สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินต่อการเจริญเติบโตของพืชและเชื้อรา

นางสาว ศิริลักษณ์ อิ่มจงใจรัก
นางสาว ศิวพร อินเกื้อ
นางสาว สุนิสา ด้วงสอาด

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47297
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2546

.b.....
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The biological effect of chitinolytic compound on growths of plant and mould

Miss Siriluck Imjongjairak

Miss Siwaporn Inkure

Miss Sunisa Duangsa-ard

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang

Academic Year 2002

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ เรื่อง ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินต่อการเจริญเติบโตของพืชและเชื้อรา

นักศึกษา นางสาวศิริลักษณ์ อิ่มจงใจรัก
นางสาวศิวพร อินเกื้อ
นางสาวสุนิสา ด้วงสอาด

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2545
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคติน ต่อการเจริญเติบโตของพืช พบว่า ต้นโหระพาที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS และหยดสารที่ได้จากการย่อยสลายไคตินปริมาตร 20 µl ที่ความเข้มข้น 1000, 5000 และ10,000 mg/l ทำให้ต้นโหระพามีความสูงเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นโหระพาที่ไม่ได้รับสาร ต้นมะเขือเทศและต้นถั่วเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland โดยผสมสารที่ได้จากการย่อยสลายไคติน ความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50-5000 mg/l มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชไม่แตกต่างกัน กับต้นพืชที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่ไม่ได้ผสมสาร แต่ที่ความเข้มข้น 10,000 mg/l ทำให้ต้นพืชเหี่ยวและตาย เมื่อทดลองโดยจุ่มต้นมะเขือเทศและต้นถั่วเขียวในสารที่ความเข้มข้นต่างๆโดยตรง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่า ที่ความเข้มข้น 50-10,000 mg/l มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นพืชไม่แตกต่างกับต้นพืชที่ไม่ได้จุ่มสาร และเมื่อนำต้นพืชไปเพาะในอาหารเหลวที่ขาดธาตุไนโตรเจน แล้วผสมสารที่ได้จากการย่อยสลายไคติน 100 และ 1000 mg/l พบว่า ในเวลา 10 วัน ยังไม่สามารถเห็นความแตกต่างของการเจริญเติบโตได้ เมื่อศึกษาการเจริญของเชื้อรา *A.niger* ต่อผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคติน พบว่า ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลองไม่มีผลในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(หน้าอนุมัติ)

โครงงานพิเศษเรื่อง ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินต่อการเจริญเติบโตของพืชและเชื้อรา

นักศึกษา นางสาวศิริลักษณ์ อิ่มจงใจรัก รหัส 42050199
นางสาวศิวพร อินเกื้อ รหัส 42050200
นางสาวสุนิสา ด้วงสอาด รหัส 42050208

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.สมชาย ไกรรักษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี	
กรรมการ ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	

.....
(รองศาสตราจารย์นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project title	The biological effect of chitinolytic compound on growths of plant and mould
Name	Miss Siriluck Imjongjairak Miss Siwaporn Inkure Miss Sunisa Duangsa-ard
Department	Applied biology
Program	Science
Academic Year	2002
Special Project Advisor	Dr. Pana Lohasupthawee
Special Project co-advisor	Dr. Somchai Krairak

ABSTRACT

20 µl of 1000, 5000 and 10,000 mg/l chitinolytic solution enhanced the growth of *Ocimum basilicum* (L.) shoot on MS medium. *Lycopersicum esculentum* and *Vigna radiata* (L.) were cultured in Hoagland liquid medium with different concentration of chitinolytic compounds. The results showed that 50-5000 mg/l chitinolytic compounds in Hoagland medium had the similar growth index as the plants grown in Hoagland medium without chitinolytic compounds but at the concentration of 10,000 mg/l chitinolytic compounds caused the plants dead. Another experiment, *Lycopersicum esculentum* and *Vigna radiata* (L.) were immersed in different concentration of chitinolytic solution before they were cultured in Hoagland liquid medium. The results showed that the plants immersed in 50-10,000 mg/l chitinolytic solutions had the similar growth index as the plants that were not immersed in chitinolytic solution before culturing. Different concentrations of chitinolytic compounds were tested on the growth of *A. niger*. The result showed that the tested concentration were not suitable to inhibit fungal growths.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบคุณ อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษ ขอขอบคุณอาจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล ประธานกรรมการโครงงานพิเศษและ อาจารย์ สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการโครงงานพิเศษ ที่ช่วยตรวจสอบแก้ไขโครงงานพิเศษให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณอาจารย์สมชาย ไกรรักษ์ ที่ให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาตลอดงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณอาจารย์นิสา บุตรดา มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกๆ ท่านที่ร่วมแสดงความคิดเห็นต่อการวิจัยในครั้งนี้และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน

ขอขอบคุณเพื่อนๆ และพี่ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

นางสาวศิริลักษณ์ อิ่มจงในรัก
นางสาวศิวพร อินเกื้อ
นางสาวสุนิสา ด้วงสอาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 คุณสมบัติของไคติน	4
2.2 การย่อยสลายไคติน	5
2.3 ประโยชน์ของไคติน ไคโตซาน และเอนไซม์ไคติเนส	7
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	11
3.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น	11
3.2 การผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคติน	11
3.3 การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก	11
3.4 การเตรียมสารที่ได้จากการย่อยสลายไคตินเพื่อใช้ทดสอบ	12
3.5 การเตรียมพืชเพื่อใช้ทดสอบ	12
3.6 เตรียมเชื้อราที่ใช้ทดสอบ	12
3.7 การทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคตินกับพืช	12
5.8 นำสารที่ได้จากการย่อยไคตินมาทดสอบกับเชื้อรา	14
5.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ	14
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	15
4.1 การนำสาร chitinolytic compound มาทดสอบกับต้นโหระพา	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การใช้สาร chitinolytic compound ทดสอบกับต้นมะเขือเทศ โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland 17

4.3 การนำสาร chitinolytic compound มาทดสอบกับต้นถั่วเขียว โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland 21

4.4 การนำสาร chitinolytic compound มาทดสอบกับต้นถั่วเขียว ในอาหารเหลวสูตร Haugland ที่ขาดธาตุไนโตรเจน 28

4.5 การนำสาร chitinolytic compound มาทดสอบกับเชื้อรา *Aspergillus niger* 32

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 35

เอกสารอ้างอิง 37

ภาคผนวก 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต	8
2	แสดงค่า Growth index ของความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นมะเขือเทศในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ	18
3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 2 เพื่อเปรียบเทียบ ส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นมะเขือเทศอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่าง ๆ	19
4	ตารางแสดงค่า Growth index ส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นมะเขือเทศในอาหารเหลวสูตร Hoagland โดยจุ่มต้นมะเขือเทศในสาร chitinolytic compound ที่มีความเข้มข้นต่างๆ	20
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 4 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของต้นมะเขือเทศในอาหารเหลวสูตร Hoagland โดยจุ่มต้นมะเขือเทศในสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่าง ๆ	20
6	แสดงค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปโดยเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน	22
7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 6 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่		หน้า
8	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ด้วยวิธี DMRT	23
9	แสดงค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งผสมสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน	24
10	การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่าง ๆ	24
11	แสดงค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งจุ่มต้นถั่วเขียวในสารละลาย chitinolytic compound โดยเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน	25
12	การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียว ในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ	26
13	แสดงค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland เป็นเวลา 7 วัน โดยจุ่มต้นถั่วเขียวในสารละลาย chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน	27
14	การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 13 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรHoagland ถูกจุ่มในสารละลาย chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7 วัน	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ หน้า

15 แสดงค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่ผสมสาร chitinolytic compound ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุ nitrogen โดยเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน 29

16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 15 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุ nitrogen ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ 29

17 แสดงค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุ nitrogen ซึ่งผสมสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน 30

18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 17 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound 31

19 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญในหลุมที่มีสาร chitinolytic compound ปริมาณ 20 ul ผสมอยู่ในอาหาร PDA 32

20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger* ในหลุมที่มีสาร chitinolytic ปริมาณ 20 ul ในอาหาร PDA 32

21 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญในหลุมที่มีสาร chitinolytic compound ปริมาณ 40 ul ผสมอยู่ในอาหาร PDA 33

22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 21 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger* ในหลุมที่มีสาร chitinolytic ปริมาณ40 ul ในอาหาร PDA 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงสูตรโครงสร้างของ cellulose chitin และ chitosan	5
2	เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดควบคุม กับต้นที่หยดสาร chitinolytic ที่มีความเข้มข้น 100 mg/l	15
3	เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดควบคุม กับต้นที่หยดสาร chitinolytic ที่มีความเข้มข้น 1000 mg/l	16
4	เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดควบคุม กับต้นที่หยดสาร chitinolytic ที่มีความเข้มข้น 5000 mg/l	16
5	เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดควบคุม กับต้นที่หยดสาร chitinolytic ที่มีความเข้มข้น 10,000 mg/l	17
6	เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดควบคุม กับต้นที่หยดสาร chitinolytic ที่มีความเข้มข้น 100,000 mg/l	17
7	กราฟแสดงค่า growth index เฉลี่ยของความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นมะเขือเทศที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ	19
8	กราฟแสดงค่า Growth index เฉลี่ยของความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นมะเขือเทศที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland โดยจุ่มต้นมะเขือเทศในสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ	20
9	กราฟแสดงค่า Growth index เฉลี่ยของความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland โดยจุ่มต้นถั่วเขียวในสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ หน้า

10 กราฟแสดงค่า Growht index เฉลี่ยของน้ำหนักของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ 25

11 กราฟแสดงค่า Growth index เฉลี่ยของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งจุ่มต้นถั่วเขียวในสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ 26

12 กราฟแสดงค่า Growth index เฉลี่ยของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งจุ่มต้นถั่วเขียวในสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ 28

13 กราฟแสดงค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุไนโตรเจนโดยการผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ 30

14 กราฟแสดงค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุไนโตรเจน โดยผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่าง ๆ 31

15 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญในหลุมที่มีสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 20 µl ผสมอยู่ในอาหาร PDA เทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้น้ำ 20 µl แทนสาร chitinolytic compound 33

16 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญในหลุมที่มีสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 40 µl ผสมอยู่ในอาหาร PDA เปรียบเทียบกับหลุมควบคุมซึ่งหยดน้ำ 40 µl แทนสาร chitinolytic compound 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ปัจจุบันกุ้งเป็นสินค้าสัตว์น้ำส่งออกที่สำคัญติดอันดับ 1 ใน 10 อันดับแรกของประเทศไทย ทำให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกมากมาย ได้แก่ อุตสาหกรรมผลิตอาหารกุ้งและเคมีภัณฑ์สำหรับอาหารกุ้ง อุตสาหกรรมเพาะพันธุ์กุ้ง อุตสาหกรรมแปรรูปกุ้ง แต่ในขณะเดียวกันกากของเสียจากอุตสาหกรรมดังกล่าวก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมในแง่ของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต ได้แก่เปลือก และหัวกุ้งการนำของเหลือทิ้งเหล่านี้กลับมาใช้ประโยชน์เป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม ในปัจจุบันได้มีการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไคตินและไคโตซานมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย สามารถแยกออกได้หลายประเภท ได้แก่ ด้านอาหาร เภสัชกรรมและเครื่องสำอาง ตัวอย่างเช่น ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเพื่อสุขภาพ (food health) ลดไขมันและควบคุม น้ำหนัก ใช้บำบัดโรคไขข้อเสื่อม (osteoarthristis) (Sanhiwa และคณะ, 2002) เป็นสารควบคุมการออกฤทธิ์ของยา (Lim, Khor and Ling, 1999) ช่วยให้เลือดแข็งตัว (Hirano, 1999) ใช้เป็นสารกันเสีย (preservative) และสารคงตัว (stabilizer) ในอาหาร (สุวลี, 2544) ด้านการบำบัดน้ำเสีย ใช้เป็นตัวดูดซับในการแยกสารกัมมันตรังสีและโลหะหนัก (Hirano, 1996) ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ใช้ในการตรึงเซลล์แบบห่อหุ้ม (entrapmentation) และแบบแคปซูล (encapsulation) และมีบทบาทอย่างมากในด้านการเกษตร เช่น ใช้เคลือบเมล็ดพันธุ์พืช (Seed Coating) เป็นสารยับยั้งเชื้อไวรัสพืชบางชนิดได้ (Plant antivirus preparate) (Struszczylet, 1988) เนื่องจากมีสมบัติเป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ให้พืชสร้างสาร pisatin เพื่อใช้ป้องกันตัวเอง และมีผลต้านเชื้อราบางชนิดที่ทำให้เกิดโรคในพืชได้

ไคตินเป็นโพลิเมอร์ชีวภาพที่มีมากมายเป็นอันดับสองในโลกรองจากเซลลูโลส โดยถูกพบในโครงสร้างเปลือกนอกของสัตว์จำพวกปู กุ้ง และแกนปลาหมึก นอกจากนี้ยังพบในผนังเซลล์ของเห็ดราและสาหร่ายบางชนิด ซึ่งปริมาณและโครงสร้างของไคตินจะแตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่พบ ไคตินเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างเป็นสายยาวไม่แตกแขนงย่อย ประกอบด้วยหน่วยย่อยของ N-acetyl-D-glucosamine ต่อกันด้วยพันธะβ-1,4-glycosidic มีสูตรทั่วไปเป็น ($C_6H_{12}O_4NHCOCH_3$) มีชื่อทางเคมีว่า β-1,4-N-acetyl-2-amino-deoxyl-D-glucose (Paul,1978) การย่อยสลายไคตินเป็นการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน (chitinolytic enzyme) ที่มีการทำงานต่อเนื่องกันอย่างเป็นลำดับ ได้แก่ เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สลายสายโซ่ที่ตำแหน่งโมเลกุลของไคตินแบบสุ่มตรงตำแหน่งพันธะ 1,4 linker เอนไซม์ไคโตไบเอส หรือ เฮกโซซามินิเดส (chitobiase or hexosaminidase) สามารถย่อยสลายไคตินจากปลายสายด้าน non-reduce ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไคติน ได้แก่ โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ที่ประกอบด้วย N-acetyl-D-glucosamine (2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) และ glucosamine (2-amino-2-deoxy-D-glucose) (Kendra and Hadwiger, 1984) ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นการทำงานของยีนในพืชให้ผลิตโปรตีนที่เสริมสร้างการป้องกันตนเอง (สุวลี, 2544) ซึ่งถือว่าเป็นพวก elicitor และมีความสามารถในการเป็นตัวควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulator) (จตุรงค์และฐิติมา, 2539) และแนวโน้มของเทคโนโลยีการเกษตรในอนาคตจะมุ่งเน้นการเกษตรอินทรีย์ เนื่องจากการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชส่งผลกระทบต่อตัวเกษตรกร ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและสิ่งแวดล้อมทั้งทางตรงและทางอ้อม การใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินจึงเป็นทางเลือกใหม่ จากคุณสมบัติจึงได้นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคตินมาทดสอบกับพืชจำนวน 3 ชนิด และเชื้อรา 2 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ที่มีต่อการเจริญของพืช และเชื้อรา

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินต่อการเจริญของพืช 3 ชนิด ได้แก่ ต้นโหระพา(*Ocimum bacilicum* L.) ต้นมะเขือเทศ (*Lycopersicon lycopersicum*) และต้นถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) Wilzcek)

2. เพื่อศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินต่อการเจริญของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืช คือ *Aspergillus niger*

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1.3.1 นำเชื้อ Actinomyces ที่ได้จากการคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่มีไคตินผง (Chitin powder) เป็นแหล่งอาหาร หลังจากนั้นนำน้ำหมักที่ได้มาแยกเซลล์จุลินทรีย์ออก (spent culture) แล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำ (Lyophilization)

1.3.2 ทดสอบผลของความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักต่อการเจริญของพืช 3 ชนิด โดยการผสมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงพืช และวิธีจุ่มใบพืชในสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และการทดสอบการออกฤทธิ์ต่อเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (inoculum) ของเชื้อ Actinomycetes (E10)

1.4.2 การผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินในถังหมัก

1.4.3 การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักโดยการตกตะกอนและทำให้เป็นผงด้วยเครื่อง Lyophilizer เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลอง

1.4.4 การเตรียมสารที่ได้จากการย่อยสลายไคตินเพื่อใช้ทดสอบโดยการกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อใช้ทดสอบขั้นต่อไป

1.4.5 การเตรียมพืชเพื่อใช้ทดสอบ เตรียมได้ดังนี้

1.4.5.1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดพืชของโหระพา

1.4.5.2 เพาะเมล็ดมะเขือเทศในสภาวะธรรมชาติ

1.4.5.3 เพาะเมล็ดถั่วเขียว

1.4.6 เตรียมเชื้อราที่จะใช้ทดสอบ คือ *Aspergillus niger*

1.4.7 นำสารที่ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้มาทดสอบกับพืช

1.4.8 นำสารที่ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทดสอบกับเชื้อรา

1.4.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคตินไปประยุกต์ใช้ในด้านการเกษตร
2. พัฒนาให้เป็นสารที่ใช้ต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืช เพื่อลดการใช้สารเคมีและรักษาสิ่งแวดล้อม
3. นำผลที่ได้จากการทดลองมาใช้กับพืชในสภาวะธรรมชาติ
4. เป็นการนำเปลือกกุ้งซึ่งเป็นกากของเสียจากอุตสาหกรรมมาใช้ประโยชน์ ช่วยลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 คุณสมบัติของไคติน

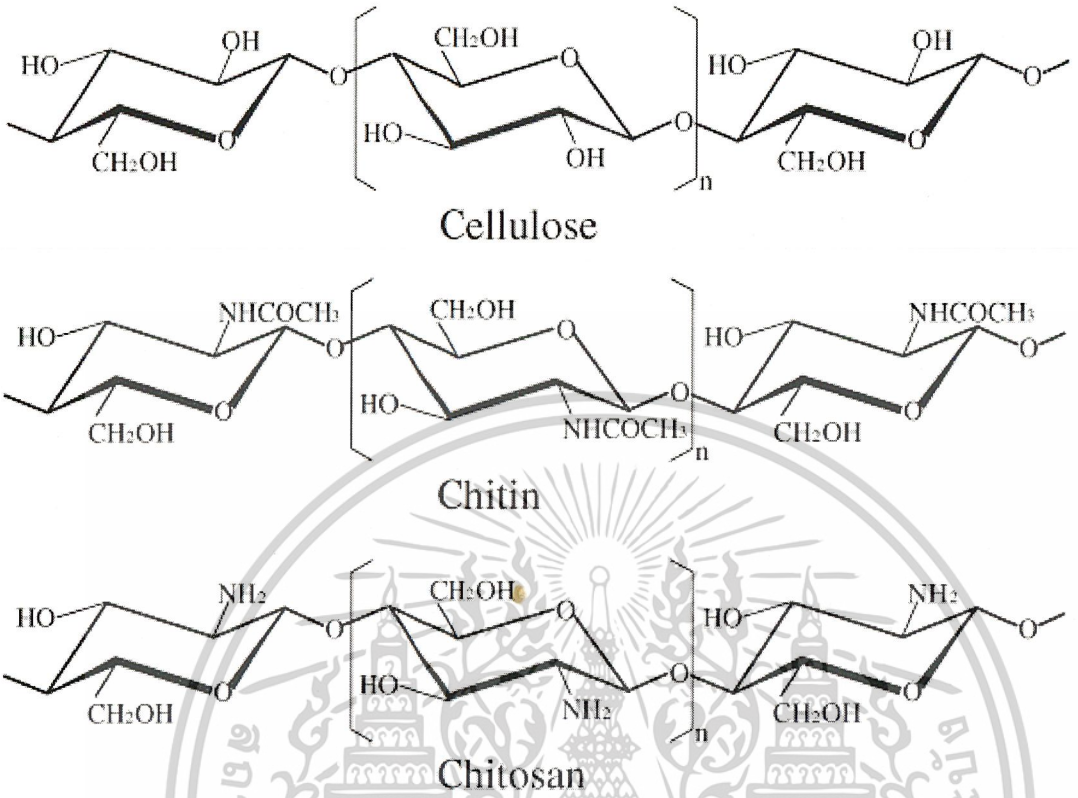
ไคติน(chitin) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติมีมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส พบได้มากในเปลือกและโครงสร้างแข็งที่หุ้มร่างกายของสัตว์ใน Phylum Arthropoda ใน class Clustacea ได้แก่ กุ้ง กั้ง ปู ใน class Insecta ได้แก่ แมลง ตัวด้วง นอกจากนี้ยังพบในแกนปลาหมึก และพบในผนังเซลล์ของเห็ดรา ยีสต์ และสาหร่ายบางชนิด พบอยู่ในรูปสารสะสมกับสารอินทรีย์จำพวกโปรตีนและสารอนินทรีย์จำพวกแคลเซียม แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส มีสูตรทั่วไปเป็น$(C_6H_{12}O_6NHCOCH_3)_n$ ชื่อทางเคมีคือ β-1,4-N-acetyl-2-amino-deoxy-D-glucose มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเซลลูโลส โดยต่างกันที่หมู่แทนที่ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส (pyronose ring) ของเซลลูโลสเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group)

ไคตินเป็นโคพอลิเมอร์ (copolymer) ที่ประกอบด้วยโมโนเมอร์ (monomer) 2 ชนิด คือ *N*-acetyl-D-glucosamine เป็นส่วนใหญ่ และ D-glucosamine ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ β-(1,4) glycosidic

N-acetyl-D-glucosamine มีหมู่อะซิทาไมด์เป็นหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส ส่วน glucosamine มีหมู่อะมิโนเป็นหมู่แทนที่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส (รัตนา, 2544)

ไคติน มีโครงสร้างเป็นเส้นตรงยาว ไม่มีแขนงย่อย ทำให้ไม่มีประจุ จึงไม่ละลายในตัวทำละลายทั่วไป แต่จะละลายได้ดีในกรดเข้มข้น เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟิวริก เนื่องจากกรดเข้มข้นจะมีปริมาณโปรตอนมากเพียงพอที่จะทำให้เกิดไอออนบวกที่ตำแหน่งอะเซตาไมด์ และทำให้ตำแหน่ง C-2 ของไคตินกลายเป็นไอออนบวก พันธะไฮโดรเจนจึงสลายลง ในขณะที่พันธะไอออนถูกสร้างขึ้นระหว่างไอออนลบของกรด (สุวบุญ, 2544) ทำให้เกิดการละลายขึ้น ตัวทำละลายอีกอย่างหนึ่งคือ เกลือในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น สารละลายแคลเซียมคลอไรด์อิ่มตัวในเมทานอล ทำให้ไคตินละลายได้เนื่องจากเกลือในตัวทำละลายจะสร้างพันธะไอออนแทนที่พันธะไฮโดรเจนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของ cellulose chitin และ chitosan

2.2 การย่อยสลายไคติน

2.2.1 วิธีการย่อยสลายไคติน

2.2.1.1 การย่อยสลายโดยปฏิกิริยาทางเคมี

ใช้สารเคมีเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เช่น กรด ด่าง โลหะ หรือ ไอออนของโลหะต่างๆ มักใช้สภาวะที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิสูง ความดันสูง เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แต่ตัดโมเลกุลของไคตินได้แบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์เป็น โอลิโกเมอร์ขนาดต่างๆ และ มอนอเมอร์ โดยขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ เช่น ชนิดของกรด เวลา อุณหภูมิ ชนิดของพันธะของสายโซ่โมเลกุล ชนิดของพอลิเมอร์ และต้องมีกระบวนการในการกำจัดกรดหรือสารที่ใช้เร่งปฏิกิริยาก่อนนำมาใช้

2.2.1.2 การย่อยสลายโดยเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายไคติน ได้แก่ เอนไซม์ไคติเนส (chitinase) มีข้อดีคือใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง ให้ผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะ ให้ของเสียจากการผลิตต่ำและมีความเป็นพิษน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.3 การใช้ความร้อน

การสลายไคตินด้วยความร้อนจะทำให้เกิดการเสียสภาพของโครงสร้างไคติน โดยไคตินจะเสื่อมสลายที่อุณหภูมิประมาณ 275-300 องศาเซลเซียส

2.2.1.4 การเสื่อมสลายโดยการสั่นด้วยคลื่นเสียง

การเสื่อมสลายโดยการสั่นโดยคลื่นเสียงควบคู่กับการใช้กรด มีผลให้ได้โอลิโกเมอร์ที่มีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่าการเสื่อมสลายโดยใช้กรดเพียงอย่างเดียว (ภาวดี, อศิรา และก้องเกียรติ, ม.ป.ป.)

2.2.2 กลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายไคติน

เอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน (chitinolytic enzyme) พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ มนุษย์ สัตว์ต่างๆ เช่น กุ้ง ปู แมลง ในพืช เช่น ข้าว แตง ใบยาสูบ ยางพารา มันเทศ ถั่วต่างๆ และในจุลินทรีย์ ไคตินจะถูกย่อยสลายเพื่อการเจริญเติบโต เช่น การลอกคราบหรือแบ่งเซลล์ การย่อยเพื่อเป็นอาหาร การย่อยเพื่อฆ่าหรือต่อต้านการบุกรุก เช่น การทำลายผนังเซลล์ของราโดยเซลล์ของพืชและสัตว์ที่มีการติดเชื้อ

กลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายไคติน (รัฐ, 2544) แบ่งเป็น 2 ประเภท

2.2.2.1 chitinase (chitin glycosylhydrolase) คือเอนไซม์ที่เร่งการตัดไคตินได้ทั้งบริเวณปลายสาย เรียกว่า exochitinase และตัดไคตินภายในสายแบบสุ่ม เรียกว่า endochitinase ให้ผลิตภัณฑ์เป็น *N*-acetylglucosamine, chitobiose, chitotriose หรือไคตินสายสั้นๆ

2.2.2.2 hexosaminidase หรือ chitobiase มี 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกจะตัดสายไคตินจากบริเวณปลายสาย (β-N-acetylglucosaminidase) ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะ β-1,4 ของ chitobiose แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล *N*-acetylglucosamine

ในการย่อยสลายไคติน ช่วงแรกจะเป็นการทำงานของเอนไซม์ chitinase หลังจากนั้นจะเป็นการทำงานของเอนไซม์ chitobiase

ไคตินเป็นสับสเตรทที่เป็นของแข็งไม่ละลายน้ำ และไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน แต่การทำงานของเอนไซม์จะเกิดในสารละลาย ดังนั้น ไคตินที่ใช้เป็นสับสเตรทควรผ่านการบดหรือตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของไคตินซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน

2.2.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. (Mitsutomi และคณะ, 1998), *Vibrio* sp., *Photobacterium* sp., *Aeromonas* sp., *Chromobacterium* sp., *Enterobacter* sp., และแบคทีเรียกลุ่ม gliding ได้แก่ *Cytophage* sp., *Lysobacter* sp., และ *Chitinophaga* sp. แบคทีเรียแกรมบวกส่วนมากจะเป็นกลุ่ม *Actinomycetes* โดยเฉพาะกลุ่ม *Streptomyces* spp. (Ohtakara และคณะ, 1990) กลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ ได้แก่ *Bacillus* sp. (Mitsutomi และคณะ, 1998) และ *Clostridium* sp.

2.2.3.2 รา

ราที่สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนส ได้แก่ *Aspergillus* sp. (Zhang และคณะ, 2000), *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Myrothecium* sp., *Beauvaria* sp., *Coprinus* sp., *Lycoperdon* sp., *Candida* sp., Penicillium sp. (Uchida และคณะ, 1995) และ *Kluyveromyces* sp.

2.3 ประโยชน์ของไคติน ไคโตซาน และเอนไซม์ไคติเนส

1. ด้านการเกษตร

ได้มีการนำไคโตซานมาเคลือบผลผลิตทางการเกษตร(Dien and Binh,1996) ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่ายาฆ่าเชื้อราบางชนิด และปลอดภัยมากกว่า ไคโตซานถูกทดลองใช้ในการเคลือบผิวส้มด้วยความหนาประมาณ 30-35 ไมครอน พบว่าสามารถเก็บรักษาส้มได้นาน 35-40 วัน โดยคุณภาพ เช่น สีของเปลือกนอกไม่เปลี่ยนแปลง และยังได้วิจัยกับผลไม้อื่น เช่น ลูกพีท ลูกแพร กีวี และสตรอเบอรี เพื่อยืดอายุและป้องกันการเน่าเสีย นอกจากนี้ยังใช้เคลือบผิวของผักจำพวกมะเขือเทศ แตงกวา และพริกหยวก พบว่าสามารถลดอัตราการหายใจ ลดการสูญเสียน้ำจากการคายน้ำ และลดอัตราการผลิตก๊าซเอธีลีนที่ทำให้ผลไม้สุกเร็วและยังเป็นฟิล์มกั้นการไหลออกของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ผักผลไม้คงความกรอบ ผิวไม่เหี่ยวย่น สีผิวไม่เปลี่ยนแปลง

ไคโตซาน สามารถเคลือบบนเครื่องเทศ เพื่อรักษาและป้องกันการสูญเสียกลิ่นของเครื่องเทศ จากการสเตอริไรด์ด้วยไอน้ำ(Patent abstracts of Japan, 1998) นอกจากนี้ยังใช้ในการเคลือบบนผิวไข่ เพื่อการเก็บรักษาความสดของไข่ให้ยาวนานขึ้น โดยที่คุณภาพ เช่น ลักษณะของไข่แดง ความหนาของไข่ขาว และรสชาติ ไม่เปลี่ยนแปลง และยังมีผลให้เปลือกไข่มีความแข็งขึ้น ป้องกันการแตก สะดวกแก่การขนส่ง(Patent abstracts of Japan, 1998)

ในระหว่างการขนย้ายหรือในกระบวนการผลิตหลังการเก็บเกี่ยว บางครั้งทำให้ผลผลิตเกิดรอยช้ำ รอยแผล ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดรอยช้ำสีน้ำตาลขึ้น เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

polyphenol oxidase กับสารประกอบพวกฟีนอล เป็นผลให้เกิดสีเข้มของ *O*-quinones ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลกระทบต่อรสชาติและคุณค่าทางอาหารของผลไม้ ในอดีตได้มีการใช้สารพวกซัลไฟต์ (sulphite) ในการยับยั้งการเกิดสีน้ำตาล แต่สารนี้อาจมีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค จึงได้มีการทดลองใช้แผ่นฟิล์มไคโตซานเคลือบลิ้นจี่ เพื่อป้องกันการเกิด enzymatic browning และพบว่าทำให้การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ anthocyanin, flavonoids และ phenolics ช้าลง และยังทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ polyphenol oxidase ลดลง

ไคตินมีสมบัติเป็นตัวกระตุ้นให้พืชสร้างสารป้องกันตัวมันเอง(elicitor)โดยจะกระตุ้นให้พืชสร้างสาร phytoalexin (สุวลี, 2544) เช่น pisatin phaseollin มาต่อต้านเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืช

ไคโตซานสามารถละลายและมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าไคติน (ดังแสดงในตารางที่ 1) เนื่องจากประจุบวกตรงคาร์บอน ตำแหน่งที่ 2 ของ glucosamine (หน่วยย่อยที่เล็กที่สุดของไคโตซาน) ซึ่งสามารถเกิดinteractionกับเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ของจุลินทรีย์ที่มีประจุลบ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีน และสารอื่นของเซลล์ หรือการที่ไคโตซานเป็น chelating agent ซึ่งสามารถเลือกจับโลหะแม้ในปริมาณ น้อยๆ ได้ ทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตสารพิษ (toxin) และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (www.rpc.co.th/newsroom_sub_01.html)

ตารางที่ 1 เชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ไคโตซานมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโต (Shahidi, 1999)

แบคทีเรีย		รา
Gram positive	**Gram negative**	
- Staphylococcus aureus - Listeria monocytogenes - Bacillus cereus	- Escherichia coli - Vibrio parahaemolyticus - Pseudomonas aeruginosa - Shigella dysenteriae - Vibrio cholerae - Aeromonas hydrophila YMI - Aeromonas hydrophila CCRC 13881 - Salmonella tyhlmurium	- Botrytis cinerea - Rhizopus stolonifer - Aspergillus niger - Aspergillus parasiticus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคโตซาน เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของต้นไม้ โดยให้ผลเช่นเดียวกับฮอร์โมนเร่งราก ใช้กระตุ้นการงอกรากของกิ่งชำ ไม้ดอกและไม้ประดับชนิดต่างๆ โดยนำส่วนของพืชที่ต้องการชำ แช่ในสารละลายเจือจางของไคโตซานประมาณ 2 ชั่งโมง ก่อนนำไปปักชำ (Patent abstracts of Japan, 1998)

ไคโตซานถูกใช้ผสมในปุ๋ยน้ำสำหรับพืชไม้ดอก มีข้อดีหลายอย่าง เช่น สามารถยึดติดกับผิวของพืช ผิวดินได้ดี และทนต่อการถูกชะล้าง ลดการระเหยของน้ำ สามารถเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยสารอาหารและยาให้กับพืช ทำให้การกระจายตัวของปุ๋ยน้ำดีขึ้นและมีความคงตัวสูง และลด phytotoxic effect (Struszczyk, 1988)

พืชตระกูลถั่วเป็นพืชที่อุดมไปด้วยโปรตีน ดังนั้นจึงมีความต้องการไนโตรเจนสูงกว่าพืชตระกูลอื่น ถ้าปริมาณไนโตรเจนในดินน้อยเกินไป จะไม่ก่อให้เกิดการสร้างปม และการตรึงไนโตรเจน แต่การให้ไนโตรเจนในอัตราที่สูงเกินไป มีผลให้การเกิดปม (nodulation) และการตรึงไนโตรเจนของพืชลดลงเช่นกัน ไคตินเป็นแหล่งไนโตรเจน(ประมาณ 20%) ที่ได้จากของเหลือจากเปลือกกุ้ง ไนโตรเจนจากไคตินสามารถถูกปลดปล่อยออกมาตามความต้องการของพืช ซึ่งเป็นผลให้เกิดปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเร่งการเกิดปมรากถั่วและการตรึงไนโตรเจน

2. ด้านอาหาร (ก้องเกียรติ, ภาวดี และอศิรา ม.ป.ป.)

ได้มีการทดลองใช้ไคโตซานในกระบวนการผลิตน้ำแอปเปิ้ล และน้ำองุ่น พบว่ามีประสิทธิภาพในการเป็น fining agent ที่ดี และสามารถใช้ในการควบคุมความเป็นกรดของน้ำผลไม้อีกด้วย นอกจากนี้ไคโตซานยังทำให้ไวน์ขาวในตอนเริ่มต้นที่มีสีเหลืองฟางข้าวเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทองสวยงาม และได้นำไคโตซานไปผสมในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เพื่อให้เป็น เนื้อเดียวกัน ไม่ตกตะกอน

3. ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม

พบว่าไคติน ไคโตซาน เป็นตัวเร่งกระบวนการรักษาแผล ช่วยลดการเกิดรอยแผลเนื่องจากป้องกันแผลไม่ให้ติดเชื้อ สามารถดูดน้ำเหลืองจากแผลได้(Minami, 1996) และยังใช้ผลิตไหมละลาย ผิวหนังเทียมที่ทำจาก chitosan-collagen คอนแทคเลนส์ (Markey, 1989) หลอดเลือดเทียม

ไคติน-ไคโตซานซัลเฟต มีความสามารถในการยับยั้งการแข็งตัวของเลือด จึงนำมาใช้ในกระบวนการฟอกเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มีการใช้ไคโตซานในระบบควบคุมการปลดปล่อยยา เนื่องจากไคโตซานมีประจุบวกที่สามารถยึดติดกับพื้นผิวต่าง ๆ ซึ่งมีประจุลบได้ดี และยังประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกิริยา มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Brine, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (inoculum)

นำเชื้อ Actinomycetes (E10) (ได้รับการอนุเคราะห์จากอาจารย์นิสา บุตรดา มหาวิทยาลัยบูรพา) เลี้ยงบนอาหาร Colloidal chitin slant (ภาคผนวก ก 2) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน จากนั้นนำเชื้อมา 1 loop เลี้ยงในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) (ภาคผนวก ก 4) โดยบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วสูง 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.2 การผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไคติน

นำเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้จากขั้นที่ 1 ปริมาณ 1.0% ใส่ในอาหารเหลว Chitin medium (ภาคผนวก ก 3) ปริมาตร 8 ลิตร ในถังหมักขนาด 20 ลิตร (Bio Flo IV, New Brunswick Scientific CO.,INC. U.S.A.) โดยกำหนดให้เจริญในสภาวะการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.3 การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก

แยกเซลล์จุลินทรีย์ออกจากน้ำหมักโดยการตกตะกอน (sedimentation) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใส (supernatant) มาทำให้เป็นผงภายใต้ความดันต่ำและอุณหภูมิต่ำ ด้วยเครื่อง Lyophilizer เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลอง

3.4 การเตรียมสารที่ได้จากการย่อยสลายไคตินเพื่อใช้ทดสอบ

นำผงที่เตรียมได้จากขั้นที่ 3.3 มาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ จากนั้นนำมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองโดย membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน เพื่อใช้ทดสอบขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การเตรียมพืชเพื่อใช้ทดสอบ

3.5.1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดพืชของโหระพา ในขวดทดลอง ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige and Skoog (MS) (ภาคผนวก ก 6) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 1 เดือน

3.5.2 เพาะเมล็ดมะเขือเทศในสภาวะธรรมชาติจนเป็นต้นที่สมบูรณ์อายุ 1 เดือน

3.5.3 เพาะเมล็ดถั่วเขียวโดยนำเมล็ดถั่วเขียวมาแช่น้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเพาะในกระดาษทิชชู่เป็นเวลา 5 วัน

3.6 เตรียมเชื้อราที่ใช้ทดสอบ

นำเชื้อรา *Aspergillus niger* มาเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก 1) โดยนำเชื้อรามา 1 loop แล้ว streak ลงบนอาหาร PDA slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.7 การทดสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยไคตินกับพืช

3.7.1 ต้นโหระพา

หาอิทธิพลของสารที่ได้จากการย่อยไคตินต่อการเจริญเติบโตของต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยนำปลายยอดของโหระพาจากขั้นที่ 3.5.1 ที่มีอายุและขนาดใกล้เคียงกัน มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MS หยดสารที่ได้จากการย่อยไคติน ที่ความเข้มข้นของสาร 5 ระดับ คือ 100 , 1,000 , 5,000 , 10,000 และ100,000 mg/l ลงบริเวณปลายยอดของต้นโหระพาที่อยู่ในขวดเพาะเลี้ยง ขวดละ 20 µl ขวดที่เป็น control จะหยดน้ำแทน แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 1 เดือน ศึกษาการเจริญของพืช

3.7.2 ต้นมะเขือเทศ

วัดการเจริญเติบโตโดยนำต้นมะเขือเทศจากขั้นที่ 3.5.2 มาวัดความสูง คัดเลือกต้นที่มีความสูงใกล้เคียงกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.2.1 จุ่มต้นมะเขือเทศลงในสารที่ได้จากการย่อยไคติน ที่ความเข้มข้นของสาร 5 ระดับ คือ 100 , 1,000 , 5,000 , 10,000 และ 100,000 mg/l ส่วน control คือต้นมะเขือเทศที่จุ่มน้ำแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland เป็นเวลา 8 วัน ศึกษาผลการเจริญของพืชทดสอบโดยการวัดส่วนสูง และหาค่า Growth Index

$$\text{Growth Index} = \frac{\text{ความสูงสุดท้าย - ความสูงเริ่มต้น}}{\text{ความสูงเริ่มต้น}} \qquad (1)$$

3.7.2.2 นำต้นมะเขือเทศมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสารที่ได้จากการย่อยไคตินให้ได้ความเข้มข้นของสาร 4 ระดับ คือ 100, 1,000, 5,000, และ 10,000 mg/l ส่วน control คือ ต้นมะเขือเทศที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ได้ผสมสาร นำไปเพาะเลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 8 วัน ศึกษาผลการเจริญของพืชทดสอบโดยการวัดส่วนสูง และหาค่า Growth Index

3.7.3 ต้นถั่วเขียว

วัดการเจริญเติบโตโดยนำต้นถั่วเขียวจากขั้นที่ 3.5.3 มาชั่งน้ำหนักและวัดความสูง คัดเลือกต้นที่มีน้ำหนักและความสูงใกล้เคียงกัน แยกการทดลองเป็น 3 แบบ

3.7.3.1 แบบที่ 1 ต้นถั่วเขียวที่จุ่มลงในสารที่ได้จากการย่อยไคติน ที่ความเข้มข้นของสาร 8 ระดับ คือ 50 , 100 , 250, 500, 1,000 , 2000, 5,000 และ 10,000 mg/l ส่วน control คือ ต้นถั่วเขียวที่จุ่มน้ำ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเหลวสูตร Hogland ปริมาตร 15 ml นำไปเพาะเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 7 วัน ศึกษาผลการเจริญของพืชทดสอบโดยการชั่งน้ำหนักและวัดส่วนสูง และหาค่า Growth Index จากสมการที่ 1 และ 2

$$\text{Growth Index} = \frac{\text{น้ำหนักสุดท้าย - น้ำหนักเริ่มต้น}}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}} \qquad (2)$$

3.7.3.2 แบบที่ 2 ต้นถั่วเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสารที่ได้จากการย่อยไคตินให้ได้ความเข้มข้นของสาร 8 ระดับ คือ 50 , 100 , 250, 500, 1,000 , 2000, 5,000 และ 10,000 mg/l ส่วน ชุดควบคุม คือ ต้นถั่วเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่ได้ผสมสาร นำไปเพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 7 วัน ศึกษาผลการเจริญของพืชทดสอบโดยการชั่งน้ำหนัก, วัดส่วนสูง และหาค่า Growth Index จากสมการที่ 1 และ 2

3.7.3.3 แบบที่ 3 ต้นถั่วเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรของ Hoagland แต่ขาดธาตุไนโตรเจน (N) เปรียบเทียบกับสูตรที่ผสมสารที่ได้จากการย่อยไคตินให้มีความเข้มข้นของสาร 2 ระดับคือ 100 และ 1,000 mg/l แทนธาตุไนโตรเจน นำมาเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาผลของการเจริญเติบโต และหาค่า Growth Index จากสมการที่ 1 และ 2

3.8 นำสารที่ได้จากการย่อยไคตินมาทดสอบกับเชื้อรา

3.8.1 เตรียม spore suspension ของเชื้อรา

3.8.2 นับจำนวน spore โดยวิธี direct count (ภาคผนวก ข) ให้มีจำนวน spore 10^6 spore/ml

3.8.3 ใช้ cork borrer เจาะที่ผิวหน้าอาหาร PDA เพื่อให้เกิดเป็นหลุมแล้วหยดสารที่เตรียมได้จากขั้นที่ 3.4 ที่มีความเข้มข้น 100 , 1,000 , 5,000 และ 10,000 mg/l หลุมละ 20 µl และอีกชุดหนึ่งหยดหลุมละ 40 µl โดยมี control คือ หลุมที่หยดน้ำกลั่น จากนั้นหยด spore ของเชื้อรา 20 µl ลงในหลุมอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-7 วัน ศึกษาการเจริญของเชื้อรา

3.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราห์วาเรียนซ์ (Analysis of Variance) แบบสุ่มตลอด (Completely Random Design, CRD) (ภาคผนวก ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การนำสาร chitinolytic compound มาทดสอบกับต้นโหระพา

จากการทดสอบสาร chitinolytic compound กับต้นโหระพาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารสูตร MS ในขวดเพาะเลี้ยง ซึ่งจะทดสอบโดยหยดสารละลาย chitinolytic ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ไปที่ยอดของต้นโหระพาปริมาณ 20 ul จากนั้นนำไปเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน แล้วนำมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ผลการทดลองดังแสดงในรูป 2 - 6

รูปที่ 2 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างต้น ชุดควบคุม กับต้นที่หยดสาร chitinolytic ที่มีความเข้มข้น 100 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างต้นชุดควบคุมกับต้นที่หยดสารchitinolyticที่มีความเข้มข้น 1000 mg/l

รูปที่ 4 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างต้น ชุดควบคุมกับต้นที่หยดสารchitinolyticที่มีความเข้มข้น 5000 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รูปที่ 5 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างต้นชุดควบคุม กับต้นที่หยดสารchitinolyticที่มีความเข้มข้น 10,000 mg/l

รูปที่ 6 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างต้นชุดควบคุมกับต้นที่หยดสารchitinolyticที่มีความเข้มข้น 100,000 mg/l

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

47297

4.2 การใช้สาร chitinolytic compound ทดสอบกับต้นมะเขือเทศ โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland

จากการนำสาร chitinolytic compound มาทดสอบกับต้นมะเขือเทศที่ได้จากการปลูกในสภาวะธรรมชาติ ซึ่งจะทดสอบ 2 แบบ คือแบบแรก คือ ผสมสาร chitinolytic ลงไปในอาหารเหลวสูตร Hoagland ให้มีความเข้มข้นต่างๆกัน ส่วนแบบที่สองจะนำต้นมะเขือเทศจุ่มในสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland แล้วนำไปวัดส่วนสูงที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2 แสดงค่า Growth index ของความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นมะเขือเทศในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (mg/l)	Growth index ของความสูงของต้นมะเขือเทศ จำนวนซ้ำที่				เฉลี่ย	SD
	1	2	3	4		
ชุดควบคุม	0.20	0.29	-	0.40	0.30	0.21
100	0.20	0.43	0.37	-	0.33	0.19
1000	0.37	0.40	0.07	0.33	0.28	0.15
5000	0.07	0.22	0.40	-	0.23	0.18
10000	-	-	-	-	-	0

- หมายถึง การตายของพืชที่ทำการทดลอง

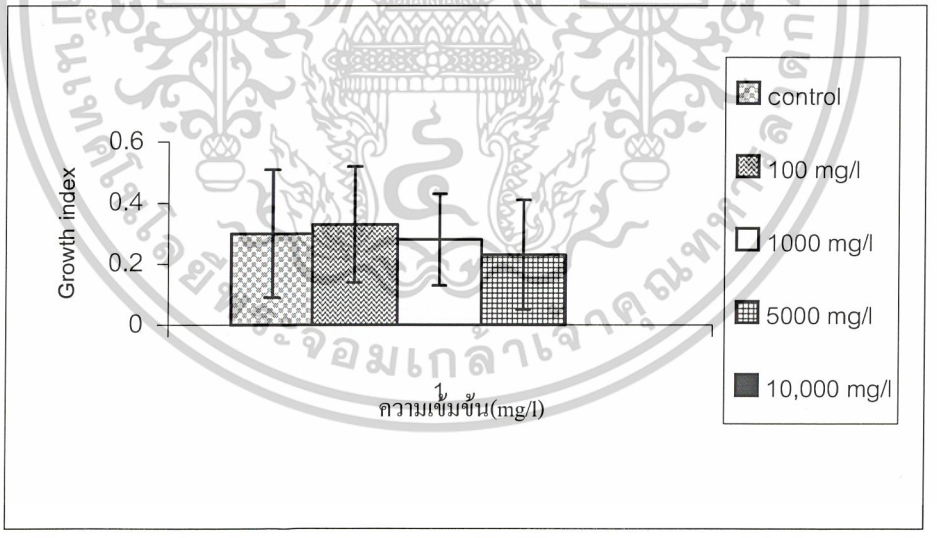
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 2 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของต้นมะเขือเทศในในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F- value	Table F	
					5%	1%
Treatment	4	0.21	0.05	2.5	3.06	4.89
Error	15	0.36	0.02			
total	19	0.57				

sd = 0.1 , sx = 0.07

สรุปผล คือทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบทำให้ค่า Growth index ของความสูงของต้นมะเขือเทศเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%



รูปที่ 7 กราฟแสดงค่า Growth index เฉลี่ยของความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นมะเขือเทศ ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงค่า Growth index ของความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นมะเขือเทศในอาหารเหลวสูตร Hoagland โดยจุ่มต้นมะเขือเทศในสาร chitinolytic compound ที่มีความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (mg/l)	Growth index ของความสูงของต้นมะเขือเทศ				เฉลี่ย	SD
	จำนวนซ้ำที่					
	1	2	3	4		
ชุดควบคุม	-	-	-	0.35	0.35	0.18
100	0.14	-	0.43	0.69	0.42	0.31
1000	0.47	0.73	-	-	0.60	0.36
5000	0.16	0.02	0.33	0.38	0.22	0.14
10000	0.62	0.36	0.39	0.67	0.51	0.16

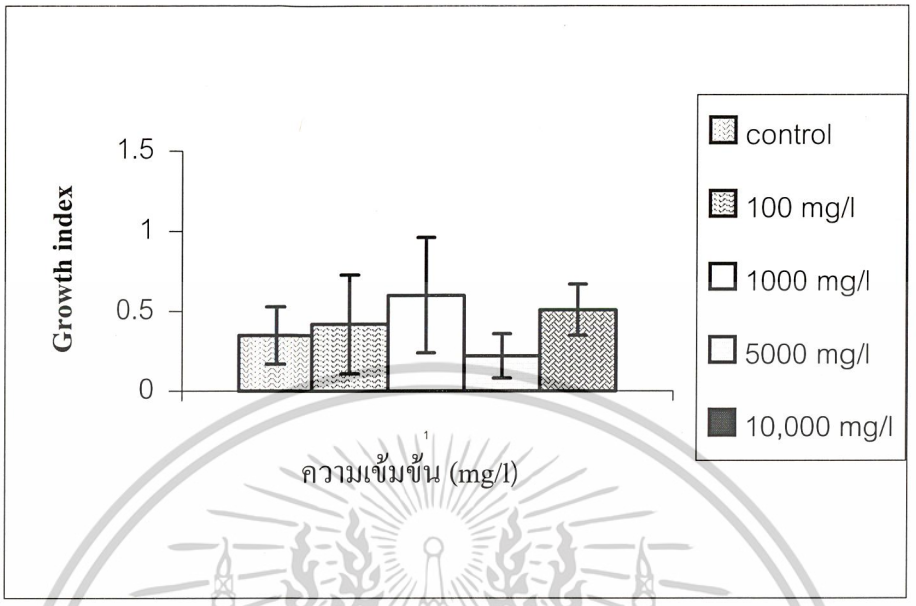
ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 4 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของต้นมะเขือเทศในในอาหารเหลวสูตร Hoagland โดยจุ่มต้นมะเขือเทศในสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F- value	Table F	
					5%	1%
Treatment	4	0.38	0.10	1.67	3.06	4.89
Error	15	0.92	0.06			
total	19	1.30				

sd = 0.17 , sx = 0.12

สรุปผล คือทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบทำให้ค่า growth index ของความสูงของต้นมะเขือเทศเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 กราฟแสดงค่า Growth index เฉลี่ยของความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นมะเขือเทศ ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland โดยจุ่มต้นมะเขือเทศในสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

4.3 การนำสาร chitinolytic compound มาทดสอบกับต้นถั่วเขียว โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland

จากการนำสาร chitinolytic compound มาทดสอบกับต้นถั่วเขียวที่ได้จากการเพาะเมล็ดมีอายุ 5 วัน ซึ่งจะใช้วิธีทดสอบ 2 วิธี คือ แบบแรก ผสมสาร chitinolytic ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปในอาหารเหลวสูตร Hoagland แล้วจึงนำต้นถั่วเขียวมาเพาะเลี้ยง และอีกวิธีจะจุ่มต้นถั่วเขียวในสารละลาย chtinolytic ที่มีความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำต้นถั่วเขียวไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ทั้ง 2 วิธีเลี้ยงต้นถั่วเขียว ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และวัดผลการเจริญโดยการชั่งน้ำหนักและวัดส่วนสูง พบว่าได้ผลแตกต่างกัน ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ ลงไปโดยเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้น (mg/l)	Growth index ของส่วนสูงของต้นถั่วเขียว จำนวนซ้ำที่					เฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5		
ชุดควบคุม	0.1053	0.2340	0.4000	0.3684	0.4487	0.3113	0.14
50	0.2660	0.1158	0.1310	0.4217	0.1895	0.2248	0.12
100	0.1915	0.2660	0.1935	0.2737	0.3596	0.2568	0.07
250	0.2609	0.0947	0.2396	0.4023	0.1702	0.2335	0.11
500	0.3118	0.2043	0.1591	0.2660	0.0737	0.2030	0.09
1000	0.3827	0.3250	0.2824	0.5185	0.3690	0.3756	0.09
2000	0.3023	0.1124	0.2625	-	0.1512	0.2071	0.12
5000	-	0.4125	-	0.4146	0.3580	0.3950	0.22
10000	-	-	-	-	-	-	-

- หมายถึง การตายของพืชที่ทำการทดลอง

ตารางที่ 7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 6 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F- value	Table F	
					5%	1%
Treatment	8	0.86	0.108	7.2**	2.21	3.04
Error	36	0.53	0.015			
total	44	1.39				

** แตกต่างกันทางสถิติที่ 1%

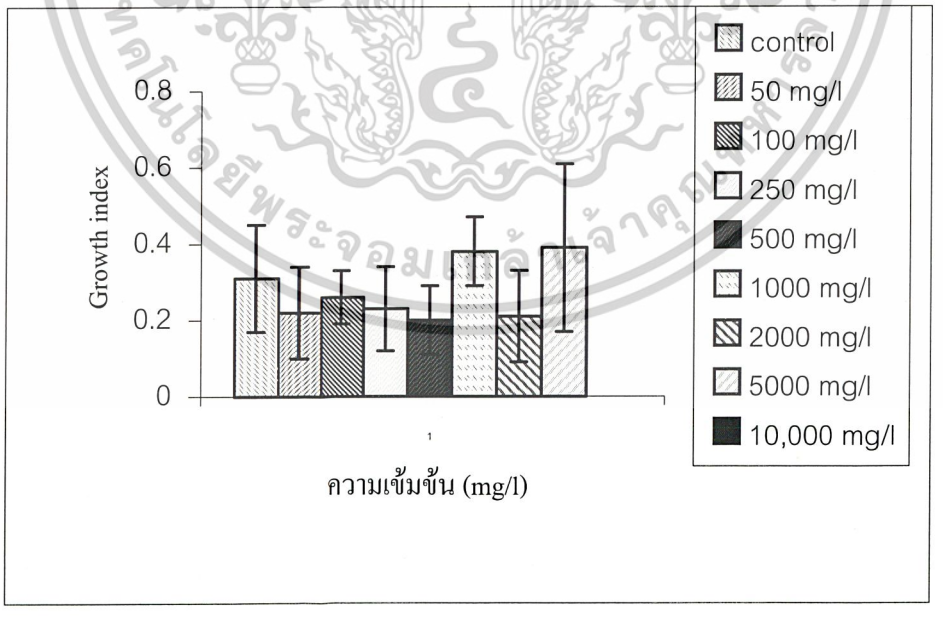
sd = 0.077 , sx = 0.055

สรุปคือ ผลการทดลองนี้ มีความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของสาร chitinolytic compound (treatment)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ด้วยวิธี DMRT

ความเข้มข้นของ chitionlytic compound (mg/l)	ค่า growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียว
0 (ชุดควบคุม)	0.31a
50	0.22a
100	0.26a
250	0.23a
500	0.20a
1000	0.38a
2000	0.21a
5000	0.39a
10000	0b



รูปที่ 9 กราฟแสดงค่า Growth index เฉลี่ยของความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียว ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland โดยจุ่มต้นถั่วเขียวในสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงค่า Growth index ของน้ำหนักของต้นถั่วเขียว ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งผสมสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้น (mg/l)	Growth index ของน้ำหนักของต้นถั่วเขียว (g) จำนวนซ้ำที่					เฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5		
ชุดควบคุม	0.0815	0.0440	0.0650	0.0829	0.0025	0.0552	0.0333
50	0.1190	0.0456	0.0051	0.1691	0.0079	0.0693	0.0722
100	0.0439	0.2815	0.0060	0.2362	0.0050	0.1145	0.1336
250	0.0508	0.0222	0.0902	0.1326	0.0022	0.0596	0.0525
500	0.0008	0.0073	0.1008	0.1799	0.2014	0.0981	0.0936
1000	0.0977	0.0512	0.0243	0.0435	0.0769	0.0587	0.0288
2000	0.0579	0.0396	0.0185	-	0.0598	0.0439	0.0257
5000	-	0.0560	-	0.1629	0.0410	0.0867	0.0125
10000	-	-	-	-	-	-	0

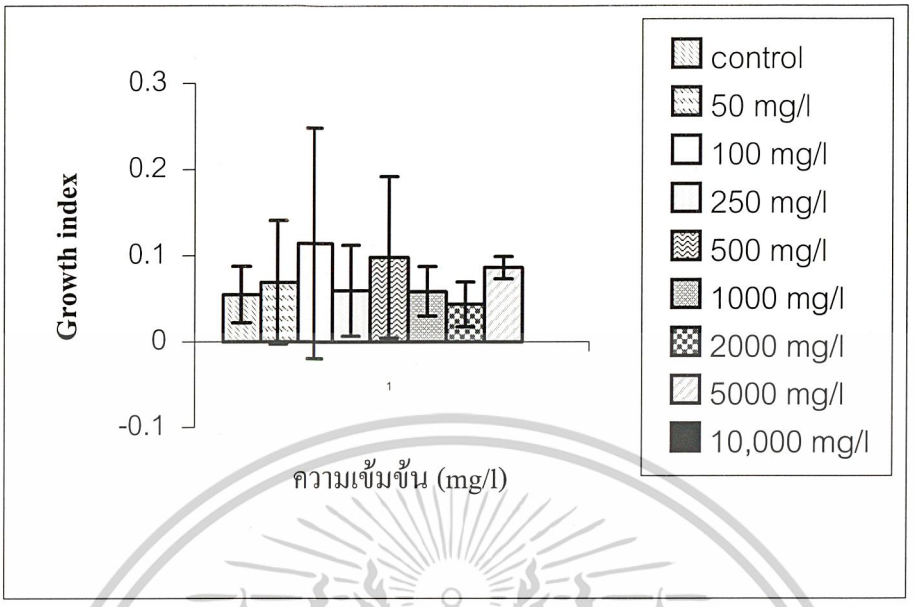
ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของน้ำหนักของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F- value	Table F	
					5%	1%
Treatment	8	0.044	5.5×10^{-3}	1.20	2.21	3.04
Error	36	0.166	4.6×10^{-3}			
total	44	0.210				

Sd = 0.043 , Sx = 0.030

สรุปผล คือทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบทำให้ค่า Growth index ของน้ำหนักของต้นถั่วเขียวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 กราฟแสดงค่า Growht index เฉลี่ยของน้ำหนักของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 11 แสดงค่า Growth index ของส่วนสูงของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งจุ่มต้นถั่วเขียวในสารละลาย chitinolytic compound โดยเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ความเข้มข้น (mg/l)	Growth index ความสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียว (cm) จำนวนซ้ำที่					ค่าเฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5		
ชุดควบคุม	0.6296	0.4824	0.3614	0.5172	0.2954	0.4572	0.13
50	0.4405	0.8667	0.5238	0.6709	0.6933	0.6390	0.16
100	0.6867	0.7722	0.6000	0.4884	0.4302	0.5955	0.15
250	0.3596	0.2022	0.2941	0.3864	0.3494	0.3183	0.07
500	0.2048	0.6750	0.1889	0.3977	0.2824	0.3498	0.17
1000	0.1358	0.6250	0.3766	0.8571	0.2658	0.4521	0.27
2000	0.8571	0.5250	0.7195	0.5897	0.7600	0.6903	0.13
5000	0.3670	0.2386	0.7733	0.5375	0.1860	0.4205	0.23
10000	0.4494	0.1889	0.5000	0.8026	0.7867	0.5455	0.26

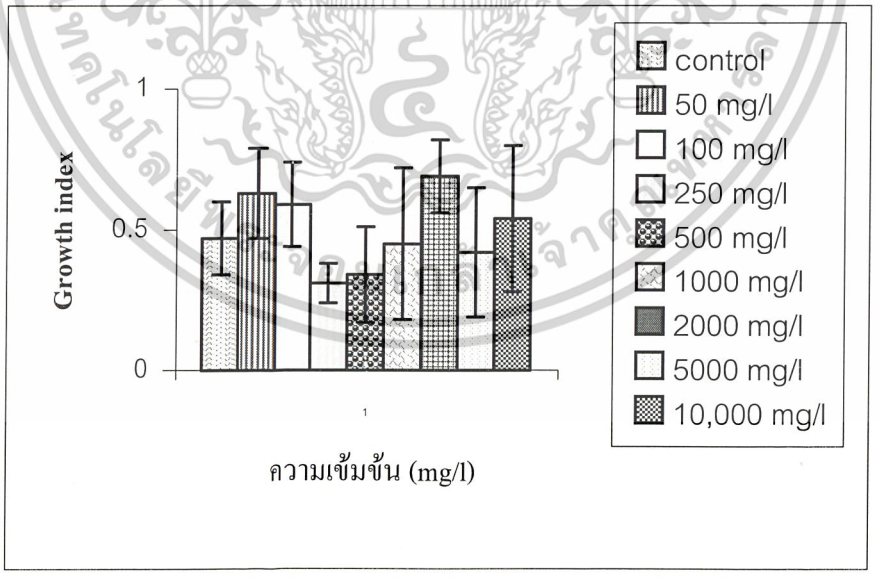
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียว ในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F- value	Table F	
					5%	1%
Treatment	8	0.66	0.08	2.0	2.21	3.04
Error	36	1.34	0.04			
total	44	2.0				

sd = 0.13 , sx = 0.09

สรุปผล คือทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบทำให้ค่า growth index ของส่วนสูงของต้นถั่วเขียวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%



รูปที่ 11 กราฟแสดงค่า Growth index เฉลี่ยของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งจุ่มต้นถั่วเขียวในสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 แสดงค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland เป็นเวลา 7 วัน โดยจุ่มต้นถั่วเขียวในสารละลาย chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

ความเข้มข้น (mg/l)	Growth index ของน้ำหนักของต้นถั่วเขียว จำนวนซ้ำที่					เฉลี่ย	SD
	1	2	3	4	5		
ชุดควบคุม	0.2858	0.1854	0.1495	0.3575	0.2615	0.2479	0.08
50	0.3546	0.3193	0.2632	0.2820	0.3841	0.3206	0.05
100	0.2739	0.2867	0.1345	0.1764	0.2314	0.2206	0.06
250	0.3114	0.1370	0.0444	0.1880	0.1294	0.1620	0.10
500	0.1401	0.2687	0.1967	0.3070	0.1843	0.2194	0.07
1000	0.1555	0.4177	0.0865	0.3924	0.2709	0.2646	0.14
2000	0.4221	0.2052	0.3649	0.4670	0.2026	0.3323	0.12
5000	0.1552	0.2697	0.4636	0.0931	0.2952	0.2553	0.14
10000	0.1713	0.2237	0.3298	0.0621	0.3668	0.2308	0.12

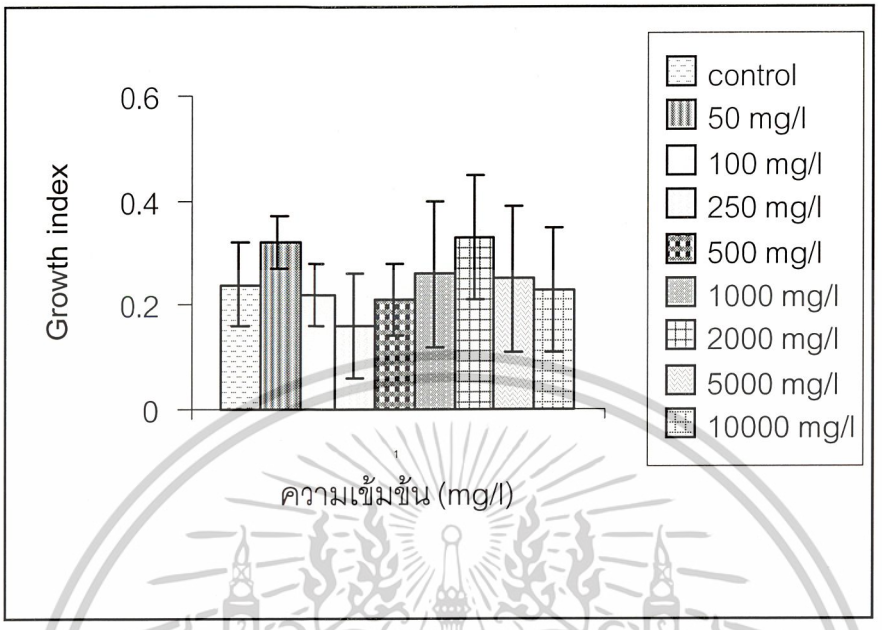
ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 13 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวโดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งถูกจุ่มในสารละลาย chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F- value	Table F	
					5%	1%
Treatment	8	0.11	0.01	1	2.21	3.04
Error	36	0.40	0.01			
total	44	0.51				

Sx = 0.045 , Sd = 0.063

สรุปผล คือทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบทำให้ค่า Growth index ของน้ำหนักของต้นถั่วเขียวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 กราฟแสดงค่า Growth index เฉลี่ยของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ซึ่งจุ่มต้นถั่วเขียวในสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.4 การนำสาร chitinolytic compound มาทดสอบกับต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุไนโตรเจน

จากการทดสอบสาร chitinolytic compound กับต้นถั่วเขียวอายุ 5 วัน ที่ได้จากการเพาะเมล็ดในสภาวะธรรมชาติ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุไนโตรเจน และผสมสารที่ทดสอบความเข้มข้นต่างๆ ลงไปโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาชั่งน้ำหนักและวัดส่วนสูง จะพบว่าที่ความเข้มข้นต่างๆ กันของสารที่นำมาทดสอบจะได้ผลดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 แสดงค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่ผสมสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุ nitrogen โดยเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

ความเข้มข้น (mg/l)	Growth index ของส่วนสูงของต้นถั่วเขียว			เฉลี่ย	SD
	จำนวนซ้ำที่				
	1	2	3		
control	0.2795	0.2484	0.3220	0.2833	0.0369
100	0.3092	0.2786	0.2021	0.2633	0.0551
1000	0.2914	0.2189	0.0648	0.1917	0.1157

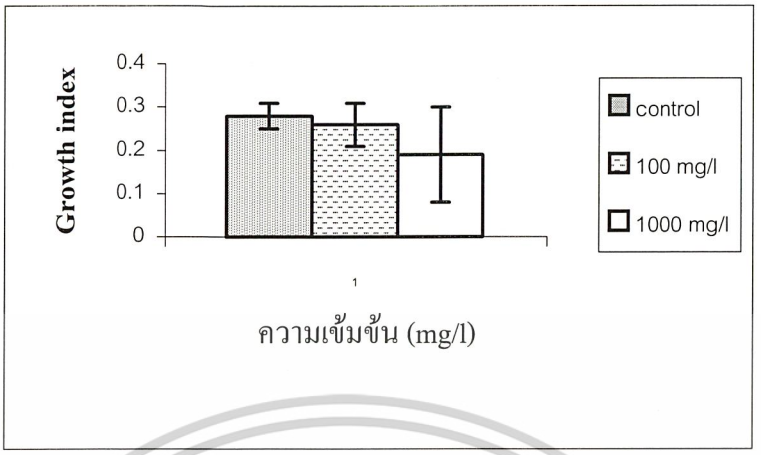
ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 15 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุ nitrogen ที่ผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F- value	Table F	
					5%	1%
Treatment	2	0.014	0.007	1.17	5.14	10.92
Error	6	0.036	0.006			
total	8	0.050				

Sd = 0.063 , Sx = 0.045

สรุปผล คือทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบทำให้ค่า Growth index ของน้ำหนักของต้นถั่วเขียวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 กราฟแสดงค่า Growth index ของส่วนสูงที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุไนโตรเจนโดยการผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

ตารางที่ 17 แสดงค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุ nitrogen ซึ่งผสมสาร chitinolytic compound ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน

ความเข้มข้น (mg/l)	Growth index ของน้ำหนักของต้นถั่วเขียว			เฉลี่ย	SD
	จำนวนซ้ำที่				
	1	2	3		
Control	0.0255	0.1197	0.3690	0.1714	0.18
100	0.3783	0.4744	0.2919	0.3815	0.09
1000	0.2388	0.3206	0.0707	0.2101	0.13

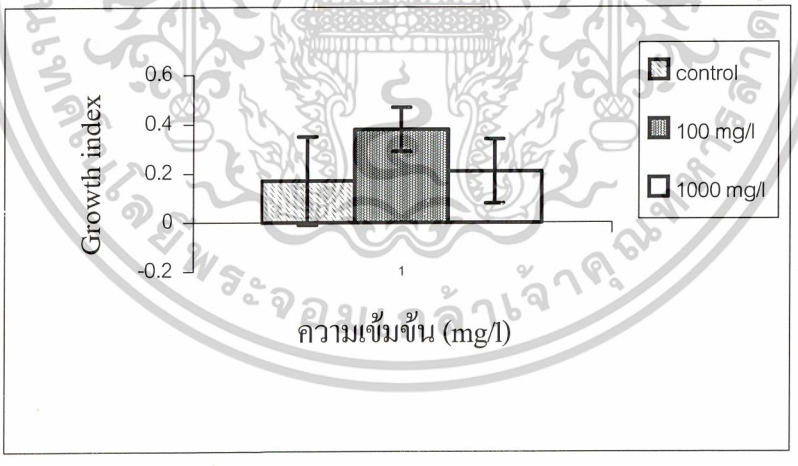
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 17 เพื่อเปรียบเทียบค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ผสมสาร chitinolytic compound

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F- value	Table F	
					5%	1%
Treatment	2	0.075	0.038	2.0	5.14	10.92
Error	6	0.112	0.019			
total	8	0.187				

Sd = 0.11 , Sx = 0.08

สรุปผล คือทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบทำให้ค่า Growth index ของน้ำหนักของต้นถั่วเขียวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 95%



รูปที่ 14 กราฟแสดงค่า Growth index ของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วเขียวที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Hoagland ที่ขาดธาตุไนโตรเจน โดยผสมสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การนำสาร chitinolytic compound มาทดสอบกับเชื้อรา *Aspergillus niger*

จากการทดสอบสาร chitinolytic compound กับเชื้อรา โดยหยดสารละลาย chitinlytic ที่ความเข้มข้นต่างๆ และสปอร์ของเชื้อรา ลงในหลุมซึ่งเจาะบนอาหาร PDA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงวัดขนาดโคโลนีของเชื้อราเพื่อศึกษาว่าสาร chitinolytic compound มีผลต่อเชื้อรา อย่างไร

ตารางที่ 19 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญในหลุมที่มีสาร chitinolytic compound ปริมาณ 20 ul ผสมอยู่ในอาหาร PDA

ความเข้มข้น (mg/l)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา (cm)			เฉลี่ย	SD
	จำนวนซ้ำที่				
	1	2	3		
Control	4.43	4.00	3.87	4.10	0.29
1000	3.90	3.80	4.00	3.90	0.10
10,000	3.90	3.75	3.84	3.83	0.08
100,000	4.44	4.07	4.18	4.23	0.19

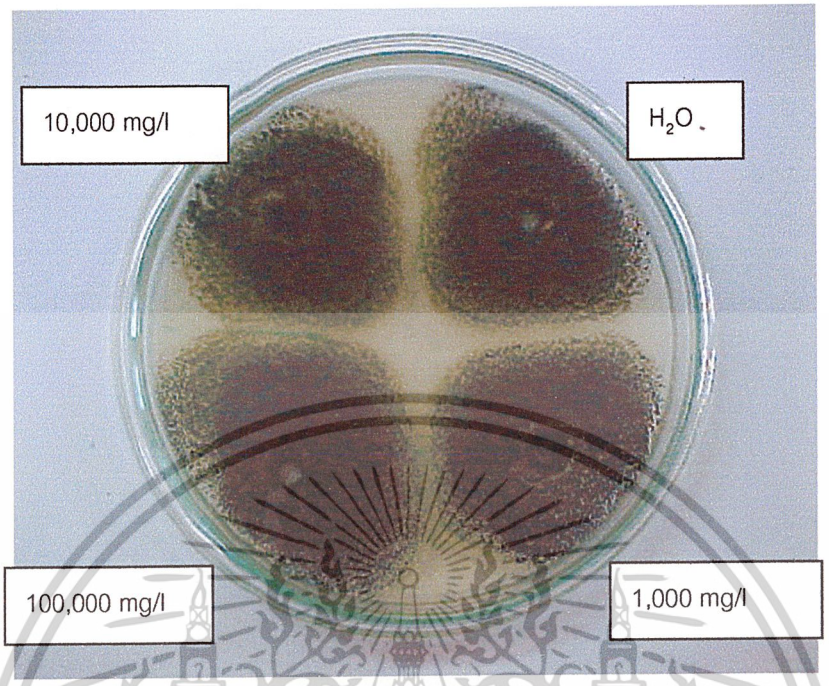
ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger* ในหลุมที่มีสาร chitinolytic ปริมาณ 20 ul ในอาหาร PDA

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F- value	Table F	
					5%	1%
Treatment	3	0.31	0.10	3.33	4.07	7.59
Error	8	0.22	0.03			
total	11	0.53				

Sx = 0.14 , Sd = 0.1

สรุปคือ สารละลาย chitinolytic compound ทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบกับเชื้อราให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 15 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญในหลุมที่มีสาร chitinolytic compound ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 20 ul ผสมอยู่ในอาหาร PDA เทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้น้ำ 20 ul แทนสาร chitinolytic compound

ตารางที่ 21 แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญในหลุมที่มีสาร chitinolytic compound ปริมาณ 40 ul ผสมอยู่ในอาหาร PDA

ความเข้มข้น (mg/l)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา (cm)			เฉลี่ย	SD
	จำนวนซ้ำที่				
	1	2	3		
Control	3.86	3.97	3.27	3.70	0.38
1000	3.78	3.50	3.91	3.73	0.21
10,000	4.05	3.89	3.91	3.95	0.08
100,000	4.20	4.02	3.93	4.05	0.14

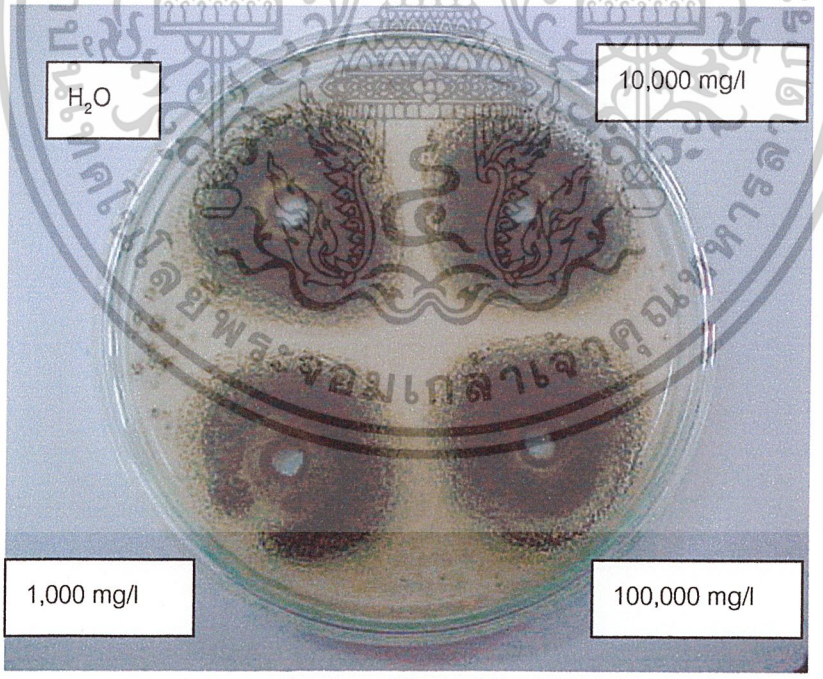
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 ของตารางที่ 21 เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Aspergillus niger* ในหลุมที่มีสาร chitinolytic ปริมาณ 40 ul ในอาหาร PDA

Source of variation	Degree of freedom	Sum of square	Mean of square	F- value	Table F	
					5%	1%
Treatment	3	0.26	0.09	1.80	4.07	7.54
Error	8	0.43	0.05			
total	11	0.69				

Sx = 0.18 , Sd = 0.13

สรุปคือ สารละลาย chitinolytic compound ที่นำมาทดสอบกับเชื้อรา ทุกความเข้มข้นให้ผลไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 16 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เจริญในหลุมที่มีสาร chitinolytic compound ปริมาณความเข้มข้น 40 ul ผสมอยู่ในอาหาร PDA เปรียบเทียบกับหลุมควบคุม ซึ่งหยดน้ำ 40 ul แทนสาร chitinolytic compound

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเมื่อหยดสาร chitinolytic compound ลงบนยอดของต้นโหระพา พบว่าที่ความเข้มข้น 1000, 5000 และ 10,000 mg/l ทำให้ต้นโหระพามีความสูงเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับต้นโหระพาที่ไม่ได้รับสาร เนื่องจากโหระพาสามารถใช้ oligosaccharide เป็นแหล่งคาร์บอนได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แต่ที่ความเข้มข้น 100,000 mg/l จะทำให้ใบหงิกและต้นแคระแกรน

เมื่อทดสอบกับต้นมะเขือเทศ พบว่าสาร chitinolytic compound ทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบ ได้แก่ 100, 1000, 5000, 10,000 และ100,000 mg/l ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศทั้งวิธีที่ผสมสารลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงและวิธีจุ่มใบพืชลงในสารโดยตรง แต่ที่ความเข้มข้น 100,000 mg/l วิธีผสมสารลงในอาหาร ทำให้ต้นมะเขือเทศตาย

เมื่อผสมสาร chitinolytic compound ลงในอาหารเพาะเลี้ยงความเข้มข้น 50-5000 mg/l พบว่าความเข้มข้นดังกล่าวมีผลต่อการเจริญเติบโตของต้นถั่วเขียวไม่แตกต่างกัน และที่ความเข้มข้น 10,000 mg/l ทำให้ต้นถั่วเขียวตาย เมื่อนำต้มถั่วเขียวไปจุ่มในสารโดยตรง พบว่าที่ความเข้มข้น 50 และ 2000 mg/l ทำให้ต้นถั่วเขียวมีน้ำหนักและความสูงเพิ่มขึ้นมากกว่าที่ความเข้มข้นอื่น เมื่อเปรียบเทียบการทดลองทั้งสองแบบ พบว่าการจุ่มต้นถั่วเขียวลงในสาร chitinolytic compound ทำให้ต้นถั่วเขียวมีน้ำหนักและความสูงเพิ่มขึ้นมากกว่าต้นถั่วเขียวที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ผสมสาร chitinolytic compound

เมื่อผสมสาร chitinolytic compound ลงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ขาดธาตุไนโตรเจน เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่าทุกความเข้มข้นที่นำมาทดสอบ ได้แก่ 100, 500, 1000 และ 5000 mg/l ทำให้น้ำหนักและความสูงของต้นถั่วเขียวเพิ่มขึ้นไม่ต่างกับต้นถั่วเขียวที่ไม่ได้รับสาร และการทดลองอาจใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้น จึงไม่เห็นผลของการขาดธาตุไนโตรเจน ดังนั้น ควรเพิ่มระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงให้มากขึ้น

จากผลการทดลอง สามารถกล่าวได้ว่าสาร chitinolytic compound อาจช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชบางชนิด ได้แก่ ต้นโหระพา เมื่อใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แต่เมื่อใช้สารนี้ที่ความเข้มข้นสูงๆ จะทำให้พืชตาย แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองต่อสาร chitinolytic compound ขึ้นอยู่กับ ชนิดของพืชและระดับความเข้มข้นของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบสาร chitinolytic compound กับเชื้อรา *A. niger* พบว่าที่ความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดลองไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา การที่สาร chitinolytic compound ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ อาจเนื่องมาจากเชื้อราชนิดนี้ สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสย่อยสลายไคตินได้ และอาจใช้สาร chitinolytic compound เป็นแหล่งอาหารได้ และสารที่หยดในแต่ละหลุมมีปริมาณตั้งแต่ 0.02-4.0 mg ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมาก จึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดนี้ แต่สารนี้อาจจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อราชนิดอื่นได้ ดังนั้นการนำมาทดสอบกับเชื้อราควรเพิ่มปริมาณสารให้มากขึ้น

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ก้องเกียรติ คงสุวรรณ, ภาวดี เมธะคานนท์ และอศิรา เฟื่องฟูชาติ. [ม.ป.ป.] ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับไคติน-ไคโตซาน. กรุงเทพฯ: ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุศาสตร์แห่งชาติ.

จตุรงค์ รัตน์วิทยากรณ์ และ ฐิติมา ศรีสกุณี. 2539. การผลิตและแยกไคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* ATCC 24905 โดยใช้อาหารแป้ง. โครงงานพิเศษปริญญาตรี. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จรัญ จันทลักขณา. 2540. สถิติวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ. ไทยวัฒนาพานิช.

รัฐ พิชญางกูร. 2544. การตัดไคตินและไคโตซานโดยเอนไซม์. เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติ สู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 41-51

รัตนา รุจิรวนิช. 2544. การผลิตไคติน-ไคโตซาน. เอกสารประกอบการบรรยาย การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติ สู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 1-10

สุวบุญ จิรชาญชัย. 2544. สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคติน-ไคโตซาน. เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติ สู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 11-40

สุวลี จันทร์กระจ่าง. 2544. การประยุกต์ใช้ไคติน/ไคโตซาน. เอกสารประกอบการบรรยายการประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติ สู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 52-58

Chang, K. B., J. Lee and W. Fu. 2000. HPLC Analysis of *N*-acetyl-chito-oligosaccharides during the Acid Hydrolysis of Chitin. Journal of Food and Drug Analysis. 8(2) : 75-83.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dien L. D. and T. Q. Binh. 1996. Research on using chitosan for storage of oranges in Vietnam, Chitin and Chitosan: Proceeding of the 2nd Asia Pacific Symposium, Bangkok, pp. 200-211.

Hirano, S. 1996. Chitin biotechnology applications. Biotechnology Annual Review. 2 : 237-258.

Hirano, S. 1999. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. Polymer International. 48 : 732-734.

Kendra, D. F. and L. A. Hadwiger. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximall antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. Exp. Mycology. 8 : 276-281.

Lim, L-Y., E. Khor and C-E. Ling. 1999. Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan. Journal of Biomedical Material Research. 48(2) : 111-116.

Mitsutomi, M., M. Isono, A. Uchiyama, N. Nikaidou, T. Ikegami and T. Watanabe. 1998. Chitosanase activity of the enzyme previously reported as β-1,3-1,4-glucanase from *Bacillus circulans* WL-12. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (11) : 2107-2114.

Ohtakara, A., H. Matsunaga and M. Mitsutomi. 1990. Action pattern of *Streptomyces griseus* Chitinase on partially N-acetylated chitin. Agric Biol Chem. 54 : 3191-3199.

Patent Abstracts of Japan (1998)

Sashiwa, H., S. Fujishima. N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki and S. Aiba. 2000. Production of *N*-acetyl-D-glucosamine from β-chitin by enzymatic hydrolysis. Chemistry Letters 308-309.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shahidi F., J. K. V. Arachchi and Y-J Jeon. 1999. Food applications of chitosan. Trends in Food Science & Technology, 10 : 37-51.

Struszczyk, H., H. Pospieszny and S. Kotlinski. 1988. Some new applications of chitosan in agriculture, Chitin and Chitosan : Proceedings from the 4th International Comference on Chitin and Chitosan. Elsevier Applied Science, London. PP. 733-742.

Zhang, Y. X., L. A. Dai, K. X. Zhang, K. Kuroiwa, R. Kodaira, M. Shimosaka and M. Okazaki. 2000. Purification and Characterization of chitosanase and Exo-β-D-Glucosaminidase from a Koji Mold, *Aspergillus oryzae* IAM 2660. Biotechnol. Biochem. 64 (9) : 1896-1902.

www.rpc.co.th/newsroom_sub_01.html

www.tuat.ac.jp/~x-ray/chom3.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	250	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1000	มล.
พีเอช	6.0-6.5	

2. อาหาร Colloidal chitin

3.1 ผสมไคตินจากเปลือกกุ้งจำนวน 25 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 600 มิลลิลิตร คนไปเรื่อยๆ จนเปลือกกุ้งมีลักษณะใส จะได้สารละลายที่มีลักษณะเหนียวใส

3.2 ดูดส่วนที่เป็นสารละลายใสทิ้งไปจะได้สารละลายไคตินเข้มข้น นำมากรองด้วยใยแก้ว

3.3 นำสารละลายที่ได้จากการกรองมาใส่ในขวดที่มีน้ำแข็ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน

3.4 ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง ปรับ pH ให้เป็น 7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะได้ colloidal chitin suspension

3. chitin powder

chitin powder	1.0 %	
$NaNO_3$	2.0 %	
Yeast extract	0.1 %	
น้ำ	1000	มล.

4. Nutrient broth (NB)

beef extract	5.0	กรัม
peptone	10.0	กรัม
น้ำ	1000	มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. อาหาร MS สูตรน้ำ

ตารางแสดงองค์ประกอบและวิธีเตรียม stock solution ของสารละลายธาตุอาหาร

สารเคมี	สูตร	กรัม/ลิตร	ความเข้มข้น
1. calcium nitrate	$Ca(No_3)_24H_2O$	236.1	1M
2. potassium nitrate	KNO_3	101.1	1M
3. magnesium sulphate	$MgSO_47H_2O$	246.5	1M
4. potassium dihydrogen phosphate	KH_2PO_4	136.09	1M
5. sodium nitrate	$NaNO_3$	84.09	1M
6. sodium dihydrogen phosphate	NaH_2PO_4	119.97	1M
7. calcium chloride dehydrate cryst	$CaCl_22H_2O$	147.03	1M
8. potassium chloride	KCl	74.56	1M
9. sodium sulphate anhydroue	Na_2SO_4	142.04	1M
10. magnesium chloride	$MgCl_2$	95.23	1M
11. micronutrient : ผสมสารข้างล่าง	(11.1-11.5)	เข้าด้วยกันต่อ	น้ำกลั่น1 ลิตร
11.1 Boric acid	H_3BO_3	2.86	0.5 mg.B/ml
11.2 Copper chloride	$CuCl_22H_2O$	0.05	0.02
11.3 Manganese chloride	$MnCl_24H_2O$	1.81	mg.Cu/ml
11.4 Aine chloride	$ZnCl_2$	0.11	0.5 mg.Mn/ml
11.5 Sodium molybdate	$Na_2MoO_42H_2$	0.025	0.05 mg.Zn/ml
12. Fe-BDTA ประกอบด้วย 5 mg Fe/ml	O		0.01 mg.Mg/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงส่วนประกอบของสารละลายธาตุอาหารที่จำเป็นและขาดธาตุต่างๆ ตามสูตรของ Hoagland (จำนวน มล. ของ stock solution ที่ใช้เพื่อเตรียมสารละลายธาตุอาหาร 2 ลิตร)

Stock solution	สารละลายธาตุอาหารที่ต้องการ							
	complete	-N	-P	-K	-Ca	-Mg	-S	-Fe
1 M $Ca(NO_3)_2$	10	-	10	10	-	10	10	10
1 M KNO_3	10	-	10	10	10	10	10	10
1 M $MgSO_4$	4	4	4	4	4	-	-	2
1 M KH_2PO_4	2	2	-	-	2	2	2	-
Fe-KDTA	2	2	2	2	2	2	2	2
Micronutrient	2	2	2	2	2	2	2	-
1 M $NaNO_3$	-	-	-	10	10	-	-	-
1 M NaH_2PO_4	-	-	-	2	-	-	-	-
1 M $CaCl_2$	-	10	-	-	-	-	-	-
1 M KCl	-	10	2	-	-	-	-	-
1 M Na_2SO_4	-	-	-	-	-	4	-	-
1 M $MgCl_2$	-	-	-	-	-	-	4	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. อาหาร MS

Macroelements	
NH_4NO_3	1650.0
KNO_3	1900.0
KH_2PO_4	170.0
$MgSO_4.7H_2O$	370.0
$CaCl_2.2H_2O$	440.0
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
Na_2EDTA	37.3
Microelements	
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.4H_2O$	8.6
KI	0.83
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Organic constituents	
Sucrose	3%
Inositol	100.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine	0.5
Thiamine.HCl	0.1
Glycine	2.0
Malt extract	See Text
Hormones	
2,4-D	See Text
IAA	See Text
Kinetin	See Text
Agar	1%
pH	5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การตรวจนับสปอร์

การนับจำนวนสปอร์ใช้วิธี direct count ตามวิธีของ Townsend และ Lindgren (1953) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. วาง cover glass ของ haemacytometer ให้อยู่กึ่งกลางสไลด์ ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมแตะที่ขอบ cover glass ให้ตัวอย่างไหลเข้าไประหว่าง cover glass และสไลด์จนเต็มพอดี

2. นับจำนวนสปอร์โดยใช้กำลังขยาย 400โดยนับเป็นสปอร์ที่อยู่ในตาราง และสปอร์ที่คาบเส้นทางด้านล่างและทางด้านขวา จำนวนสปอร์ที่นับควรอยู่ในช่วง 10-30 สปอร์ ใน 1 ช่อง การนับทำตามมุมทแยงซ้ายและขวา รวม 10 ช่อง และนับ 2 ซ้ำ

3. การคำนวณปริมาณสปอร์ต่อมิลลิลิตร

Haemacytometer มีระยะห่างระหว่าง chamber ถึง cover glass เท่ากับ 0.1 มิลลิลิตร และมีความกว้าง ยาวในแต่ละช่องเท่ากันคือ 0.2 มิลลิเมตร ดังนั้นในแต่ละช่องจะมีปริมาตรเท่ากับ 4×10^{-3} ลูกบาศก์มิลลิเมตร

$$\text{จำนวนสปอร์ต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร} = \frac{Y \times 1 \times 10^{6} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{4}$$

Y = จำนวนสปอร์ที่นับได้เฉลี่ยใน 1 ช่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์

Source of Variation	df	SS		Mean Square	F
		definition	operation		
Treatments	t-1	$R\sum_{i=1}^{2} t_i^2$	$\sum_i \frac{(\sum_j Xij)^2}{r} - (\sum_{ij} Xij)^2/rt$	T = SS/df	T/E
Error	t (r-1)	$\sum_i \sum_j e_{ij}^2$	Total - Treatment	E = SS/df	
Total	rt-1	$\sum_i \sum_j (Xij - \bar{x})^2$	$\sum_i \sum_j Xij^2 - (\sum_i \sum_j Xij)^2/rt$		

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตทั้งหมด

Xij = ค่าสังเกตที่ j ในทรีทเมนต์ที่ i

$i = 1,2,\ldots,t \qquad j = 1,2,\ldots,r$

$t_I = \bar{xi} - \bar{x}$

e_{ij} = ความผันแปรของค่าสังเกตตัวที่ j ในทรีตเมนต์ i คือ experimental error มีค่า $Xij - \bar{xi}$

$= Xij - \bar{x} - t_I$

t = จำนวนทรีทเมนตื

r = จำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้