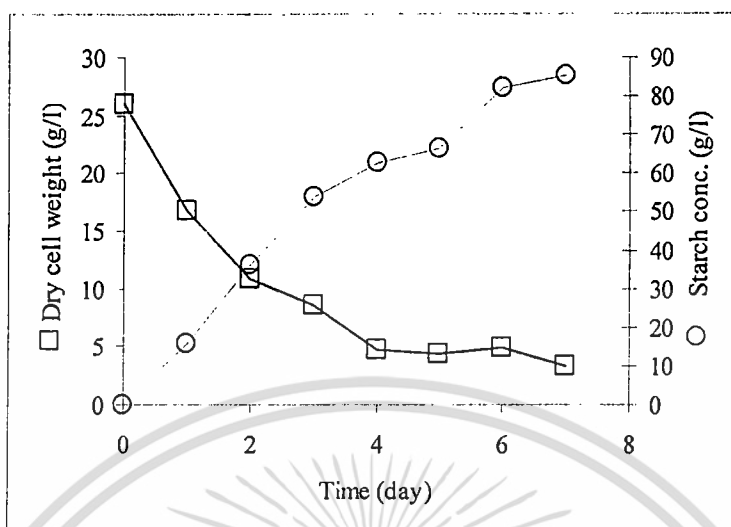
ต่อลิตร ผลการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ในอาหารเหลว SS ที่ปริมาณแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นต่างๆ แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อปริมาณน้ำหนักเซลล์ที่ได้

ปริมาณแป้ง (g/l)	ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังย่อย (g/l)		น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/l)
	ก่อนเลี้ยงเชื้อ (0 วัน)	หลังเลี้ยงเชื้อ (7 วัน)	
30.0	32.3	1.3	12.06
40.0	44.7	4.9	17.93
50.0	58.1	9.1	22.74
60.0	69.7	22.6	16.22

4.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อราโมแนสคัสในถังหมักขนาด 20 ลิตร

การเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ในถังหมักขนาด 20 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SS ที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังย่อย 7.0 เปอร์เซ็นต์ แป้งถั่วเหลือง 4.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ลิตร โดยผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิอาหารเหลวลดลงเป็น 28 องศาเซลเซียส จึงปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 7.0 จากนั้นจึงนำเชื้อเริ่มต้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในถังหมัก และเริ่มการเลี้ยงเชื้อในสภาวะอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.75 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยใช้ silicone เป็นสารกำจัดฟองที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.3

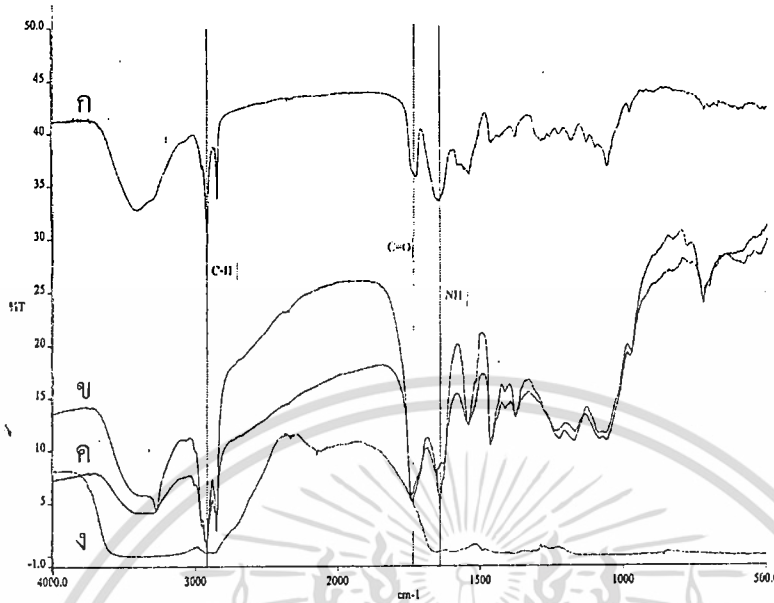


รูปที่ 4.3 การเจริญของเชื้อ *Monascus* sp. KB20M1 ในอาหารเหลว SS ด้วยถังหมักขนาด 20 ลิตร

4.5 การวิเคราะห์โครงสร้างไคตินไคโตซานในเส้นใยเชื้อรา

นำเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ไปใส่ในอาหารเหลว SS medium ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 3.0 เปอร์เซ็นต์ และแป้งถั่วเหลือง 5.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปรับพีเอช เริ่มต้นเป็น 7.0 และบรรจุอาหารปริมาณ 75 มิลลิลิตรในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหลือ ปริมาณไคตินและไคโตซานด้วยวิธี FTIR

นำเส้นใยเชื้อ *Monascus* sp. KB20M1 ที่ได้จากการเจริญในอาหารเหลว MYS มาศึกษาด้วยเครื่อง FTIR (ภาคผนวก ข) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเส้นใยในแง่ขององค์ประกอบของไคติน (หน่วยย่อย N-acetyl glucosamine) และ ไคโตซาน (หน่วยย่อย glucosamine) ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชันของอะมิทิล และ เอไมด์ ตามลำดับ การแสดงคุณสมบัติของเส้นใยซึ่งประกอบไปด้วยพอลิเมอร์ของไคติน หรือไคโตซาน สามารถกำหนดได้จากสัดส่วนหน่วยย่อยระหว่างหมู่ฟังก์ชัน (พื้นที่ใต้พีค) ในรูปของเปอร์เซ็นต์การกำจัดหมู่อะมิทิล (%DD) ดังแสดงในรูป 4.4



รูปที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างไคตินไคโตซานในเส้นใยเข็รธาด้วยเครื่อง FT-IR

ก. ไคติน (zigma)

ข. ไคตินจากเส้นใย *Monascus* sp.KB20M1

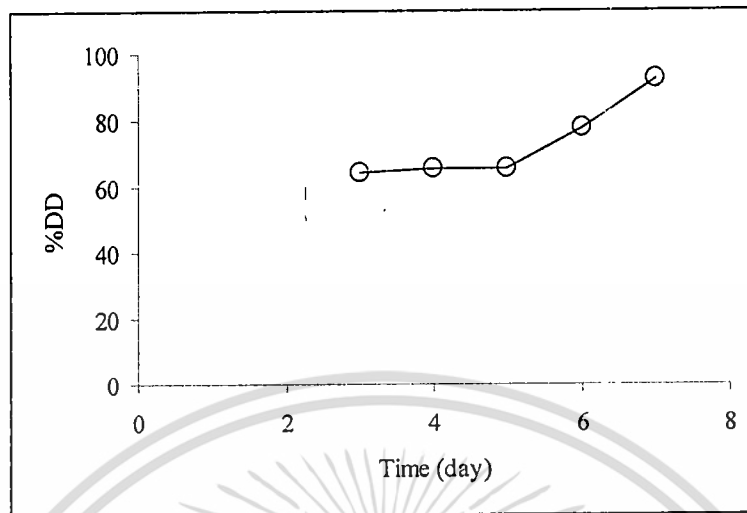
ค. ไคโตซาน (สยามไบโอเนต)

ง. ไคติน (สยามไบโอเนต)

การศึกษาโครงสร้างไคตินและไคโตซานในเส้นใยเข็รธา อาศัยเทคนิคฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรโกปี ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่พื้นที่ฟีก หรือ ความสูงของฟีกที่หมู่เอไมด์ I หรือ II เมื่อเทียบกับพื้นที่ฟีก หรือ ความสูงของฟีกที่คองที่ ได้แก่ ฟีกของหมู่คาร์บอกซิล หรือ ฟีกของวงแหวนไพราโนส Chatterjee และคณะ (2005) ศึกษาความเป็นไคตินไคโตซานที่สกัดจากเส้นใยเข็รธา *M. rouxii* ใช้ฟีกที่ 1557 cm^{-1} เป็นฟีกของหมู่เอไมด์ II และ 2900 cm^{-1} เป็นฟีกของหมู่คาร์บอกซิล พบว่าสารที่สกัดได้มีเปอร์เซ็นต์ดีดีมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่าสารที่สกัดได้เป็นไคโตซาน

จากการทดลองวิเคราะห์สารตัวอย่างที่สกัดจากเส้นใยเข็รธาทั้งสามชนิดดังรูปที่ 4.2 พบว่าฟีกที่ $1640\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ เป็นฟีกของหมู่เอไมด์ I และ $2920\text{-}2930\text{ cm}^{-1}$ เป็นฟีกของหมู่ไฮดรอกซิล เมื่อนำฟีกที่ได้มาเปรียบเทียบกัน พบว่า สารสกัดจากเส้นใยเข็รธา *Monascus* sp.KB20M1 ที่อายุ 3 4 5 6 และ 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์ดีดีเท่ากับ 64.28 65.38 65.11 77.54 และ 92.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อเข็รธามีอายุเพิ่มขึ้นเส้นใยเข็รธามีการเปลี่ยนแปลงเป็นไคโตซานมากขึ้น (รูปที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

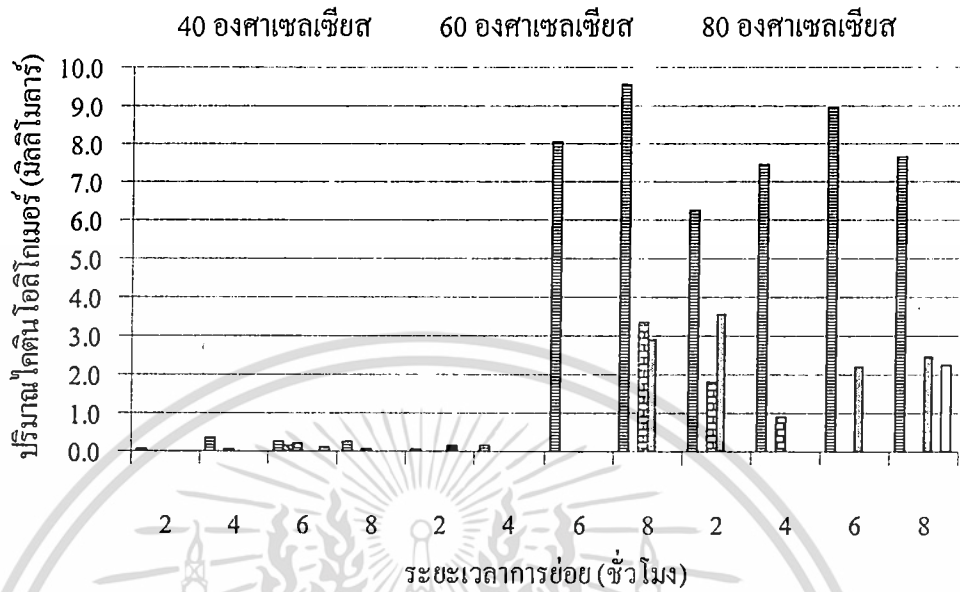


รูปที่ 4.5 แสดงคุณสมบัติของเส้นใยเชื้อ *Monascus* sp. KB20M1 ที่เวลาต่างๆ

4.6 ศึกษาการผลิตโคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

การผลิตโคตินโอลิโกเมอร์จากเปลือกกุ้ง โดยย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 การย่อยเปลือกกุ้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้เวลาย่อย 6 ชั่วโมงเหมาะสมที่สุด ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ปริมาณสูงและมีผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ เอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน (G1) 0.262 มิลลิโมลาร์ ไคโตไบโอส (G2) 0.130 มิลลิโมลาร์ ไคโตไทรโอส (G3) 0.218 มิลลิโมลาร์ และไคโตเฮกโซส (G6) 0.112 มิลลิโมลาร์ การย่อยเปลือกกุ้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อระยะเวลาการย่อยนานขึ้นปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้เพิ่มขึ้นดังรูปที่ 4.8 โดยช่วง 2 ถึง 4 ชั่วโมง มีผลิตภัณฑ์น้อยมาก ที่ระยะเวลาการย่อย 6 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียว คือ G1 8.050 มิลลิโมลาร์ และที่ 8 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 9.553 มิลลิโมลาร์ G3 3.328 มิลลิโมลาร์ และ G4 2.923 มิลลิโมลาร์ เพิ่มอุณหภูมิการย่อยเป็น 80 องศาเซลเซียส ช่วงระยะเวลาการย่อยต่างกันให้ผลิตภัณฑ์แตกต่างกัน ดังนี้ ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมงให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G3 และ G4 ในปริมาณสูงคือ 6.254 1.825 และ 3.529 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนการย่อยที่ 4 ชั่วโมงไม่พบ G4 แต่ G1 มีปริมาณสูงขึ้นในขณะที่ G3 ปริมาณลดลง ต่อมาที่ 6 ชั่วโมงมีปริมาณ G1 สูงสุดประมาณ 8.971 มิลลิโมลาร์ และมี G4 2.180 มิลลิโมลาร์ การย่อยเปลือกกุ้งนาน 8 ชั่วโมง มีปริมาณ G1 ลดลง แต่ G4 เพิ่มขึ้นเป็น 2.462 มิลลิโมลาร์ และมี G6 2.239 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

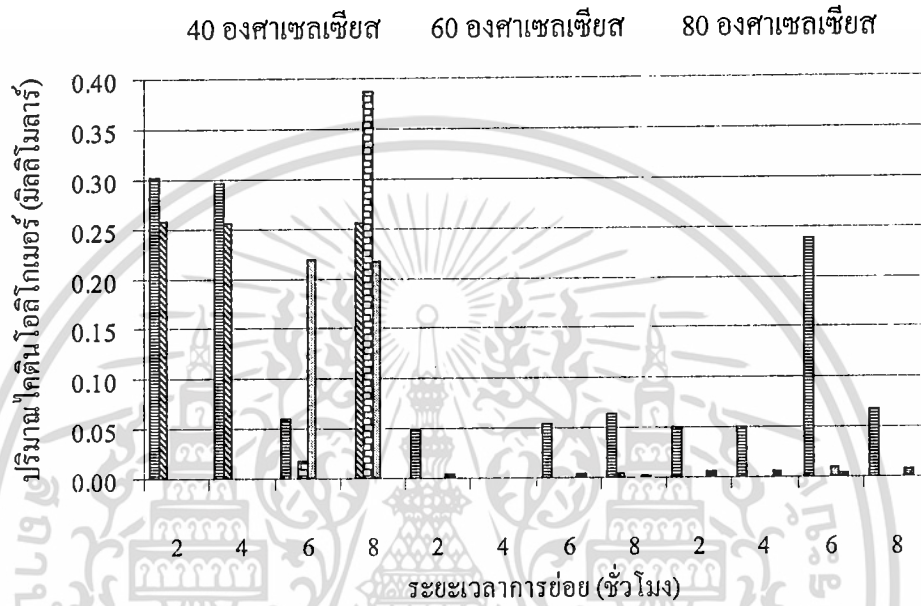


รูปที่ 4.6 ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากเปลือกกุ้ง ซึ่งย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

- เอ็นอะซิทิลกลูโคซามีน
- ไคโตไบโอส
- ไคโตไตรโอส
- ไคโตเตโตส
- ไคโตเพนโตส
- ไคโตเฮกโซส

การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ด้วยวิธีทางเคมี โดยย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ใช้อุณหภูมิ 40 60 และ 80 องศาเซลเซียส ได้ผล ดังรูปที่ 4.7 เมื่อใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลาการย่อย 2 และ 4 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G2 ในปริมาณใกล้เคียงกัน โดยมี G1 0.300 มิลลิโมลาร์ และ G2 0.250 มิลลิโมลาร์ แต่เมื่อระยะเวลาการย่อยผ่านไป 6 ชั่วโมง กลับไม่พบผลิตภัณฑ์ที่เป็น G2 และ G1 มีปริมาณลดลง เหลือเพียง 0.060 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบ G3 ในปริมาณเล็กน้อย ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณ มากที่สุดในช่วงเวลาการย่อย 6 ชั่วโมง ได้แก่ G4 มีปริมาณ 0.219 มิลลิโมลาร์ การย่อยชั่วโมงที่ 8 ไม่พบผลิตภัณฑ์ G1 แต่พบ G2 G3 และ G4 ในปริมาณสูงมีประมาณ 0.255 0.386 และ 0.217 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยที่ 8 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์ G3 ในปริมาณสูงสุด การย่อยเส้นใย *Monascus* sp.KB20M1 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์น้อยมากและที่ 4 ชั่วโมงไม่พบผลิตภัณฑ์ เมื่อการย่อยผ่านไป 6 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 0.054 มิลลิโมลาร์ และ G5 0.004 มิลลิโมลาร์ ในชั่วโมงที่ 8 ให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G2 และ G5 มีปริมาณ 0.064 0.003 และ 0.002 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เพิ่มอุณหภูมิการย่อย 80 องศาเซลเซียส ช่วง 2 ถึง 4 ชั่วโมงได้

ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G5 ซึ่งมีปริมาณเท่ากัน ได้แก่ 0.050 และ 0.005 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ต่อมาขยที่ 6 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 0.238 มิลลิโมลาร์ G4 0.009 มิลลิโมลาร์ และ G5 0.005 มิลลิโมลาร์ สำหรับการขยที่ 8 ชั่วโมงได้ผลิตภัณฑ์ G1 และ G5 ปริมาณน้อย



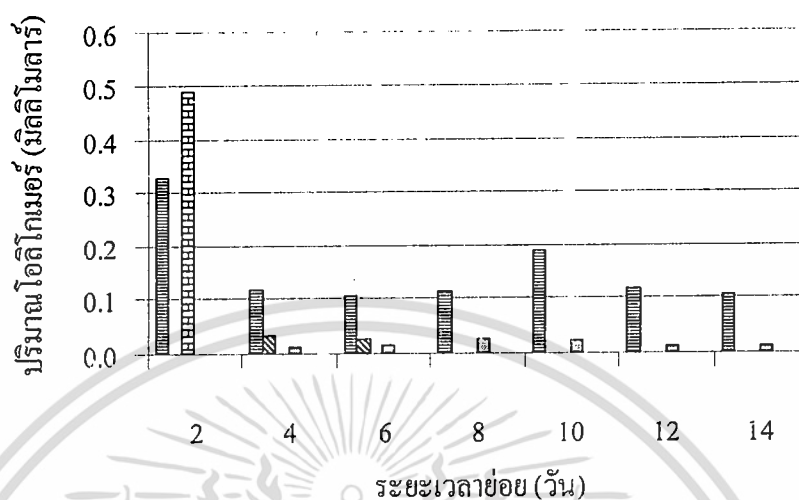
รูปที่ 4.7 ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากการขยเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

- เอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน
- ไคโตไบโอส
- ไคโตไตรโอส
- ไคโตเตโตส
- ไคโตเพนโตส
- ไคโตเฮกโซส

4.7 ศึกษาการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์ไคตินเนส

การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากเปลือกกุ้ง โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อเบอร์ 6.0 ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น G1 G2 G3 และ G4 ซึ่งในวันที่ 2 พบผลิตภัณฑ์ G1 0.329 มิลลิโมลาร์ และ G3 0.489 มิลลิโมลาร์ ต่อมาวันที่ 4 และ 6 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G2 และ G4 ในวันที่ 4 ปริมาณผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดสูงกว่าวันที่ 6 คือ 0.118 0.034 และ 0.132 มิลลิโมลาร์ ส่วนในวันที่ 8 ถึง 14 ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น G1 และ G4 มีปริมาณน้อยและแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.8

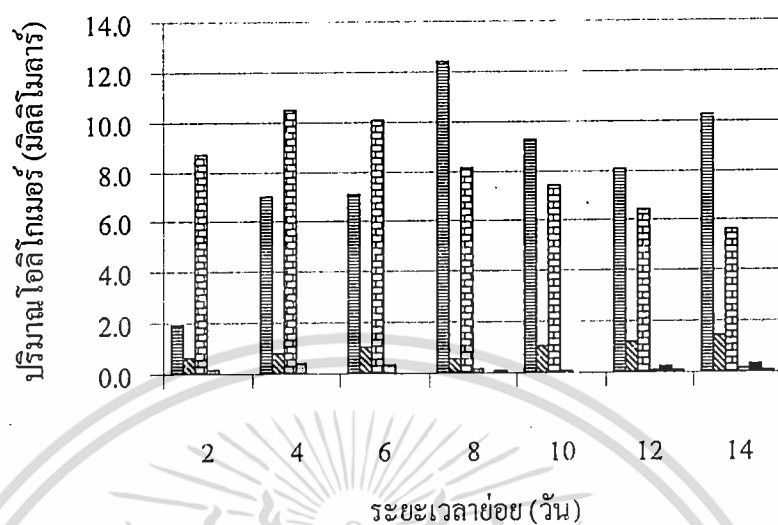
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากเปลือกกุ้งซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์ไคตินเนส

- | | | |
|---|--|--|
|  เอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน |  ไคโตไบโอส |  ไคโตไตรโอส |
|  ไคโตเตโตส |  ไคโตเพนโตส |  ไคโตเฮกโซส |

การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 โดยใช้เอนไซม์จากเชื้อเบอร์ 6.0 พบว่าใน 4 วันแรกได้ผลิตผลิตภัณฑ์เป็น G1 G2 G3 และ G4 ต่อมาในวันที่ 6 มี G5 เพิ่มมาเล็กน้อยประมาณ 0.040 มิลลิโมลาร์ แต่ไม่พบ G5 ในวันที่ 8 กลับพบว่ามี G6 เพิ่มมาแทน G5 และมีปริมาณ G1 สูงสุดประมาณ 12.378 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ G2 G3 และ G4 มีปริมาณลดลง ในวันที่ 10 ไม่พบทั้ง G5 และ G6 แต่ G2 มีปริมาณเพิ่มขึ้น ในขณะที่ G3 กับ G4 มีปริมาณลดลง ในช่วงวันที่ 12 ถึง 14 ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น G1 G2 G3 G4 G5 และ G6 ซึ่งพบว่าระยะเวลาการย่อยนานขึ้นปริมาณผลิตภัณฑ์ G4 G5 และ G6 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จาก *Monascus sp.KB20M1* ซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์ไคตินเนส

- | | | |
|-----------------------|------------|------------|
| เอ็นอะซิติกกลูโคซามีน | ไคโตไบโอส | ไคโตไตรโอส |
| ไคโตเตโตส | ไคโตเพนโตส | ไคโตเฮกไซส |

การย่อยสลายไคตินด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ พบว่า วัตถุประสงค์จากเปลือกกุ้งให้การย่อยสลายมากกว่าเส้นใยจากเชื้อ *Monascus sp.KB20M1* เนื่องจากองค์ประกอบของสายพอลิเมอร์ที่ต่างกัน ทำให้การย่อยสลายเปลือกกุ้งต้องใช้สภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่า (80 องศาเซลเซียส) ขณะที่เส้นใยจากเชื้อรา *Monascus sp.KB20M1* พบการย่อยสลายแม้ใช้อุณหภูมิต่ำ (เพียง 40 องศาเซลเซียส) แต่อย่างไรก็ตามการย่อยสลายวัตถุประสงค์ทั้ง 2 ชนิด (เปลือกกุ้ง และเส้นใยเชื้อ *Monascus sp.KB20M1*) ด้วยกรดฟอสฟอริก พบว่าผลิตภัณฑ์ไคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้นั้นมีความหลากหลาย และการย่อยสลายเป็นแบบสุ่ม จึงไม่สามารถคาดการณ์แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเมื่อย่อยสลายอุณหภูมิ และเวลา ที่นานขึ้น

การย่อยสลายทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์ไคตินเนส ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ (Krairak และ Budda, 2002; สมชาย และ ชีระพันธ์, 2549) พบว่าการย่อยสลายวัตถุประสงค์จากเปลือกกุ้งเป็นไปได้มากกว่าเส้นใยจากเชื้อ *Monascus sp.KB20M1* เนื่องจากองค์ประกอบของสายพอลิเมอร์ที่ต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมีโดยการใช้อัตรากรดฟอสฟอริก ขณะที่เส้นใยจากเชื้อรา *Monascus sp.KB20M1* พบการย่อยสลายเป็นไปอย่างรวดเร็ว และได้ผลิตภัณฑ์ที่ปริมาณสูงกว่า (ประมาณ 10 เท่า) ผลิตภัณฑ์ไคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคตินเนสส่วนใหญ่ประกอบด้วย ไคโตไตรโอส (G3) และมีเอ็นอะซิติกกลูโคซา

มีน (G1) และโคโตไบโอส (G2) เพียงเล็กน้อย แต่เมื่อระยะเวลาการย่อยสลายนานขึ้นพบว่าเอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน (G1) มีปริมาณเพิ่มขึ้น ขณะที่โคโตไทรโอส (G3) ค่อยๆ ลดลง ส่วนโคโตไบโอส (G2) ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง

ผลการทดลองการย่อยสลายเปลือกกุ้ง และเส้นใยเชื้อ *Monascus* sp.KB20M1 โดยวิธีทางเคมีด้วยกรดฟอสฟอริก และเอนไซม์ไคตินเนส เพื่อให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ไคติน โอลิโกเมอร์ จึงคัดเลือกสถานะที่ให้ผลิตภัณฑ์ในรูปของ 1.) เอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน (G1) (เป็นส่วนใหญ่) ใช้รหัส A1 2.) เอ็นอะซีทิลกลูโคซามีน (G1) ผสมกับโคโตไทรโอส (G3) (สัดส่วนเท่ากัน) โดยใช้รหัส A2 และ 3.) โคโตไทรโอส (G3) (เป็นส่วนใหญ่) โดยใช้รหัส A3 เพื่อนำมาทดสอบผลของไคติน โอลิโกเมอร์ต่อการออกฤทธิ์ในกล้วยไม้สกุลฟาแลนดอปซิสต่อไป

4.8 ศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคติน โอลิโกเมอร์ต่อการเจริญในกล้วยไม้สกุลฟาแลนดอปซิส

การผลิตไคติน โอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา พบว่าผลิตภัณฑ์มีหลายชนิด ดังนั้น เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคติน โอลิโกเมอร์ต่อการเจริญในกล้วยไม้สกุลฟาแลนดอปซิส ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีลักษณะพิเศษ โดยพบว่าถ้ายอดและใบเน่าเปื่อยเหลือแต่ตอ แต่ถ้าหากรากยังคงอยู่และทำหน้าที่ได้สมบูรณ์ ก็ส่งผลให้กล้วยไม้สกุลฟาแลนดอปซิสสามารถเจริญเติบโตต่อไป และแตกยอดและใบใหม่ได้ (ระพี, 2530) ผลิตภัณฑ์ไคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายเส้นใยเชื้อราด้วยเอนไซม์ไคตินเนส นำมาทดสอบกับกล้วยไม้ ได้แก่ สารละลาย A1 A2 และ A3 ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้

A1 เป็นผลิตภัณฑ์ไคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายเส้นใยเชื้อ *Monascus* sp. KB20M1 ด้วยเอนไซม์ไคตินเนส โดยผสมให้ย่อยสลายด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16 วัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นไคติน โอลิโกเมอร์ชนิด G1

A2 เป็นผลิตภัณฑ์ไคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายเส้นใยเชื้อ *Monascus* sp. KB20M1 ด้วยเอนไซม์ไคตินเนส โดยผสมให้ย่อยสลายด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 วัน ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นไคติน โอลิโกเมอร์ชนิด G1 และ G3 ในปริมาณใกล้เคียงกัน

A3 เป็นผลิตภัณฑ์โคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้จากการย่อยสลายเส้นใยเชื้อ *Monascus* sp. KB20M1 ด้วยเอนไซม์โคติเนส โดยผสมให้ย่อยสลายด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 วัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นโคติน โอลิโกเมอร์ ชนิด G3

4.8.1 การรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่ในกล้วยไม้สกุลฟาแลนดรอปซิส หลังจาก ให้โคติน โอลิโกเมอร์แล้วเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 10 สัปดาห์

จากการนำกล้วยไม้สกุลฟาแลนดรอปซิสจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาแช่ใน สารละลาย A1 A2 และ A3 ที่ความเจือจาง 0 10 50 100 และ 1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำลงกระถางเพาะเลี้ยงในเรือนอนุบาลกล้วยไม้อ่อนแล้วบันทึก ผลการทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์ วิธีวัดการเจริญของพืชนิยมบันทึกการเพิ่มขึ้นของใบ ยอด หรือ ราก แต่เนื่องจากกล้วยไม้เป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้า การนับจำนวนใบจึงไม่เหมาะสม ในเชิงปฏิบัติ ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงใช้วิธีวัดค่าความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ทั้งหมดในแต่ละต้น ซึ่งกล้วยไม้สกุลฟาแลนดรอปซิส อยู่ในสกุลที่มีรากขนาดใหญ่ และสามารถแตกหน่อเป็นต้นใหม่ได้ (สมศักดิ์, 2540) การวัดความยาวรากจึงสัมพันธ์กับการเจริญ เมื่อใช้ร่วมกับการสังเกตการแตก หน่อ และการเพิ่มขึ้นของจำนวนใบ สามารถใช้บ่งบอกการมีชีวิตรอดของต้นกล้วยไม้ได้ (Nge และคณะ, 2006) ผลทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย A1 A2 และ A3 ต่อ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากใหม่ของฟาแลนดรอปซิสแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ พบว่าการทดลองในกลุ่มควบคุม (แช่ต้นกล้วยไม้ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ) ให้ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่แตกต่างกันออกไป โดยไม่มีแนวโน้มทางใดทางหนึ่ง แต่เมื่อวิเคราะห์จากความยาวเฉลี่ยรากใหม่ที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 4.5) พบว่าระยะเวลาการแช่ในน้ำกลั่นนานขึ้นมีผลทำให้ค่าความยาวเฉลี่ยรากใหม่ที่เกิดขึ้นกลับ ลดลง อาจเป็นผลมาจากปริมาณน้ำที่รากกล้วยไม้ได้รับ แสดงว่าระยะเวลาการได้รับน้ำนานขึ้นมี ผลต่อการงอกรากใหม่อย่างชัดเจน ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อารรอดชีวิตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนดรอปซิส ด้วย (มิตเตอร์ เอ็ม, 2514; มังกร, 2545) ขณะที่กลุ่มการทดลองแช่ต้นกล้วยไม้ในสารละลาย A1 ที่ระดับความเจือจาง 10 เท่า พบว่าระยะเวลาแช่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การรอดชีวิต และการงอกราก ใหม่ลดลงตามลำดับ โดยไม่มีช่วงเวลาใดที่การรอดชีวิต และการงอกรากใหม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ พบว่าให้ผลไปในทางเดียวกัน ซึ่งความยาวเฉลี่ยรากเกิด ใหม่ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าระยะเวลาที่ต้นกล้วยไม้ได้รับสารนานขึ้น มีผลยับยั้ง การงอกรากใหม่ และส่งผลกระทบต่อารรอดชีวิตด้วย ที่ระดับความเจือจาง 50 เท่า พบว่าแช่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาดูงาน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ 3 ชั่วโมง ให้ผลการรอดชีวิตและการงอกรากใหม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ 6 ชั่วโมง เริ่มลดลง และตายหมดในชั่วโมงที่ 9 เมื่อวิเคราะห์ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ พบว่าให้ผลไปในทางเดียวกัน แสดงว่าการแช่สารละลายเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ต้นกล้วยไม้ได้รับสารเพียงพอ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการงอกรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ระดับความเงือจาง 100 เท่า พบว่าทุกช่วงเวลาแช่ (3 ถึง 9 ชั่วโมง) มีผลทำให้การรอดชีวิตและการงอกรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นที่ 9 ชั่วโมง การงอกรากใหม่ กลับลดลงเหลือเพียง 66.69 เปอร์เซ็นต์ และความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาแช่ จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 9 จึงลดลง อาจเป็นเพราะต้นกล้วยไม้ได้รับสารมากเกินไป ส่วนที่ระดับความเงือจาง 1000 เท่า พบว่า การแช่ต้นกล้วยไม้ในสารละลายนาน 3 และ 6 ชั่วโมง ให้ผลการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การงอกรากใหม่ของต้นที่แช่ 3 ชั่วโมง เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ต้นที่แช่ 6 ชั่วโมง กลับลดลง ตรงกันข้ามกับต้นที่แช่ 9 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลการรอดชีวิตเพียง 66.67 เปอร์เซ็นต์ แต่มีการงอกรากใหม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาพิจารณาความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ พบว่าเมื่อระยะเวลาแช่เพิ่มขึ้นความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่กลับลดลง แสดงว่าปริมาณน้ำที่อยู่ในสารละลาย ส่งผลให้กล้วยไม้ได้รับน้ำมากเกินไป อาจยับยั้งการงอกรากใหม่ และมีผลต่อการรอดชีวิต

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพีซิส เมื่อนำไปแช่สารละลาย A1 A2 และ A3 ที่ระดับความเงือจาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

ค่าเงือจาง (เท่า)	ชุดควบคุม (0)	ระยะเวลาแช่ใน A1 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน A2 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน A3 (ชั่วโมง)		
		3	6	9	3	6	9	3	6	9
0	60.00	66.67	100	33.33	66.67	100	33.33	66.67	100	33.33
10		66.67	33.33	33.33	0	33.33	66.67	0	0	0
50		100	66.67	0	33.33	100	100	100	66.67	33.33
100		100	100	100	100	100	100	100	100	100
1000		100	100	66.67	100	100	100	100	100	33.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การเกิดรากใหม่ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส เมื่อนำไปแช่สารละลาย A1 A2 และ A3 ที่ระดับความเงือก 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

ค่าเงือก จาง (เท่า)	ชุด ควบคุม 0	ระยะเวลาแช่ใน A1 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน A2 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน A3 (ชั่วโมง)		
		3	6	9	3	6	9	3	6	9
		0	33.33	66.67	66.67	33.33	66.67	66.67	33.33	66.67
10		66.67	33.33	33.33	0	0	33.33	0	0	0
50		100	33.33	0	33.33	100	66.67	100	100	33.33
100		100	100	66.67	66.67	100	66.67	33.33	100	100
1000		100	66.67	100	100	100	100	100	100	33.33

ตารางที่ 4.5 ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส เมื่อนำไปแช่สารละลาย A1 A2 และ A3 ที่ระดับความเงือก 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

ค่าเงือก จาง (เท่า)	ชุด ควบคุม 0	ระยะเวลาแช่ใน A1 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน A2 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน A3 (ชั่วโมง)		
		3	6	9	3	6	9	3	6	9
		0	15.0	43.3	31.3	9.3	43.3	31.3	9.3	43.3
10		8.0	2.7	0	0	0	4.3	0	0	0
50		56.3	10.0	0	17.7	27.7	10.0	29.0	36.7	0
100		44.3	74.3	35.7	45.3	56.3	10.7	41.0	56.0	59.0
1000		69.0	55.7	46.0	94.0	52.0	45.7	78.3	51.7	17.0

ทดลองแช่ต้นกล้วยไม้ในสารละลาย A2 ที่ระดับความเงือก 10 เท่า พบว่า ต้นกล้วยไม้ที่แช่สารนาน 3 ชั่วโมง กล้วยไม้ตายหมด ในขณะที่ 6 และ 9 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ตามลำดับ แต่ ไม่พบการงอกรากใหม่ที่ 6 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ความยาวเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รากเกิดใหม่ของต้นที่แช่สาร 9 ชั่วโมง พบว่าให้ผลการทดลองใกล้เคียงกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากต้นกล้วยไม้ได้รับสารมากเกินไป จึงยับยั้งการงอกรากใหม่ ที่ระดับความเงือก 50 เท่า เมื่อเพิ่มเวลาแช่ ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการงอกรากใหม่เพิ่มขึ้นถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 9 ชั่วโมง การงอกรากใหม่กลับลดลง ซึ่งเป็นในทำนองเดียวกับความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ อาจเป็นเพราะแช่ต้นกล้วยไม้ในสารละลายนานเกินไป ขณะที่ระดับความเงือก 100 เท่า พบว่าการแช่สารละลายที่เวลาต่างๆ (3 ถึง 9 ชั่วโมง) ให้ผลการรอดชีวิตเท่ากัน (100 เปอร์เซ็นต์) แต่การงอกรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ พบเพียงต้นที่แช่สารนาน 6 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาแช่ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่เพิ่มขึ้น จนกระทั่งชั่วโมงที่ 9 ความยาวรากเฉลี่ยกลับลดลง แสดงว่าที่ 6 ชั่วโมง ต้นกล้วยไม้ได้รับสารเพียงพอ จึงส่งผลให้การรอดชีวิต และการงอกรากใหม่สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่สูงกว่าที่ 3 และ 9 ชั่วโมง ที่ระดับความเงือก 1000 เท่า พบว่า การแช่สารที่เวลา 3 ถึง 9 ชั่วโมง ให้ผลการรอดชีวิต และการงอกรากใหม่เท่ากัน (100 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าที่ความเงือก 1000 เท่า เหมาะสมต่อการดูดซับสารของต้นกล้วยไม้ แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ พบว่า เมื่อเวลาแช่เพิ่มขึ้น กลับมีผลทำให้ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ลดลง อาจเป็นเพราะปริมาณน้ำที่กล้วยไม้ได้รับมากเกินไป จึงมีผลยับยั้งการยืดตัวของราก (ตารางที่ 4.3 – 4.5)

กลุ่มการทดลองแช่ต้นกล้วยไม้ในสารละลาย A3 ที่ระดับความเงือก 10 เท่า ทุกช่วงเวลากการได้รับสาร (3-9 ชั่วโมง) ทำให้กล้วยไม้ตาย อาจเนื่องมาจากกล้วยไม้ดูดซับสารที่อยู่ในสารละลาย A3 มากเกินไป จึงส่งผลยับยั้งการเจริญ ส่วนที่ระดับความเงือก 50 เท่า พบว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่ลดลง ตามระยะเวลาการแช่สารละลายที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะการแช่สารละลายเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ต้นกล้วยไม้ได้รับสารเพียงพอจึงให้การเจริญ และการงอกรากใหม่สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มเวลาการแช่เป็น 6 และ 9 ชั่วโมง พบว่า มีการรอดชีวิต และการงอกรากใหม่ลดลง ตามลำดับ เนื่องจากได้รับสารมากเกินไป ที่ระดับความเงือก 100 เท่า พบว่า การแช่สารละลายที่ระยะเวลาต่างๆ (3-9 ชั่วโมง) ให้ผลการรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่เท่ากัน (100 เปอร์เซ็นต์) แสดงว่าที่ความเงือก 100 เท่า นี้ เหมาะสมต่อการดูดซับของต้นกล้วยไม้ แต่เมื่อพิจารณาจากข้อมูลความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ พบว่า ความยาวรากเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับสาร จาก 3 6 และ 9 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความยาวรากมีความไวต่อปริมาณการได้รับสาร ส่วนกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารละลาย A3 ที่ความเงือก 1000 เท่า ที่ระยะเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง ให้การรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ความยาวรากเฉลี่ยกลับมีค่าลดลงจาก 78.3 มิลลิเมตร เป็น 51.7 มิลลิเมตร แสดงว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาการได้รับสาร 3 ชั่วโมง ดีที่สุด แต่เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 5 ชั่วโมง พบความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ลดลง อาจเป็นผลจากการได้รับน้ำเข้ามาในต้นกล้วยไม้ ซึ่งจะเห็นผลชัดขึ้นเมื่อได้รับสารเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ทำให้การรอดชีวิตและการเกิดรากใหม่มีเปอร์เซ็นต์ลดลง สอดคล้องกับความยาวเฉลี่ยของรากเกิดใหม่ที่มีค่าต่ำสุดในกลุ่มการทดลองนี้

ผลเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้หลังแช่สารละลาย A1 แล้วเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ พบว่าสถานะที่มีผลทำให้กล้วยไม้เจริญดีที่สุด คือต้นที่แช่สารละลาย A1 ความเงือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง แต่การเจริญในสถานะนี้ไม่มีความแตกต่างจากกล้วยไม้ที่แช่ในความเงือจาง 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง และ ความเงือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง นอกจากนี้การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ที่แช่สารละลาย A1 ความเงือจาง 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง และ ความเงือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง ยังมีการเจริญที่ไม่มีความแตกต่างจากต้นที่แช่ ในความเงือจาง 100 เท่า นาน 3 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.6) ส่วนกลุ่มทดลองที่ 2 ซึ่งแช่ในสารละลาย A2 พบว่าต้นที่แช่สารละลายความเงือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง เจริญเติบโตได้ดีที่สุด ซึ่งมีผลการเจริญที่มีความแตกต่างจากต้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญในเชิงสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$) การเจริญของต้นที่แช่สารละลาย A2 ความเงือจาง 50 เท่า นาน 6 ชั่วโมง ไม่แตกต่างจากการเจริญของชุดควบคุม การเจริญเติบโตของต้นที่แช่สารละลาย A2 ความเงือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง ที่ความเงือจาง 1000 เท่า นาน 6 ชั่วโมง และความเงือจาง 1000 เท่า นาน 9 ชั่วโมง มีผลการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.6) และกลุ่มสุดท้ายซึ่งทดลองในสารละลาย A3 พบว่ากล้วยไม้ที่แช่ในสารละลาย A3 ความเงือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด ดังตารางที่ 4.6 โดยแตกต่างจากต้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญในเชิงสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$) ส่วนการแช่ที่ความเงือจาง 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง มีการเจริญที่ไม่แตกต่างจากต้นควบคุม แต่การแช่ที่ความเงือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง ความเงือจาง 100 เท่า นาน 9 ชั่วโมง และ ความเงือจาง 1000 เท่า นาน 6 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนออฟซิส ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปแช่สารละลาย A1 A2 และ A3 ที่ระดับความเจือจาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

สภาวะการให้ไคตินโอติโกเมอร์	ค่าเฉลี่ยความยาวรากเกิดใหม่โดยรวม (มิลลิเมตร)
ชุดควบคุม	15.00 ^c
A1 เจือจาง 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	56.33 ^{bc}
A1 เจือจาง 100 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	44.33 ^{bcd}
A1 เจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	74.33 ^{ab}
A1 เจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	69.00 ^{ab}
A2 เจือจาง 50 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	27.67 ^{cd}
A2 เจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	56.33 ^{bc}
A2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	94.00 ^{a*}
A2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	52.00 ^{bc}
A2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 9 ชั่วโมง	45.67 ^{bcd}
A3 เจือจาง 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	29.00 ^{cd}
A3 เจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	56.00 ^{bc}
A3 เจือจาง 100 เท่า นาน 9 ชั่วโมง	59.00 ^{abc}
A3 เจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	78.00 ^{ab}
A3 เจือจาง 1000 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	51.67 ^{bc}

หมายเหตุ a* เป็นค่าสูงสุดที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Duncan multiple range test (p<0.05)

ตัวอักษรเหมือนกัน คือ การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน คือ การเจริญเติบโตของกล้วยไม้มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการทดลองพบว่ากล้วยไม้ที่ผ่านการแช่ A2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตสูงสุด ซึ่ง A2 ประกอบด้วยไคตินโอลิโกเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ G1 และ G3 ในปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วน A3 มีเพียงไคตินโอลิโกเมอร์ชนิด G3 อย่างเดียวเท่านั้น และ A1 มีไคตินโอลิโกเมอร์ชนิด G1 กับ G5 แต่มี G5 ในปริมาณที่น้อยมากเมื่อถูกเจือจาง G5 อาจไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ หรือ มีผลน้อยมาก ดังนั้นการที่ A2 สามารถกระตุ้นให้กล้วยไม้เจริญเติบโตได้ดี เนื่องมาจากการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินโอลิโกเมอร์ชนิด G1 และ G3 ฤทธิ์เสริมกัน ในทำนองเดียวกันงานวิจัยของ Khan และคณะ (2003) พบว่าไคโตซาน และไคตินโอลิโกเมอร์ มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส และเอนไซม์ไทโรซีนแอมโมเนียไลเอส ในใบกล้วยไม้ความเจือจาง 1000 เท่า อาจอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินโอลิโกเมอร์ โดยมีงานวิจัยหลายฉบับความเข้มข้นไคตินไคโตซานที่ระดับต่างๆ สามารถออกฤทธิ์ได้ดีกว่าความเข้มข้นระดับสูง เช่น งานวิจัยของ เกศนรี (2544) ศึกษาผลของไคโตซานต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส และชักนำการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส และเบต้า-1,3-กลูคาเนส ในองุ่น พบว่าไคโตซานที่มีความเข้มข้น 3200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิห้อง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนส และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส และเบต้า-1,3-กลูคาเนส ในองุ่นได้ Tham และคณะ (2001) ศึกษาการใช้ไคโตซานที่ผ่านการฉายรังสีใส่ในอาหารเพาะต้นกล้า โดยใช้ความเข้มข้น 100-200 ppm มีผลทำให้ต้นกล้าข้าว และกล้าข้าวสาลีมีการเจริญเติบโตดีขึ้น และทนต่อพิษของสารวานาเดียม ซึ่งปล่อยมาจากโรงงานอุตสาหกรรม และเหมืองแร่ถ่านหิน นอกจากนี้ Sharathchandra และคณะ (2004) ศึกษาผลของไคโตซานที่มีชื่อทางการค้าว่า Elexa โดยใช้อัตราส่วนของสาร Elexa 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 19 ส่วน แช่เมล็ดข้าวฟ่างนาน 6 ชั่วโมง ทำให้เมล็ดข้าวฟ่างมีการงอก และหน่อแข็งแรงมากขึ้น นอกจากนี้ยังกระตุ้นความสามารถในการต้านทานโรคด้วย

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS SS PDA และ GYP พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น MYS และ PDA ขณะที่ให้การเจริญลดลงเล็กน้อยในอาหารวุ้น SS และ GYP โดยให้ลักษณะเส้นใยมีฟู สีขาว เมื่ออายุประมาณ 7 วัน จะเริ่มเกิดรอยหยักคลี่ออกตามแนวรัศมีของโคโลนี ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เส้นใยมีลักษณะบาง ยาวเรียว และแตกแขนงเป็นเส้นยาวจำนวนมาก มีการสร้างโคนินเดียรูปร่างกลม หรือไข่ โคนินเดียถูกสร้างต่อกันเป็นลูกโซ่ ตั้งแต่ 1 ถึง 12 โคนินเดีย

เมื่อศึกษาการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว MYS medium บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 มีการเจริญเป็นลักษณะของเพดเลทที่เป็นเส้นใยขนาดเล็กยาวสานกัน ไปมา มีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 6 ประมาณ 6.8 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังอย่างรวดเร็วในช่วง 2-3 วันแรก และค่อยๆ ลดลงช้าจนกระทั่งวันที่ 7 มีปริมาณแป้งเหลืออยู่เพียง 1.1 กรัมต่อลิตร เมื่อเปลี่ยนมาใช้อาหารเหลว SS พบว่าความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังที่ 30 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเส้นใยสูงที่สุด (11.23 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นเป็น 35 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อราให้การเจริญลดลงเนื่องจากความหนืดของแป้งสูงขึ้น แต่เมื่อใช้เอนไซม์ Thermamyl ย่อยสลายแป้งแล้วจึงนำไปเตรียมเป็นอาหารเหลว พบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ดีขึ้น (22.74 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเป็น 50 กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังมากไปกว่านี้ (60 กรัมต่อลิตร) กลับทำให้เชื้อราเจริญลดลง อาจเป็นผลเนื่องมาจากข้อจำกัดความต้องการออกซิเจนต่อการเจริญ การเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 20 ลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อราให้การเจริญและสร้างเส้นใยได้ถึง 27.8 กรัมต่อลิตร โดยที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังเหลือเพียง 9.89 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเจริญ

การวิเคราะห์โครงสร้างไคตินและโคโตซานในเส้นใยเชื้อรา พบว่า เส้นใยเชื้อราทั้งสามชนิดให้พีคของหมู่เอไมด์ I ในช่วง 1640-1660 cm^{-1} และพีคของหมู่ไฮดรอกซิลที่ช่วง 2920-2930 cm^{-1} แสดงว่าเส้นใยเชื้อราทั้งสามชนิดมีไคตินโคโตซานเป็นองค์ประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดลองใช้เปลือกกุ้งเป็นวัตถุดิบ การย่อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์โคตินโอลลิโกเมอร์ชนิด G1 ย่อยนาน 4 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G3 ย่อยที่ 6 ชั่วโมง ได้เป็น G1 G2 G3 และ G6 ส่วนที่ 8 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G3 การย่อยเปลือกกุ้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาย่อย 2 และ 4 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์โคตินโอลลิโกเมอร์น้อยมาก การย่อยที่ 6 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และที่ 8 ชั่วโมง ได้ G1 G3 และ G4 เพิ่มอุณหภูมิการย่อยเป็น 80 องศาเซลเซียส ย่อยนาน 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G3 และ G4 ย่อย 4 ชั่วโมง ได้เป็น G1 และ G3 ที่ 6 ชั่วโมง ได้ G1 และ G4 ที่ 8 ชั่วโมง ได้ G1 G4 และ G6 ส่วนการใช้เส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 เป็นวัตถุดิบ เมื่อย่อยสลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 และ 4 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G2 ที่ 6 ชั่วโมง ได้เป็น G1 G3 และ G4 ที่เวลาการย่อย 8 ชั่วโมง ได้เป็น G2 G3 และ G4 การย่อยเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาย่อย 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G5 การย่อยที่ 4 ชั่วโมง ไม่พบผลิตภัณฑ์ เมื่อย่อยที่ 6 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G5 เพิ่มเวลาการย่อยเป็น 8 ชั่วโมง ได้โคตินโอลลิโกเมอร์ชนิด G1 G2 และ G5 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ใช้เวลาการย่อยนาน 2 และ 4 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G5 ย่อยนาน 6 ชั่วโมง ได้เป็น G1 G4 และ G5 ส่วนการย่อยที่ 8 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G5

การผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางชีวภาพโดยการย่อยด้วยเอนไซม์โคติเนส ในสภาวะการผสมสารละลายบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้เปลือกกุ้งเป็นวัตถุดิบในการผลิตโคตินโอลลิโกเมอร์ ใช้เวลาการย่อย 2 วัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G3 การย่อยวันที่ 4 และ 6 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G2 และ G4 ส่วนการย่อยในวันที่ 8 ถึง 14 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G4 การใช้เส้นใย *Monascus* sp.KB20M1 เป็นวัตถุดิบ พบว่าการย่อยในวันที่ 2 4 6 และ 10 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G2 G3 และ G4 ในวันที่ 8 ได้เป็น G1 G2 G3 G4 และ G6 การย่อยในวันที่ 14 ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G2 G3 G4 G5 และ G6

ผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโคตินโอลลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา ต่อการเจริญเติบโตในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส พบว่า กล้วยไม้ที่มีการรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ กลุ่ม 1. ต้นที่แช่ A1 เจือจาง 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง แช่ A1 เจือจาง 100 เท่า นาน 3 ชั่วโมง แช่ A1 เจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง และ แช่ A1 เจือจาง 1000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่านั้น 3 ชั่วโมง กลุ่มที่ 2. ต้นที่แช่ A2 เจือจาง 50 เท่านั้น 6 ชั่วโมง แช่ A2 เจือจาง 100 เท่านั้น 6 ชั่วโมง แช่ A2 เจือจาง 1000 เท่านั้น 3 ชั่วโมง แช่ A2 เจือจาง 1000 เท่านั้น 6 ชั่วโมง แช่ A2 เจือจาง 1000 เท่านั้น 9 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 3. ต้นที่แช่ A3 เจือจาง 50 เท่านั้น 3 ชั่วโมง แช่ A3 เจือจาง 100 เท่านั้น 6 ชั่วโมง แช่ A3 เจือจาง 1000 เท่านั้น 9 ชั่วโมง แช่ด้วย A3 เจือจาง 1000 เท่านั้น 3 ชั่วโมง แช่ด้วย A3 เจือจาง 1000 เท่านั้น 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของกล้วยไม้กลุ่มที่ 1 พบว่าต้นที่แช่ระดับความเจือจาง 100 เท่านั้น 6 ชั่วโมง ให้การเจริญเติบโตดีที่สุด ส่วนการเจริญเติบโตของกล้วยไม้กลุ่มที่ 2. พบว่าต้นที่แช่ระดับความเจือจาง 1000 เท่านั้น 3 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตดีที่สุด สำหรับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้กลุ่มที่ 3 พบว่าต้นที่แช่ระดับความเจือจาง 1000 เท่านั้น 3 ชั่วโมง ให้การเจริญเติบโตดีที่สุด เมื่อนำกล้วยไม้ที่มีการรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ พบว่า ต้นที่แช่ A2 เจือจาง 1000 เท่านั้น 3 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$)

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะการเลี้ยงเชื้อราเพื่อให้ได้เส้นใยที่ระยะเวลาต่างๆ ต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โคตินเนสชนิดอื่นๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์โคติน โอลิโกเมอร์ชนิดอื่นๆ ตามความจำเป็นของเอนไซม์ที่นำมาใช้ย่อยสลาย
2. ควรศึกษาผลของโคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้จากเส้นใยเชื้อรา ต่อการเจริญเติบโต และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันตนเองในพืช
3. ควรศึกษาการเพิ่มกำลังการผลิตเส้นใยเชื้อรา และการผลิตโคติน โอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- เกศนรี จงโชติศิริกุล. 2544. “การศึกษาผลของไคโตซานต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนส และการชักนำการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในองุ่น.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นันทนา นิ่มเจริญนิคม. 2542. “การผลิตและการทำไคตินคืออะเซทิลเลตสจาก *Rhizopus oligosporus*. NSI ให้บริสุทธิ์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- บุษบา ยงสมิทธิ์ และวรรณภา ทาบโลกา. 2528. สีสผสมอาหารจากมันสำปะหลังโดยเชื้อราโมแนสคัส. วารสารวิทยาศาสตร์, มก. 19 : 45-50.
- บุษบา ยงสมิทธิ์, วิเชียร ยงมานิตชัย, สนทนา แสงจันทร์ และ ชุติ ชัยศรีสุข. 2531. การผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลังเพื่ออุตสาหกรรมหมัก. รายงานการวิจัยเสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 225 น.
- พิมพ์ทิพย์ โภชนะวิทย์. 2542. “การผลิตและคุณสมบัติของไคโตซานจากจุลินทรีย์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มังกร โลหะอุดม. 2545. การเลี้ยงกล้วยไม้เป็นงานอดิเรก. หน้า 16-18 ใน วารสารความสุขฉบับกล้วยไม้. กรุงเทพฯ : สมาคมกล้วยไม้ไทย.
- มิสเตอร์ เอ็ม. 2514. ว่ากันถึงฟาเลนออฟซิส. หน้า 29-32. ใน วารสารกล้วยไม้ฉบับปฐมฤกษ์. ชลบุรี : สมาคมกล้วยไม้ชลบุรี.
- รัฐ พิษญากร. 2544. “การตัดไคตินและไคโตซานโดยเอนไซม์.” หน้า 41-51. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซาน จากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ระพี ศาคริก. 2530. กล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ช่องนนทรี.

- สมชาย ไกรรักษ์ และ ชีระพันธ์ เจริญสาคร. 2549. การผลิตเอ็น-อะซิติลกลูโคซามีน และไคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคติน. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 44. 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2549. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, บางเขน. 380-390.
- สุวบุญ จิรชาญชัย และคณะ. 2544. “สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคติน-ไคโตซาน.” หน้า 11-40. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซาน จากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อังคณา โทการกุล. 2540. “การแยกเชื้อยีสต์ที่มีเอ็นไซม์ไคตินดีอะเซทิลเลส.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Agrawal, G.H., Rakwal, R., Tamogami, S., Yonekura, M., Kubo, A. and Saji, H. 2002. “Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedling.” *Plant Physiology and Biochemistry*. 40(1) : 1061-1069.
- Aly, M.R.E., Ibrahim, E.S.I., Ashry, E.S.H.E. and Schmidt, R.R. 2001. “Synthesis of chitotetraose and chitohexaose based on dimethylmaleoyl protection.” *Carbohydrate Research*. 331(1) : 129-142.
- Bartnicki, G.S. 1968. Cell wall chemistry. *Ann. Rev. Microbiol.* 22 : 87-108.
- Biagini, G., Muzzarelli, R.A.A., Giardino, R. and Castaldini, C. 1991. Biological materials for wound healing. pp16-24. . In *Advances in Chitin and Chitosan*. Brine, C.J., Sandford, P.A. and Zikakis, J.P. (eds.). Elsevier Applied Science. London. England. 675.
- Chang, K.B., Lee, J. and Fu, W.R. 2000. HPLC analysis fo N-acetyl-chito-oligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin. *J. Food and Drug Analysis*. 8(2): 75-83.
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K. and Chatterjee, B.P. 2005. “Chitosan from *Mucor rouxii* : production and physico-chemical characterization.” *Process Biochemistry*. 40(1) : 395-400.

- Chirachanchi, S. and R. Yokan. 2002. Structural Characterization of γ -Ray Irradiated Chitisan. p. 18. in 5th Asia Pacific Chitin-Chitosan Symposium and Exhibition. Bangkok. Nation Metal and Material Technology Center.
- Choi, W.S., K.J. Ahn, D.W. Lee, M.W. Byun and H.J. Park. 2002. Preparation of chitosan oligomers by irradiation. *Polymer Degradation and Stability* 78; 533–538.
- Fritzemeier, K. H., and Kindl, H. 1981. Coordinate induction by UV light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of Vitaceae. *Planta* 151:48-52.
- Fukamizo, T., Minematsu, T., Yanase, Y., Hayashi, K. and Goto, S. 1986. "Substrate size dependence of lysozyme-catalyzed reaction." *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 250(2) : 312-321.
- Herrera, J.R., Herrera, R. and Herrera, R. 1991. *Fungal Cell Wall: Structure, Synthesis, and Assembly*. CRC Press. pp. 256.
- Houston, D.R., Shiomi, K., Arai, Omura, S., Peter, M.G., Turberg, A., Synstad, B., Eijsink, V.G.H. and Aalten, D.M.F. 2002. "High-resolution structures of a chitinase complexed with natural product cyclopentapeptide inhibitors : Mimicry of carbohydrate substrate." *PNAS*. 99(14) : 9127-9132.
- Kamst, E., Jaarsveld, K.Z., Marel, G.A., Boom, J.H., Lugtenberg, B.J.J. and Spink, H.P. 1999. "Chemical synthesis of N-acetylglucosamine derivatives and their use as glycosyl acceptors by the *Mesorhizobium loti* chitin oligosaccharide synthase NodC." *Carbohydrate Research*. 321(1) : 176-189.
- Khan, W., Prithiviraj, B. and Smith, D.L. 2003. "Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves." *Journal of Plant Pathology*. 160(1) : 859-863

- Kren, V., Dvorakova, J., Gambert, U., Sedmera, P., Havlicek, V., Thiem, J. and Bezouska, K. 1998. " β -Glucosylation of chitooligomers by galactosyltransferase." *Carbohydrate Research*. 305(1) : 517-523.
- Krairak, S. and N. Budda. 2002. The production of short chitin oligomer by chitinolytic microorganism. The 5th Asia-Pacific Chitin-Chitosan Symposium & Exhibiton. March 13-15, 2002. The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand.
- Krairak, S., Nakajima, M., Shimizu, H. and Shioya, S. 1997. The yellow pigment Production by *Monascus* sp. 30th Proceeding of Chemical engineering in Autumn 8th-12th September. 1997. 375 p. (present No.Y203).
- Krairak, S., Yamamura, K., Nakajima, M., Shimizu, H. and Shioya, S. 1998. Online monitoring of *Monascus* cell concentration. 63th Proceeding of Chemical Engineering. 24th-26th March 1998. 205 p. (I119 Present No.)
- Krairak, S., Yamamura, K., Nakajima, M., Shimizu, H. and Shioya, S. 1999. On-line monitoring of fungal cell concentration by dielectric spectroscopy. *J. Biotech.*, 69, 115-123.
- Krairak, S., Yamamura, K., Irie, R., Nakajima, M., Shimizu, M., Chim-anage, P., Yongsmith, B. and Shioya, S. 2000. Maximizing yellow pigment production in fed-batch culture of *Monascus* sp. *J. Biosci. Bioengi.*, 90 (4), 363-367.
- Krairak, S., Yongsmith, B. and Sirirote, S. 1991. Effect of impeller type on growth and morphology of *Monascus* sp. 20M10.2 cultivation in a fermenter. *K.U. Sci. J.* 9 (1-2-3), 10-20.
- Kumar, A.B.V. and R.N. Tharanathan. 2004. A comparative study on depolymerization of chitosan by proteolytic enzymes. *Carbohydrate Polymers*. 58 (3); 275-283.
- Kurita, K., Y. Kaji, T. Mori and Y. Nishiyama. 2000. Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*. 42 (1); 19-21.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Novikov, B.Y. 2003. Hydrolysis of Chitin and Chitosan under the Action of Hydrochloric acid. p. 315-316. in Vårum, K.M., A. Domard, and O. Smidsrod. *Advances in Chitin Science Volume VI*. Trondheim. Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet.
- Masaki, A., Fukamizo, T., Otakara, A., Torikata, T., Hayashi, K. and Imoto, T. 1981. Estimation of rate constants in lysozyme-catalyzed reaction of chitooligosaccharides. *Journal of Biochemistry*. 90(1) : 1167-1175.
- Mason, M.E. and Davis, J.M. 1997. "Defense response in slash pine : Chitosan treatment after the abundance of specific mRNA." *Mol plant Microbe Interact*. 10(1) : 135-137.
- Mauch, F. and Staehelin, L.A. 1989. "Function implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and beta-1,3-glucanase in leaves." *Plant Cell*. 1(1) : 447-457.
- McCurdy, J. D. 1991. In *Proceedings of the 5th International Conference on Advances in Chitin and Chitosan*.
- Rast, D.M., D. Baumgartnerb and C. Mayerc, G.O. Hollensteina. 2003. Cell wall-associated enzymes in fungi. *Phytochemistry* 64; 339–366.
- Rast, D.M., M. Horsch, Furter, R., Gooday, G.W., 1991. A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function. *J. Gen. Microbiol* 137, 2797–2810.
- Robina, S., J. Gomez-Bujedo, G. Fernandez-Bolaiios, J. Fuentes, and H.P. Spaink. 2002. Synthesis and biological evaluation of oligosaccharides related to the molecule signals in plant defence and the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Tetrahedron* 58; 521-530.
- Sakai, K., R. Katsumi, A. Isobe, and F. Nanjo. 1991. Purification and hydrolytic action of chitosanase from *Nocardia orientalis*. *Biochem. Biophys. Acta*. 1079: 65-72.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sasaki, C., Yokoyama, A., Itoh, Y., Hashimoto, M., Watanabe, T. and Fukamizo, T. 2002. "Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes." *Journal of Biochemistry*. 131(1) : 557-564.
- Sashiwa, H., S. Fujishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, and S. Aiba. 2001. Production of N-acetyl-D-glucosamine from β -chitin by enzymatic hydrolysis. *Chemistry Letters*. 308-309.
- Sashiwa, H., S. Fujishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, K. Hiraga, K. Oda, and S. Aiba. 2002. Production of N-acetyl-D-glucosamine from α -chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330, *Carbohydrate Research*. 337 (8); 761-763.
- Sashiwa, H., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., Sukwattanasinitt, M., Pichyangkura, R. and Aiba, S.I. 2003. "Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study to N-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes." *Carbohydrate Polymers*. 51(1) : 391-395.
- Sato, K., M. Morimoto, H. Saimoto, and Y. Shigemasa. 2003. Depolymerization of Chitin and Chitosan under Hydrothermal Condition. p. 281-282. in Vårum, K.M., A. Domard, and O. Smidsrod. *Advances in Chitin Science Volume VI*. Trondheim. Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet.
- Selitrechnikoff, C.P. 2001. Antifungal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (7): 2883-2894.
- Shahidi, F., J. Kamil, V. Arachchi, and Y.J. Jeon. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* 10; 37-51.
- Sharathchandra, R.G., Raj, S.N., Shetty, N.P., Amruthesh, K.N. and Shetty, H.S. 2004. A chitosan formulation elixaTM induces domny mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection*. 23(1) : 881-888.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tokuyasu, K., Ono, H., Mitsutomi, M., Hayashi, K. and Mori, Y. 2000. "Synthesis of a chitosan tetramer derivative, β -D-GlcNAc-(1,4)- β -D-GlcNAc-(1, 4)- β -D-GlcNAc-(1, 4)-D-GlcNAc through a partial N- acetylation reaction by chitin deacetylase." *Carbohydrate Research*. 325(1) : 211-215.
- Vårum, K.M., M.H. Ottoy, and O. Smidsrod. 2001. Acid hydrolysis of chitosans. *Carbohydrate Polymers*. 46 : 89-98.
- Win, N.N. and Stevens, W.F. 2001. "Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase." *Applied Microbiology Biotechnology*. 57(1) : 334-341.
- Yamada, A., Shibbuya, N., Kodama, O. and Akatsuka, T. 1993. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitoooligosaccharides. *Biosci. Biotech. Biochem* 57; 405-409.
- Yang, S.C, Ge, H.X., Hu, Y., Jiang, X.Q. and Yang, C.Z. 2000. Formation of positively charged poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilized with chitosan. *Colloid Polym Sci* 278: 285-292.
- Yongsmith, B., Chitradon, L., Krairak, S., Tabloka, W. and Bavavoda, R. 1990. Cassava fermentation of yellow pigment and amyolytic enzymes of a mutant of *Monascus* spp. in submerge cultivation. *Microbial Utilization of Renewable Resources*. 7 : 354-363.
- Yongsmith, B., Krairak, S. and Bavavoda, R. 1994. Production of yellow pigments in submerged culture of a mutant of *Monascus* spp. *J. Ferment. Bioeng*. 78 (3), 223-228.
- Yongsmith, B., V. Kitprechavanich, L. Chitradon, C. Chaisrisook and N. Budda. 2000. Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10 (1-3), 263-272.

<http://www.fisheries.go.th/foreign/average42-46/exportshrimp.xls>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหารเหลว MYS (malt yeast extract starch medium)

ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch)	20.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
มอลต์สกัด (Malt extract)	3.0	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8-7.0 ต้มแป้งมันสำปะหลังให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารวุ้นใช้ผสมวุ้นปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

1.2 อาหารเหลว SS (starch and soybean flour medium)

ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch)	30.0	กรัม
แป้งถั่วเหลือง	40.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8-7.0 ต้มแป้งมันสำปะหลังให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารวุ้นใช้ผสมวุ้นปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

1.3 อาหารเหลว PDA (potato dextrose medium)

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200.0	กรัม
----------	-------	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ Dextrose ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่ควรนำไปใช้กับภายนอก การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000.0	มิลลิลิตร
----------------------------	---------	-----------

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8-7.0 ต้มแป้งมันสำปะหลังให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารวุ้น ใช้ผสมวุ้นปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

1.4 อาหารเหลว GYP (glucose yeast extract peptone medium)

ประกอบด้วย

Glucose	40.0	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1,000.0	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6.8-7.0 ต้มแป้งมันสำปะหลังให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ถ้าต้องการเตรียมเป็นอาหารวุ้น ใช้ผสมวุ้นปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

1.3 สารละลายเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase)

เอนไซม์ไคตินเนส จากเชื้อแบคทีเรียเบอร์ 6.0 ของนายธีระพันธ์ เจริญสาคร (2548) ทำการเลี้ยงเชื้อเบอร์ 6.0 ในอาหารเหลวไคตินมีเคียมที่มีเปปโตนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน นำน้ำหมักที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสที่ได้เพื่อนำไปทดลองต่อไป ซึ่งเอนไซม์ที่ได้เป็นชนิดที่เชื้อผลิตแล้วขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme)

2 สารเคมีการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

สารละลายแป้งมันสำปะหลัง (starch) มาตรฐาน

เตรียมโดยชั่งแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้งด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง 1.0 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ต้มด้วยไฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อ่อนๆ คนให้แป้งมันละลายเป็นของเหลวใสๆ เก็บเป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีแป้งมันต่ำปะหลังความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กรดซัลฟูริกเข้มข้น

สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายฟีนอล 5.0 กรัมในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3 สารเคมีในการวิเคราะห์โครงสร้างโคตินและโคโตซานในเส้นใยเชื้อรา

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์อิ่มตัวในเมธานอล

นำเมธานอลปริมาตร 500 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมแคลเซียมคลอไรด์ คนตลอดเวลานจนแคลเซียมคลอไรด์ไม่สามารถละลายในเมธานอลได้

4 สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณโคตินโอลิโกเมอร์ด้วย HPLC

อะซิโตไนไตรล์ 70 เปอร์เซ็นต์

อะซิโตไนไตรล์ 700.0 มิลลิลิตร

น้ำปราศจากไอออน (Deionized water) 300.0 มิลลิลิตร

ผสมแล้วกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร (ธีระพันธ์ เจริญสาคร, 2548)

ภาคผนวก ข

1 เทคนิคการทำ slide culture

การเตรียมเส้นใยเชื้อราสำหรับทำ slide culture

1. เทอาหารวุ้น MYS ลงในจานเพาะเชื้อให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้เย็น และผิวหน้าอาหารแห้ง
2. ใช้มีด หรือมีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงกรีดอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างด้านละประมาณ 6 มิลลิเมตร
3. ใช้ปากคีบ คีบสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาไฟ 2 ครั้ง ก่อนวางลงบนแท่งแก้ว ซึ่งงอเป็นข้อศอกในจานเพาะเชื้อ
4. ใช้มีดยกชิ้นวุ้น ที่ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มาวางตรงกลางสไลด์ในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3
5. ใช้เข็มเขี่ย เชื้อรามาแตะที่ส่วนหน้าทั้งสี่ด้านของชิ้นวุ้น
6. นำกระจกปิดสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และเผาไฟแล้ว ค่อยๆ วางปิดชิ้นวุ้น ซึ่งปลุกเชื้อแล้ว
7. เทน้ำกลั่นซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ชุ่ม
8. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยบ่มเชื้อ *Monascus* sp.KB20M1 เป็นเวลา 7 วัน

การตรวจผล

หลังจากบ่มเชื้อจนเชื้อราเจริญดีแล้ว นำมาเตรียมทำสไลด์ถาวร หรือกึ่งถาวร โดย

1. ยกกระจกปิดสไลด์ขึ้น หยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงไปที่ตรงกลางของกระจกปิดสไลด์ด้านในซึ่งมีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ เพื่อให้แอลกอฮอล์กระจายเข้าสู่เส้นใยเชื้อรา
2. ก่อนที่แอลกอฮอล์จะแห้ง ให้นำกระจกปิดสไลด์วางลงบนน้ำยาแลคโตฟีนอล (lactophenol) ซึ่งหยดอยู่ตรงกลางสไลด์แผ่นใหม่
3. เขี่ยชิ้นวุ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสออกทิ้งไป และหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์ แล้วหยดน้ำยาแลคโตฟีนอลลงไปตรงกลางแผ่นสไลด์ก่อนแอลกอฮอล์แห้งสนิท ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แผ่นใหม่
4. นำสไลด์ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ทั้งสองแผ่น ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

กราฟมาตรฐาน

โดยใช้สารละลายแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์ตัวอย่าง

นำสารละลายตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบเติมสารละลายฟีนอล 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปแช่น้ำเย็น 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 488 นาโนเมตร เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

3 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ (dry cell weight)

2.1 อบกระถงฟอยด์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desicator) ประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

2.2 ปิเปตตัวอย่างอาหารที่มีเชื้อราเจริญ 10 มิลลิลิตร กรองด้วยผ้าลินินและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นต้มเดือด 3 ครั้ง

2.3 นำเซลล์ที่ล้างแล้วเทใส่กระถงฟอยด์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

2.4 นำออกมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำให้ได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักของจากอุณหภูมินิยมมาหักออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์ใน 10 มิลลิลิตร

4 การวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วย HPLC

การเตรียมตัวอย่าง

ปรับพีเอชสารละลายตัวอย่างให้เป็นกลาง บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ทั้งหมดไปกรองด้วยถ้วยกรองขนาด 1,000 ดาลตัน จากนั้นนำสารละลายส่วนบน 3 ส่วนผสมกับอะซิโตนไตรล์ 7 ส่วน กรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้คอลัมน์ Asahipak Shodex NH₂P-50 4E โดยมีอะซิโตนไตรล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำปราศจากไอออนเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมกราฟมาตรฐานของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน และโคตินโอลิโกเมอร์ ด้วยวิธี

HPLC

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution)

เตรียมสารละลายเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน 20.42 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโตไบโอสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง โคโตไบโอส 42.46 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโตไตรโอสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง โคโตไตรโอส 62.76 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโตเตตระโอสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง โคโตเตตระโอส 8.31 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโตเพนโตสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง โคโตเพนโตส 10.34 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโตเฮกซะโอสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง โคโตเฮกซะโอส 12.37 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

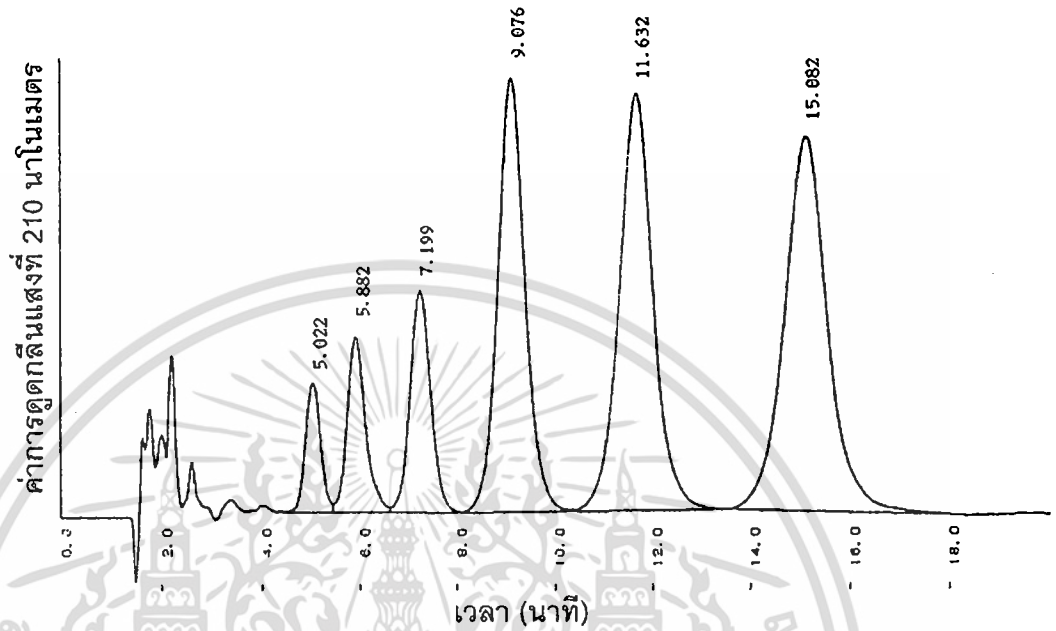
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้นจากข้อ 1 แต่ละชนิดด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์

3. ผสมสารละลายมาตรฐานที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 3 ส่วน กับอะซิโตนไนไตรล์ 7 ส่วน

4. กรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

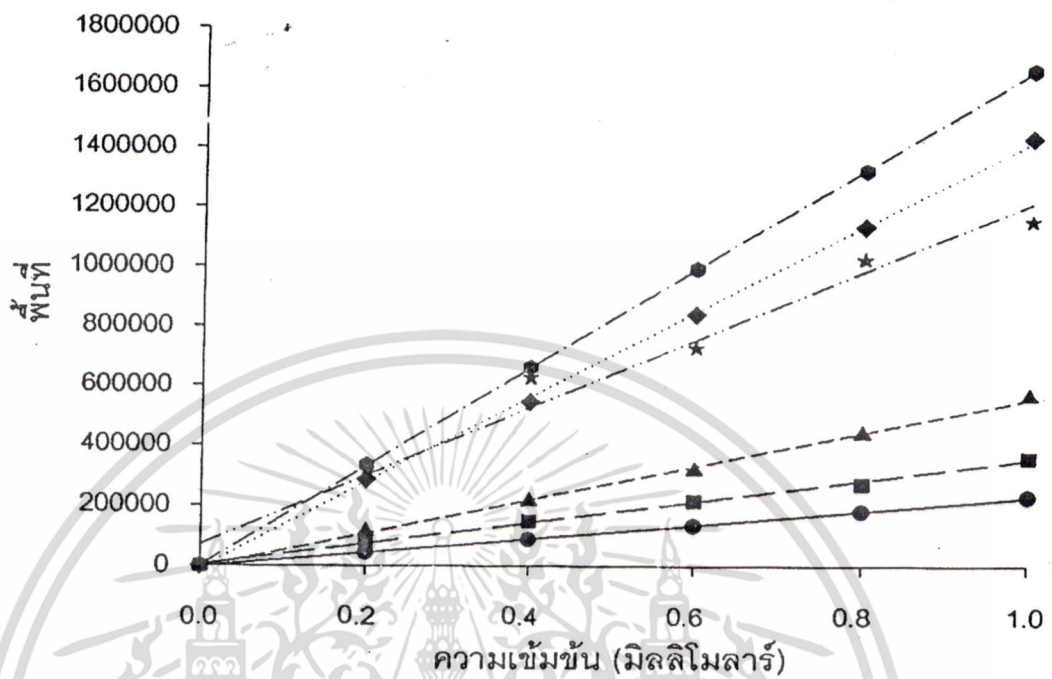
5. วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

6. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน X) กับพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y)



รูปที่ ข.1 เวลารีเทนชัน (retention time) ของเอินอะเซทิลกลูโคซามีน (5.022 นาที) โคโคไบโอส (5.882 นาที) โคโคไตรโอส (7.199 นาที) โคโคเตตระโอส (9.076 นาที) โคโคเพนโอส (11.632 นาที) โคโคเฮกโซส (15.082 นาที)

ที่มา : (ธีระพันธ์ เจริญสาคร. 2548)



เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน สมการเส้นตรง $(Y) = 229477 (X) - 1373$

$$R^2 = 0.9997$$

โคโคโบโอส สมการเส้นตรง $(Y) = 346742 (X) + 5892$

$$R^2 = 0.9969$$

โคโคไตรโอส สมการเส้นตรง $(Y) = 556925 (X) - 3067$

$$R^2 = 0.9983$$

โคโคเตตระโอส สมการเส้นตรง $(Y) = 1427125 (X) - 7232$

$$R^2 = 0.9996$$

โคโคเพนโตส สมการเส้นตรง $(Y) = 1653704 (X) + 1401$

$$R^2 = 1.0000$$

โคโคเฮกโซส สมการเส้นตรง $(Y) = 1139208 (X) - 72114$

$$R^2 = 0.9769$$

รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน และโคโคไดโนลิโกเมอร์ ระหว่างความเข้มข้น กับพื้นที่ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ที่มา : (ธีระพันธ์ เจริญสาคร. 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 วิเคราะห์โครงสร้างโคตินและโคโตนานด้วยเครื่อง FT-IR

การใช้อินฟราเรดสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่เป็นของแข็งต้องทำให้สารตัวอย่างมีลักษณะบางๆ เป็นฟิล์มหนาประมาณ 0.01-0.1 มิลลิเมตร เพื่อให้แสงผ่านได้ โดยใช้เทคนิค KBr-pellet ซึ่งจะใช้สารพวกอัลคาเฮไลด์ เช่น KBr ที่เป็นของแข็งผสมกับสารตัวอย่าง บดให้เข้ากันในโกรงอะเกต แล้วนำไปอัดจะได้สารแผ่นใส

วิธีทำ KBr-pellet ใช้สารตัวอย่างประมาณ 2.0 มิลลิกรัม ผสมกับ KBr 100-200 มิลลิกรัม ในโกรงอะเกต แล้วบดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน การทำ KBr-pellet ควรให้สารตัวอย่างมีความเข้มข้นประมาณ 0.1-2.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณได้ ขึ้นอยู่กับสารตัวอย่งนั้น คุณกลั่นแสดอินฟราเรดได้ดีเพียงใด เมื่อบดดีแล้วนำไปใส่เครื่องอัดซึ่งเรียกว่า die หลังจากเปิดปั้มดูดอากาศออกประมาณ 1 นาที จึงเริ่มอัดด้วยเครื่องอัดขนาด 15 ตัน ใช้แรงดันประมาณ 10 ตันสำหรับแผ่นตัวอย่างขนาด 13 มิลลิเมตร ไม่ควรใช้ความดันสูงเกินไปเพราะอาจทำให้แผ่นตัวอย่างเสียหาย ควรอัดประมาณ 3-4 นาที หลังจากลดความดันและปลดปั้มออกแล้ว นำตัวอย่างที่เป็นแผ่นใสบางออกมาอย่างระมัดระวัง เพราะอาจแตก หรือหักได้ จากนั้นใส่ลงใน disc holder เพื่อนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ต่อไป