

การผลิตโกลิตินโอดีโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อราที่เจริญโคยะใช้
แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร

CHITIN OLIGOMERS PRODUCTION FROM FUNGAL MYCELIUM
CULTIVATING ON CASSAVA STARCH MEDIUM

เกื้อนเพ็ญ อาริโสง
DUENPEW ARTISONG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อราที่เจริญโดยใช้
แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร

CHITIN OLIGOMERS PRODUCTION FROM FUNGAL MYCELIUM
CULTIVATING ON CASSAVA STARCH MEDIUM



เดือนเพ็ญ อางไธสง

DUENPEN ARTTISONG

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 74426
วัน,เดือน,ปี 28 ก.ย. 2550

b. 11801051
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2550

**CHITIN OLIGOMERS PRODUCTION FROM FUNGAL MYCELIUM
CULTIVATING ON CASSAVA STARCH MEDIUM**

DUENPEN ARTTISONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2007

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตโคติน โอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อราที่เจริญโดยใช้แป้ง มันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร
นักศึกษา	นางสาวเดือนเพ็ญ อาจไรสง
รหัสประจำตัว	46063410
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สมชาย ไกรรักษ์

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะพื้นฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 *Mucor rouxii* และ *Rhizopus oligosporus* พบว่าเชื้อราทั้งสามชนิดสามารถเจริญได้ในอาหาร MYS ซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อราบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณเส้นใยสูงสุดประมาณ 11.24 8.08 และ 8.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำเส้นใยเชื้อราทั้งสามชนิดมาวิเคราะห์โครงสร้างโคติน ไคโตซาน ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด FT-IR พบว่าเส้นใยเชื้อราทั้งสามชนิดมีโคติน ไคโตซานเป็นองค์ประกอบ ซึ่งให้พีคของหมู่เอไมด์ I ในช่วง 1640-1660 ต่อเซนติเมตร และพีคของหมู่ไฮดรอกซิลในช่วง 2920-2930 ต่อเซนติเมตร การผลิตโคติน โอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อราด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์โคติเนส และวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิต่างๆ พบโคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับสภาวะ และระยะเวลาในการย่อย นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ตัวอย่าง ได้แก่ สารละลาย O1 และ O2 และผลิตภัณฑ์จากการย่อยด้วยกรด 1 ตัวอย่าง ได้แก่ สารละลาย O3 มาศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโคติน โอลิโกเมอร์ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส (*Phalaenopsis*) พบว่าโคติน โอลิโกเมอร์กระตุ้นให้กล้วยไม้มีการรอดชีวิตและการเกิดรากใหม่เพิ่มขึ้น ซึ่งกล้วยไม้ที่ผ่านการแช่ในสารละลาย O2 ที่ระดับความเจือจาง 1000 เท่า เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ($p < 0.01$) โดยให้การรอดชีวิตและการเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีความยาวรากเกิดใหม่ประมาณ 94.00 มิลลิเมตร

Thesis Title	Chitin oligomers production from fungal mycelium cultivating on cassava starch medium
Student	Miss. Duenpen Artisong
Student ID	46063410
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2007
Thesis Advisor	Asst.Prof. Dr. Somchai Krairak

ABSTRACT

The morphology and growth of *Monascus* sp.KB20M1 *Mucor rouxii* and *Rhizopus oligosporus* were studied on MYS medium containing cassava starch as a C-source. The maximum dry mycelium weigh was produced by the condition of 250 rpm of rotary shaker at 30°C for 7 days which gave 11.24, 8.08 and 8.15 g/l, respectively. The analysis of FT-IR spectrophotometer on fungal mycelium of three-species showed the composition of chitin-chitosan by the detection of amide I group (1640-1660 cm.⁻¹) and hydroxyl group (2920-2930 cm.⁻¹). The chitin oligomers production was performed on fungal mycelium hydrolysis by biological method (chitinase) and chemical method (phosphoric acid). The retrieved product of chitin oligomers were varied due to the hydrolysis conditions and time-period. The O1 and O2 samples from enzymatic digestion and O3 sample from the chemical digestion were selected for the further study of biological activity on *phalaenopsis* growth. It was found that the chitin oligomers enhanced the survival and rooting of *phalaenopsis*. The *phalaenopsis* which was immersed in the O2 sample at the concentration of 1000-time dilution for 3 hr presented the maximal growth (p<0.01). The survival and rooting was found at 100% and the average length of rooting was about 94.00 mm.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ไขปัญหา ให้ความรู้และข้อคิดเห็นในด้านต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พุกภัย และ รศ.ดร. สุเมธ ธรณารด ซึ่งเป็นคณะกรรมการสอบหัวข้อวิทยานิพนธ์ และโครงร่างวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา และคำชี้แนะในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรที่ให้ทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์นี้ โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทบวงมหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและติดต่อประสานงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณพี่สุภัทร บานเย็น และภาควิชาเคมี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและให้คำแนะนำเกี่ยวกับวิธีการใช้เครื่อง FT-IR

กราบขอบพระคุณ อาจารย์ไกรสร รวยป้อม คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม วิทยาเขตจันทบุรี ที่จัดหาสถานที่และโรงเรือนเพาะชำกล้วยไม้ให้

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคน ในความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดมา

และที่สำคัญ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณพี่ และทุกคนในครอบครัว ที่ให้ความรัก ให้กำลังใจ และเข้าใจผู้วิจัยตลอดมา

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

เดือนเพ็ญ อาจโรสง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญรูป.....	VII
สารบัญตาราง.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบข่ายของโครงการงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ไคติน.....	4
2.2 ไคโตซาน.....	6
2.3 กระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน.....	8
2.3.1 วิธีทางเคมี.....	8
2.3.2 วิธีทางชีวภาพ.....	8
2.4 เอนไซม์ที่ย่อยสลายไคตินและไคโตซาน.....	10
2.4.1 เอนไซม์ไคตินเนส.....	10
2.4.2 เอนไซม์เฮกโซซามีนีเดส.....	11
2.4.3 เอนไซม์ไคโตซานเนส.....	11
2.4.4 เอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส.....	11
2.4.5 ไลโซไซม์.....	12
2.5 คุณสมบัติของเชื้อรา.....	12
2.5.1 เชื้อรา <i>Monascus</i> sp.KB20M1.....	13
2.5.2 เชื้อรา <i>Mucor rouxii</i>	13
2.5.3 เชื้อรา <i>Rhizopus oligosporus</i>	14
2.6 ชีวิตสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานในเชื้อรา.....	15

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.6.1 การสังเคราะห์ไคตินในเชื้อรา.....	15
2.6.2 การสังเคราะห์ไคโตซานในเชื้อรา.....	16
2.7 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้.....	18
2.8 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินและไคโตซานในพืช.....	20
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	20
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	23
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....	23
3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	23
3.1.2 พันธุ์กล้วยไม้.....	23
3.1.3 เอนไซม์.....	23
3.1.4 อุปกรณ์.....	23
3.1.5 เคมีภัณฑ์.....	24
3.2 วิธีการทดลอง.....	25
3.2.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS.....	25
3.2.2 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว MYS.....	25
3.2.3 วิเคราะห์โครงสร้างไคตินและไคโตซานในเส้นใยเชื้อรา.....	25
3.2.4 ศึกษาการผลิตไคตินโพลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วย กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์.....	26
3.2.5 ศึกษาการผลิตไคตินโพลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการย่อย ด้วยเอนไซม์ไคติเนส.....	26
3.2.6 ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินโพลิโกเมอร์ต่อการเจริญของ กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพีซิส.....	26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	28
4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS.....	27
4.1.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS.....	27
4.1.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS.....	28
4.1.3 ลักษณะเส้นใยเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า.....	28

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.2 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว MYS.....	30
4.3 วิเคราะห์โครงสร้างไคตินและโคโตซานในเส้นใยเชื้อรา.....	32
4.4 ศึกษาการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วย กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์.....	34
4.5 ศึกษาการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการใช้เอนไซม์ไคตินเนส ...	38
4.6 ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินโอลิโกเมอร์ต่อการเจริญของกล้วยไม้ สกุลฟาแลนนอฟซิส.....	45
4.6.1 การรอดชีวิตและการเกิดรากใหม่ในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟซิส หลังจากได้รับไคตินโอลิโกเมอร์แล้วเพราะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ ...	45
4.6.2 ลักษณะกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟซิส หลังได้รับไคตินโอลิโกเมอร์แล้ว เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์.....	54
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	61
บรรณานุกรม.....	64
ภาคผนวก ก.....	71
ภาคผนวก ข.....	73
ภาคผนวก ค.....	79
ประวัติผู้เขียน.....	81

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของไคตินเปรียบเทียบกับเซลลูโลส	4
2.2 การเรียงตัวของสายพอลิเมอร์ไคติน	5
2.3 แสดงการย่อยสลายไคติน ณ ตำแหน่งหมู่อะเซทิล โดยสารละลายต่างเข้มข้น หรือ เอนไซม์ (ก) และ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย (ข).....	6
2.4 แบบจำลองแสดงพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intramolecular hydrogen bonding) และระหว่างโมเลกุลของสายโซ่ไคโตซาน (intermolecular hydrogen bonding).....	7
2.5 การผลิตไคติน และไคโตซานจากกระดองปู.....	9
2.6 แบบจำลองการเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายเฮกซะแซคคาไรด์ (hexasaccharide) ด้วยเอนไซม์ไคตินเนส.....	11
2.7 ลักษณะของเชื้อรา <i>Rhizopus oligosporus</i> (ก) rhizoids (ข) sporangiophore (ค) sporangium	15
2.8 แบบจำลองการควบคุมชีวิตสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานบริเวณผนังเซลล์เชื้อรา.....	17
4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS.....	28
4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS.....	29
4.3 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา <i>Monascus</i> sp.KB20M1 ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า.....	30
4.4 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา <i>M. rouxii</i> ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า.....	30
4.5 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา <i>R. oligosporus</i> ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า	31
4.6 ปริมาณแป้งที่เหลือในน้ำหมักและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อราที่เลี้ยง ในอาหารเหลว MYS.....	32
4.7 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างไคตินไคโตซานในเส้นใยเชื้อราด้วยเครื่อง FT-IR.....	33
4.8 ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อยเปลือกกุ้ง ด้วยกรดฟอสฟอริก เข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์.....	35
4.9 ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อยแกนหมึก ด้วยกรดฟอสฟอริก เข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์.....	36
4.10 ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อยเส้นใยเชื้อรา <i>Monascus</i> sp.KB20M1 ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์.....	37
4.11 ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อยเส้นใยเชื้อรา <i>M. rouxii</i> ด้วยกรดฟอสฟอริก เข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์.....	38

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.12 ปริมาณโคตินโอลลิโกเมอร์จากการย่อยเปลือกกุ้ง ด้วยเอนไซม์โคติเนส	39
4.13 ปริมาณโคตินโอลลิโกเมอร์จากการย่อยแกนหมึก ด้วยเอนไซม์โคติเนส	39
4.14 ปริมาณโคตินโอลลิโกเมอร์จากการย่อย <i>Monascus</i> sp.KB20M1 ด้วยเอนไซม์โคติเนส	40
4.15 ปริมาณโคตินโอลลิโกเมอร์จากการย่อย <i>M. rouxii</i> ด้วยเอนไซม์โคติเนส	41
4.16 ลักษณะการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสในกลุ่มควบคุมแช่กล้วยไม้ในน้ำกลั่น ที่เวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์(ก) 6 สัปดาห์ (ข) 10 สัปดาห์ (ค)	54
4.17 ลักษณะการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส ในกลุ่มที่ได้รับสารละลาย O1 ความเจือจางต่างๆ (ระดับความเจือจาง 10 50 100 และ 1000 เท่า) ณ.ระยะเวลา 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก) 6 สัปดาห์ (ข) 10 สัปดาห์ (ค)	56
4.18 ลักษณะการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส ในกลุ่มที่ได้รับสารละลาย O2 ความเจือจางต่างๆ (ระดับความเจือจาง 10 50 100 และ 1000 เท่า) ณ.ระยะเวลา 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก) 6 สัปดาห์ (ข) 10 สัปดาห์ (ค)	58
4.19 ลักษณะการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส ในกลุ่มที่ได้รับสารละลาย O3 ความเจือจางต่างๆ (ระดับความเจือจาง 10 50 100 และ 1000 เท่า) ณ.ระยะเวลา 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก) 6 สัปดาห์ (ข) 10 สัปดาห์ (ค)	60
ข.1 เวลารีเทนชัน (retention time) ของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน (5.022 นาที) โคโตไบโอส (5.882 นาที) โคโตโตรโอส (7.199 นาที) โคโตเตตระโอส (9.076 นาที) โคโตเพนโตส (11.632 นาที) โคโตเฮกโซส (15.082 นาที)	75
ข.2 กราฟมาตรฐานของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน และโคตินโอลลิโกเมอร์ ระหว่างความเข้มข้น กับพื้นที่ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC	76

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรากลุ่มต่างๆ	12
2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของผนังเชื้อรา <i>Mucor rouxii</i> ในลักษณะการเจริญ แบบเซลล์เดี่ยวและแบบเส้นใย	14
2.3 การสังเคราะห์ไคตินและไกลโคซาน โดยเอนไซม์ไคตินซินเทเลส และ เอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส	16
4.1 เพอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย เปลือกกุ้ง แกนหมึก เส้นใยเชื้อรา <i>M. rouxii</i> และเส้นใยเชื้อรา <i>Monascus</i> sp.KB20M1 โดยเอนไซม์ไคตินเนส	43
4.2 เพอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย เปลือกกุ้ง แกนหมึก เส้นใยเชื้อรา <i>M. rouxii</i> และเส้นใยเชื้อรา <i>Monascus</i> sp.KB20M1 โดยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์..	44
4.3 เพอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส เมื่อนำไปแช่สารละลาย O1 O2 และ O3 ที่ระดับความเงื้องาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์	47
4.4 เพอร์เซ็นต์การเกิดรากใหม่ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส เมื่อนำไปแช่สารละลาย O1 O2 และ O3 ที่ระดับความเงื้องาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์	47
4.5 ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส เมื่อนำไปแช่สารละลาย O1 O2 และ O3 ที่ระดับความเงื้องาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์	47
4.6 เปรียบเทียบการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปแช่สารละลาย O1 ที่ระดับความเงื้องาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 10 สัปดาห์	48
4.7 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปแช่สารละลาย O2 ที่ระดับความเงื้องาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 10 สัปดาห์	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.8	
เปรียบเทียบการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟูซี่ส ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปแช่สารละลาย O3 ที่ระดับความเงือจาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 10 สัปดาห์.....	51
4.9	
เปรียบเทียบการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟูซี่ส ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปแช่สารละลาย O1 O2 O3 ที่ระดับ ความเงือจาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไป เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์	52
ค.1	
ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อยเปลือกกุ้ง แคนหมึก เส้นใยเชื้อรา <i>Monascus</i> sp.KB20M1 และ <i>Mucor rouxii</i> ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์.....	78
ค.2	
ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อยเปลือกกุ้ง แคนหมึก เส้นใยเชื้อรา <i>Monascus</i> sp.KB20M1 และ <i>Mucor rouxii</i> ด้วยเอนไซม์ไคติเนส	79

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ไคติน (chitin) เป็นเฮเทอโพลีเมอร์ (heteropolymer) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) เชื่อมต่อกับกลูโคซามีน (glucosamine) ด้วยพันธะเบต้า 1-4 (β -(1-4)) โดยไคตินมีสัดส่วนของหน่วยย่อยเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ และสารละลายอินทรีย์ ซึ่งการตรวจสอบคุณสมบัติโครงสร้างพอลิเมอร์เป็นชนิดไคตินหรือไคโตซาน (chitosan) ทำได้โดยวิธีวัดระดับการกำจัดหมู่อะเซทิล (degree of deacetylation ; DD) การผลิตไคตินและไคโตซานในปัจจุบันอาศัยกระบวนการย่อยสลายทางเคมีภายใต้สภาวะที่รุนแรง โดยใช้อุณหภูมิสูง และสภาพเป็นกรดต่างสูง จึงไม่สามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาได้ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย (ขนาดโมเลกุลพอลิเมอร์มีความยาวต่างกัน) ในเวลาต่อมาจึงได้ปรับปรุงการผลิตโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งอาศัยจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ เพื่อใช้ในการผลิตไคตินไคโตซานในสภาวะที่ไม่รุนแรงและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (อภัยวาท แสงภาเพ็ญ. 2542, Chang และคณะ. 2000, Wang และคณะ. 2002, Krairak และคณะ. 2003, Sashiwa และคณะ. 2003, Nawani และ Kapadnis. 2005)

ไคตินและไคโตซานนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้แก่ ด้านอุตสาหกรรมการแพทย์ เช่น การยับยั้งแบคทีเรีย กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ยับยั้งเนื้องอก การดูดซับไขมัน การสมานแผล การควบคุมการออกฤทธิ์ของยา และกำลังเป็นที่สนใจในการทำวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เพื่อประยุกต์ใช้ในการปลูกถ่ายวัสดุทางการแพทย์ในร่างกายมนุษย์ ด้านอุตสาหกรรมอาหาร เช่น นำมาประยุกต์ใช้เพื่อการถนอมอาหาร การยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร ผสมอาหารเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ เป็นสารกันบูด สารปรุงแต่งเพื่อความคงรูปและสีในอาหาร ใช้เป็นสารเคลือบอาหารและผักผลไม้ ด้านอุตสาหกรรมทางการเกษตร เช่น ช่วยให้สัตว์เจริญเติบโต แข็งแรง มีสุขภาพดี มีภูมิคุ้มกันโรคที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ ด้านงานเชื้อราบางชนิดที่ทำให้เกิดโรครากเน่า โคนเน่าในพืช เป็นตัวกระตุ้นให้พืชสร้างสารป้องกันตัวเอง เป็นต้น (สุวดี จันทร์กระจ่าง. 2544, Assis และ Pessoa. 2004, Ben-Shalom และคณะ. 2003, Kubicek และคณะ. 2001, Muzzarelli และ Muzzarelli. 2003, No และคณะ. 2002, Savard และคณะ. 2002)

เนื่องจากเป็นที่ทราบแน่ชัดว่าโอลิโกเมอร์ของไคตินและไคโตซาน มีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ส่งผลให้การใช้ประโยชน์จากไคตินและไคโตซานเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดปัญหาขาดแคลนวัตถุดิบในการผลิต ซึ่งปัจจุบันวัตถุดิบสำหรับการผลิตไคตินไคโตซานโดยทั่วไปมาจากสัตว์มีกระดูกและเปลือก ได้แก่ ปู กุ้ง และหมีก เป็นหลัก (Win และ Stevens. 2001) เนื่องจากช่วงระยะเวลาและฤดูกาลเพาะเลี้ยงยาวนาน ดังนั้นแหล่งวัตถุดิบทดแทนจึงมุ่งไปที่แมลง และจุลินทรีย์บางชนิด โครงสร้างของแมลงมีไคตินเป็นองค์ประกอบ แต่พบว่ามิใช่มีอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งยากต่อการสกัดแยกไคติน ขณะที่จุลินทรีย์ในกลุ่มเชื้อราได้รับความสนใจอย่างมากเพราะไคตินและไคโตซานที่ผลิตจากวัตถุดิบจำพวกเปลือกกุ้งและปู จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 1.5×10^6 ดาลตัน ขณะที่การใช้วัตถุดิบจำพวกเส้นใยเชื้อราจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำถึงปานกลาง ประมาณ 1.0×10^4 ดาลตัน การผลิตไคตินและไคโตซานโดยใช้วัตถุดิบจากเส้นใยเชื้อรามีข้อดี ได้แก่ ปริมาณไคตินในส่วนประกอบของผนังเส้นใยเชื้อราในระดับสูง เส้นใยเชื้อราปราศจากสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ เส้นใยมีขนาดเล็กช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไคติน และสามารถควบคุมน้ำหนักโมเลกุลของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น (รัตนารุจิรวนิช. 2544, Chatterjee และคณะ. 2005, Hiraga และคณะ. 1997, Sashiwa และคณะ. 2002)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใยเชื้อราโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร
- 1.2.2 ศึกษาความเหมาะสมสำหรับการใช้เส้นใยเชื้อราเพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตไคติน และไคติน โอลิโกเมอร์
- 1.2.3 ศึกษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ไคตินต่อการรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพชีส

1.3 ขอบข่ายของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นไปที่การผลิตไคตินและไคติน โอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา เนื่องจากมีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และยังออกฤทธิ์เทียบเท่าหรือดีกว่าไคโตซานที่ผลิตได้จากเปลือกกุ้ง การทดลองเริ่มจากนำเชื้อราที่สามารถเจริญในอาหารแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ *Monascus* sp.KB20M1 *Rhizopus oligosporus* และ *Mucor rouxii* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ไม่สร้างสารพิษ เชื้อราดังกล่าว นำมาศึกษาการเจริญในสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเส้นใยในอาหาร MYS และศึกษาโครงสร้างไคตินไคโตซานในเส้นใยเชื้อรา ด้วยเครื่องฟูเรียทรานสฟอร์ม-

อินฟราเรด สเปกโทรสโกปี (FT-IR) ศึกษาการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา เปลือกกุ้ง และแกนหมึก ด้วยวิธีทางเคมี โดยใช้กรดย่อยสลาย เพื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์ในการย่อยสลาย จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายมาทดสอบคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพีซิส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถใช้เส้นใยเชื้อราเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตไคติน และ ไคโตซาน เพื่อทดแทนการใช้เปลือกกุ้ง
- 1.4.2 สามารถใช้ประโยชน์จากเชื้อราแบบครบวงจร
- 1.4.3 เพิ่มศักยภาพการผลิตไคตินและไคโตซานให้เพียงพอต่อความต้องการ
- 1.4.4 เพิ่มมูลค่าของแป้งมันสำปะหลัง
- 1.4.5 ใช้เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยเกี่ยวกับคุณภาพวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการเตรียมอนุพันธ์ไคติน
- 1.4.5 ใช้เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยเกี่ยวกับผลของไคตินโอลิโกเมอร์ต่อการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพีซิส

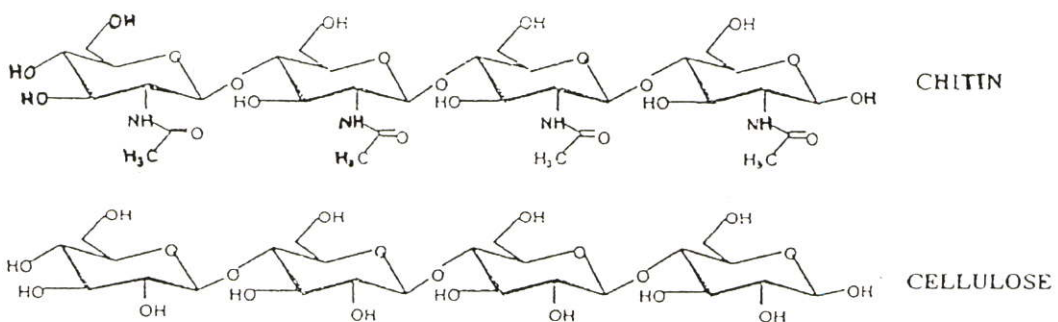
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ไคติน

ไคติน มีชื่อทางเคมีว่า poly - β (1,4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose และมีสูตรทั่วไปคือ $(\text{CH}_2 \text{H}_{13} \text{N O}_3)_n$ โครงสร้างเป็นแบบพอลิแซคคาไรด์มีสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรต แสดงในรูปที่ 2.1 ไคตินพบในธรรมชาติโดยมีปริมาณมากเป็นที่สองรองจากเซลลูโลส (cellulose) ซึ่งสารประกอบไคตินพบมากในเปลือกและโครงสร้างแข็งที่ห่อหุ้มร่างกายของสัตว์จำพวก กุ้ง ปู แมลง และยังพบในส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเห็ดรา และ ยีสต์ ซึ่งมีหน้าที่ปกป้องและให้ความแข็งแรง (รัฐ พิษญากร. 2544, Chatterjee และคณะ. 2005, Win และ Stevens. 2001)

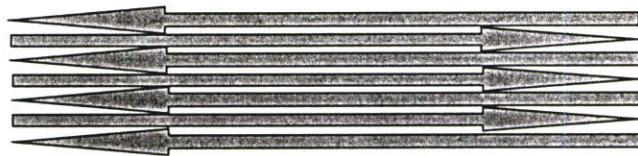
ไคตินมีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลสที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในพืช เพียงแต่หน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นเป็นไคตินนั้นต่างออกไปจากหน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นเป็นเซลลูโลส หน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นมาเป็นเซลลูโลส คือ น้ำตาลกลูโคส (glucose) ส่วนหน่วยย่อยที่ประกอบขึ้นเป็นไคติน คือ น้ำตาลเอ็นอะเซทิลดีกลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์พอลิเมอร์ในกลุ่มของพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide) ประกอบด้วยอนุพันธ์ของน้ำตาลกลูโคสเป็นแกนหลัก (backbone) มีธาตุไนโตรเจนและกลุ่มอะเซทิล (acetyl group ; CO-CH_3) เกาะอยู่ภายในโมเลกุล เรียงต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า 1-4 ไกลโคซิดิก (β (1,4)-glycosidic bond) แต่ละหน่วยโมเลกุลของกลูโคสที่มีหมู่เอมิโน (amino group ; NH_2) กับหมู่อะเซทิลเกาะกันเป็นกลุ่มของเอ็นอะเซทิลดีกลูโคซามีน หรือเรียกว่า พอลิเมอร์ของเอ็นอะเซทิลดีกลูโคซามีน (มีสัดส่วนของหน่วยย่อยเอ็นอะเซทิลดีกลูโคซามีนมากกว่าหน่วยย่อยกลูโคซามีน) (อังคณา โทการกุล. 2540, Aly และคณะ. 2001, Tokuyasu และคณะ. 2000, Kamst และคณะ. 1999, Kren และคณะ. 1998)



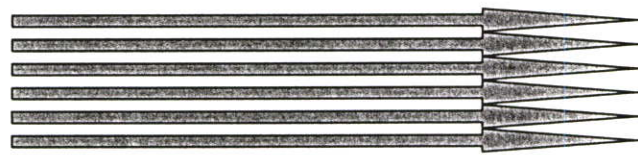
รูปที่ 2.1 โครงสร้างของไคตินเปรียบเทียบกับเซลลูโลส

ที่มา : รัฐ พิษญากร (2544)

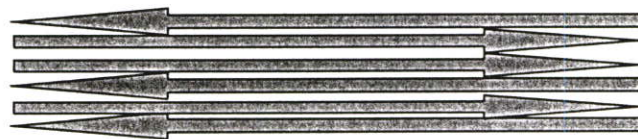
สารไคตินที่พบในธรรมชาติมีโครงสร้างต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยสายของไคตินมีการจัดเรียงตัวได้หลายแบบซึ่งมีความแข็งแรงต่างกันออกไป ลักษณะโครงสร้างของไคตินในธรรมชาติแบ่งได้ 3 แบบ คือ 1) แบบอัลฟา (alpha-chitin หรือ α -chitin) เป็นแบบที่สายพอลิเมอร์จัดเรียงตัวสลับไปมาซ้อนกัน สายพอลิเมอร์เรียงตัวแน่น และแข็งแรง มีความสมบูรณ์ในด้านพันธะไฮโดรเจนทั้งภายใน และระหว่างสายโซ่อย่างเป็นระเบียบทำให้ไคตินไคโตซานมีโครงสร้างเสถียรสูงดังรูปที่ 2.2 (ก) 2) แบบเบต้า (beta-chitin หรือ β -chitin) เป็นแบบที่สายพอลิเมอร์เรียงตัวในทิศทางเดียวกัน สายพอลิเมอร์เรียงตัวได้ไม่หนาแน่นแสดงในรูปที่ 2.2 (ข) 3) แบบแกมมา (gamma-chitin หรือ γ -chitin) เป็นแบบที่สายพอลิเมอร์เรียงตัวไม่เป็นระเบียบไปในทิศทางเดียวกันบ้าง กลับทิศทางกันบ้างแสดงในรูปที่ 2.2 (ค) (รัฐ พิษญากร, 2544, สุวบุญ จิรชาณชัย และคณะ. 2544)



(ก)



(ข)



(ค)

รูปที่ 2.2 การเรียงตัวของสายพอลิเมอร์ไคติน

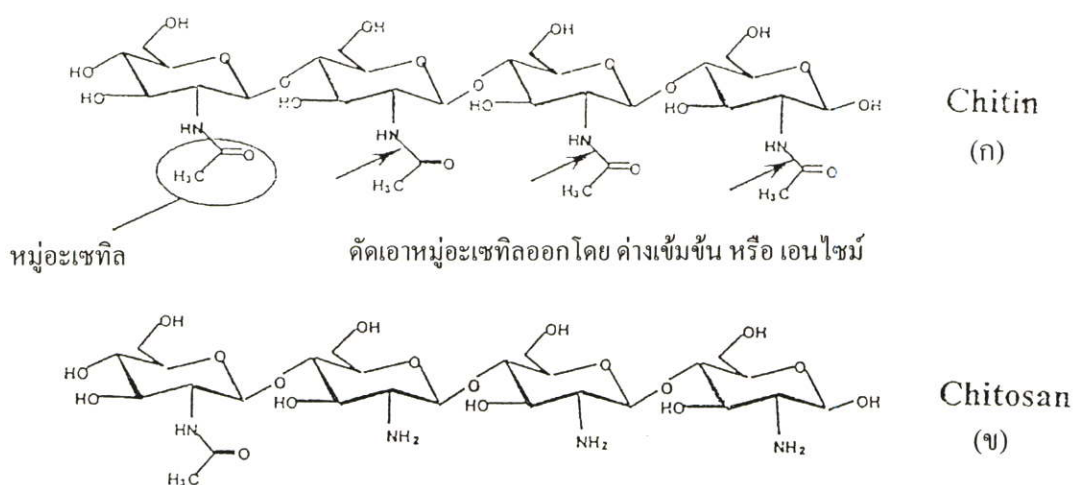
(ก) แบบอัลฟาไคติน

(ข) แบบเบต้าไคติน

(ค) แบบแกมมาไคติน

ที่มา : ดัดแปลงจาก รัฐ พิษญากร (2544)

ไคตินสามารถนำมาเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยการกำจัดหมู่อะเซทิล ออกจากน้ำตาล เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน ด้วยการใชด่างเข้มข้น หรือ เอนไซม์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการตัดกลุ่ม อะเซทิลออกจากน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน (แสดงดังรูปที่ 2.3) ซึ่งทำให้สมบัติหลายประการ ของไคตินเปลี่ยนแปลงไป เมื่อกำจัดหมู่อะเซทิลของไคตินออกไปมากกว่าครึ่งหนึ่ง หรือคิด เป็นร้อยละ 50 ขึ้นไป จะได้สารที่มีสมบัติละลายได้ดีในกรดอินทรีย์อ่อน เช่น กรดน้ำส้มสายชู (acetic acid) กรดแลคติก (lactic acid) ที่พบในนมเปรี้ยวและกรดซิตริก (citric acid) ที่พบใน มะนาว หรือ พีชตระกูลส้ม สารใหม่หรืออนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการกำจัดหมู่อะเซทิลออก จากไคติน เรียกว่า “ไคโตซาน” (รัฐ พิษญากร, 2544)



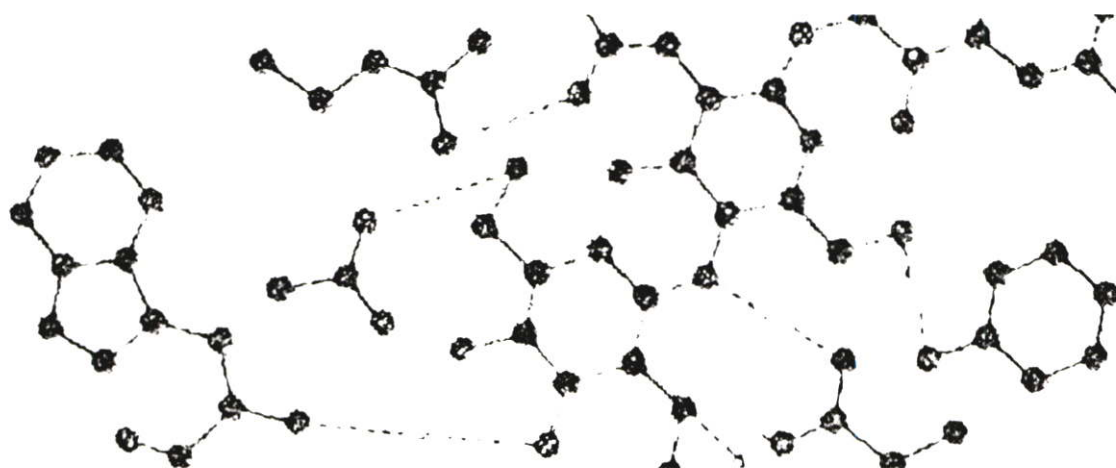
รูปที่ 2.3 แสดงการย่อยสลายไคติน ณ ตำแหน่งหมู่อะเซทิล โดยสารละลายด่างเข้มข้น หรือ เอนไซม์ (ก) และ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย (ข)

ที่มา : รัฐ พิษญากร (2544)

2.2 ไคโตซาน

ไคโตซานมีชื่อทางเคมีว่า poly- β (1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose หรือ พอลิเมอร์ที่มี หน่วยย่อยชนิดน้ำตาลกลูโคซามีน (polymer mono glucosamine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้ จากการย่อยสลายหมู่อะเซทิลออกจากพอลิเมอร์ของไคติน เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า กระบวนการดีอะเซทิลเลชัน (deacetylation) บางครั้งเรียกไคโตซานว่า ดีอะเซทิลเลชันไคติน (deacetylation chitin) เนื่องจากหมู่อะเซทิลของไคตินถูกตัดออกเหลือเพียงหมู่เอมิโนบนคาร์บอน ตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส (pyranose) ไคโตซานมีคุณสมบัติไม่ละลายในตัวทำละลาย ที่เป็นกรดหรือด่าง รวมทั้งกรดอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่างๆ

ณ. อุณหภูมิห้อง และไม่สามารถละลายในน้ำที่มีค่าความเป็นกรดสูงกว่า 6.5 เนื่องจากโครงสร้างที่มีพันธะไฮโดรเจนซึ่งมีลักษณะดังรูปที่ 2.4 แต่ถ้านำไคโตซานมาบดแห้งกับกรดอินทรีย์ จะได้ไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ (water soluble chitosan) ถ้าหมู่อะเซทิลที่ถูกย่อยสลายหรือกำจัดไปประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์จะได้ไคโตซานชนิดที่ไม่มีหมู่อะเซทิล (full deacetylated chitosan) ทำให้คุณสมบัติของไคโตซานต่างจากพอลิเมอร์อื่น ได้แก่ เป็นประจุบวก (cationic polyelectrolyte) เนื่องจากมีหมู่อะมิโนอิสระบนคาร์บอนตำแหน่งที่สอง ทำให้ไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ กรดฟอร์มิกมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-100 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลายที่ดีของไคโตซาน และนอกจากนี้ไคโตซานยังมีคุณสมบัติพิเศษบางประการ เช่น เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymers) ที่สามารถย่อยสลายได้เองโดยกระบวนการทางธรรมชาติ (biodegradable) เป็นพอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูง และมีโครงสร้างสายตรงของเอมีน (linear amine) ที่ทำปฏิกิริยาหรืออยู่ในรูปเกลือของกรดต่างๆ ได้ง่าย (นันทนา นิ่มเจริญนิคม. 2542, Houston และคณะ. 2002)



รูปที่ 2.4 แบบจำลองแสดงพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุล (intramolecular hydrogen bonding) และระหว่างโมเลกุลของสายโซ่ไคโตซาน (intermolecular hydrogen bonding)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Houston และคณะ (2002)

2.3 กระบวนการผลิตไคตินและไคโตซาน

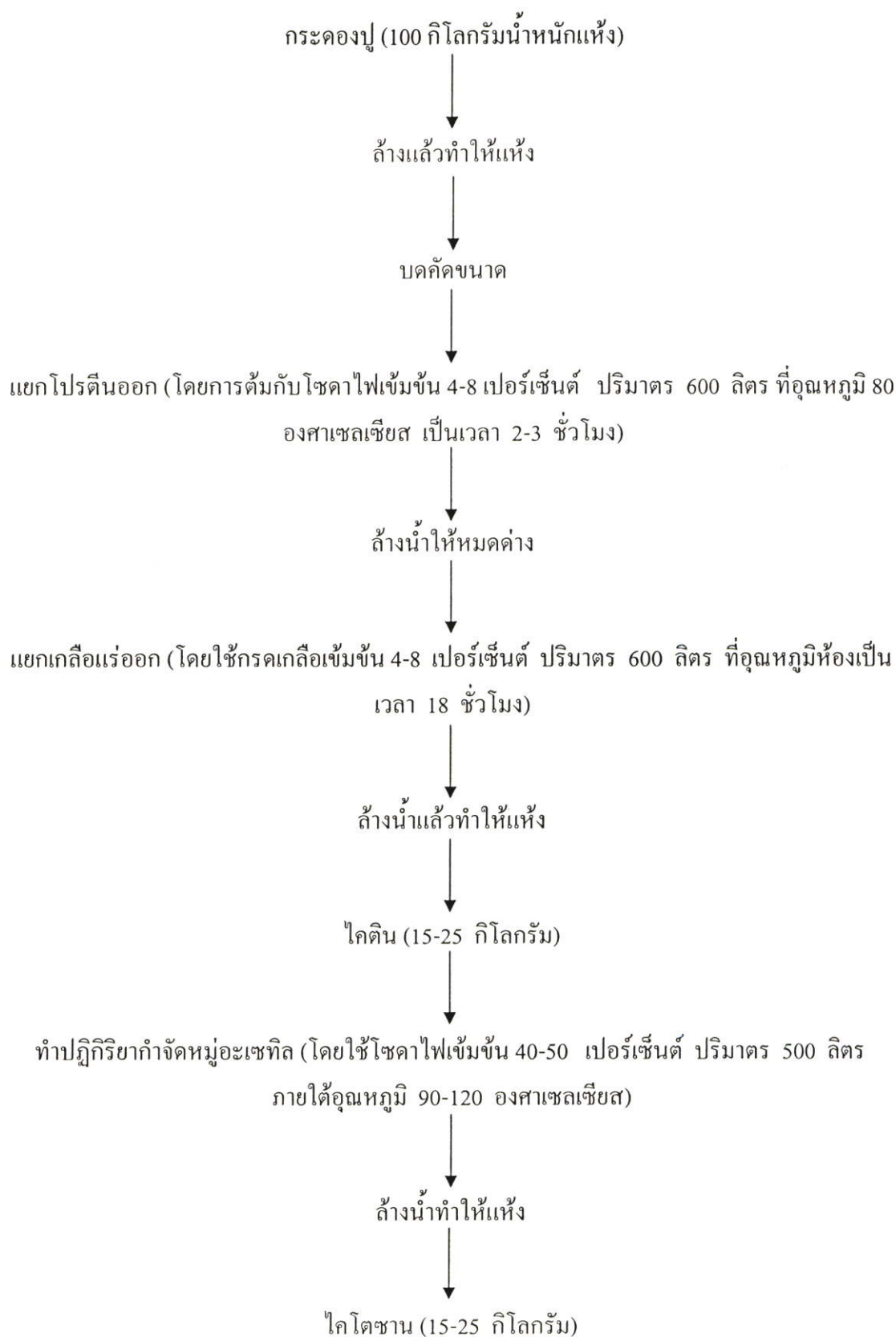
2.3.1 วิธีทางเคมี

กรรมวิธีการผลิตไคโตซานโดยอาศัยปฏิกิริยาเคมีในสภาวะรุนแรงและอุณหภูมิสูง (thermochemistry) เช่น การย่อยสลายเพื่อกำจัดกลุ่มอะเซทิลออกด้วยสารละลายด่างเข้มข้นที่อุณหภูมิสูงภายใต้บรรยากาศไนโตรเจน ซึ่งปริมาณไคโตซานที่ได้สัมพันธ์กับปริมาณการเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะเซทิลที่แตกต่างกันตามปริมาณกลุ่มอะเซทิลที่ถูกย่อยสลายคิดเป็นหน่วยเปอร์เซ็นต์ (เปอร์เซ็นต์ดีดี) (อังคณา โทการกุล. 2540, Sashiwa และคณะ. 2003)

อุตสาหกรรมการผลิตไคตินและไคโตซานจากเปลือกของสัตว์น้ำ เช่น เปลือกปู เปลือกกุ้ง ที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ โดยนำเศษเปลือกมาผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) เจือจาง เพื่อละลายโปรตีน จากนั้นจึงปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายให้เป็นกลาง แล้วจึงนำตะกอนมาทำให้แห้ง ส่วนที่เหลือนำมาปรับด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) เจือจาง เพื่อละลายคาร์บอเนต (carbonate) ที่อยู่ในโครงสร้างเปลือกให้เป็นแคลเซียมคลอไรด์ การเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่อะเซทิลในโครงสร้างของไคตินเริ่มต้นเมื่อเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 40-50 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้อุณหภูมิ 90-120 องศาเซลเซียส ซึ่งจากกระบวนการนี้จะได้ไคโตซาน วิธีการผลิตไคโตซานจากกระดองปูในทางอุตสาหกรรมแสดงดังรูปที่ 2.5 (พิมพ์ทิพย์ โภชนะวิทย์. 2542)

2.3.2 วิธีทางชีวภาพ

การผลิตไคติน และไคโตซานโดยวิธีทางชีวภาพด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิลเลส (chitin deacetylase) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายกลุ่มอะเซทิลออกจากไคตินทำให้เปอร์เซ็นต์การย่อยสลายหมู่อะเซทิลเพิ่มสูงขึ้น โดยไม่ต้องใช้สภาวะที่รุนแรงและเป็นอันตรายดังเช่นวิธีทางเคมี วิธีทางชีวภาพช่วยลดปริมาณด่างที่ใช้ในการผลิตและของเสียที่ออกสู่สิ่งแวดล้อมได้ กระบวนการผลิตสามารถควบคุมการย่อยสลายกลุ่มอะเซทิลออกจากไคติน และนอกจากนี้การใช้เอนไซม์เป็นสารกระตุ้นทางชีวภาพ (biocatalyst) สามารถลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเอนไซม์ถูกทำลายได้ง่ายในกระบวนการย่อยสลายตามธรรมชาติ หรืออาจนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ในการผลิตครั้งต่อไปทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้



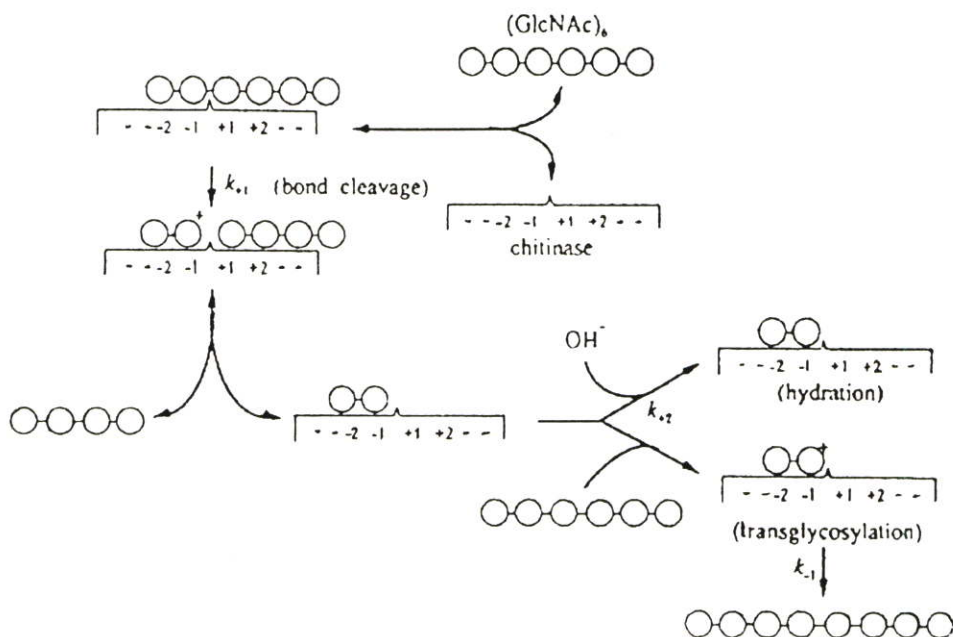
รูปที่ 2.5 การผลิตไคตินและไคโตซานจากกระดองปู
ที่มา : ดัดแปลงจาก พิมพ์ทิพย์ โภชนะวิทย์ (2542)

ถึงแม้ว่าในธรรมชาติจะมีแหล่งของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนไคตินเป็นไคโตซานได้ เช่น เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) เอนไซม์ไคโตซานเนส (chitosanase) เอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส และไลโซไซม์ (lysozyme) แต่มีเพียงบางแหล่งเท่านั้นที่ให้เอนไซม์คุณสมบัติ และสามารถนำเอนไซม์มาใช้ได้โดยสะดวก เอนไซม์จากพืชและสัตว์มีปริมาณน้อยและสกัดแยกออกมาใช้ได้ยาก แม้ว่าใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์เพื่อแยกสารพันธุกรรมและนำมาผลิตเอนไซม์ภายนอกสิ่งมีชีวิตนั้นแล้ว แต่เอนไซม์ที่ได้ก็มักมีสมบัติไม่เหมาะสมแก่การนำมาประยุกต์ใช้ ประกอบกับขั้นตอนการผลิตที่ยังยากทำให้เอนไซม์จากพืชและสัตว์ไม่เป็นที่นิยม เอนไซม์จากจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียและรา พบว่ามีศักยภาพสูงเพียงพอต่อการที่จะนำมาประยุกต์ใช้ เนื่องจากเหตุผลบางประการ ได้แก่ จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถเพิ่มจำนวนได้ง่าย ผลิตเอนไซม์ในปริมาณมาก และเอนไซม์ที่ได้มีความเสถียรสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่หลากหลาย ดังนั้นนักวิจัยจึงได้ทำการศึกษาเอนไซม์จากแบคทีเรียและราหลายชนิดเพื่อศึกษากลไกการทำงาน และศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ (รัฐ พิษญากร. 2544)

2.4 เอนไซม์ย่อยสลายไคติน และ ไคโตซาน

เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคตินและไคโตซาน พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด สัตว์และจุลินทรีย์ที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบจะสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ทั้งสิ้น เนื่องจากต้องใช้ในขั้นการลอกคราบ หรือแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต ส่วนสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีไคติน ไคโตซานเป็นองค์ประกอบก็สามารถพบเอนไซม์เหล่านี้ได้เช่นกัน เอนไซม์ย่อยสลายไคตินและไคโตซานจะมีสมบัติและการทำงานที่แตกต่างกันออกไป จึงสามารถแบ่งได้เป็น

2.4.1 เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase : EC 3.2.1.14, glycosylhydrolase family 18 and 19)
 เอนไซม์เร่งการย่อยสลายไคตินบริเวณปลายสาย และภายในสาย ให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนต่อกัน 2 โมเลกุล (ไคโตไบโอส, chitobiose) น้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนต่อกัน 3 โมเลกุล (ไคโตไตรโอส, chitotriose) หรือสายไคตินสั้นๆ (short oligomers) ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีขนาดสายโมเลกุลจำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ย่อยสลายดังแสดงในรูปที่ 2.6 เอนไซม์ไคตินเนสแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แฟมิลี 18 และ 19 ตามกลไกการเกิดปฏิกิริยา และโครงสร้างของเอนไซม์ (Sasaki และคณะ. 2002)



รูปที่ 2.6 แบบจำลองการเกิดปฏิกิริยาการสลายเฮกซะแซคคาไรด์ (hexasaccharide) ด้วยเอนไซม์ไคตินเนส

ที่มา : Sasaki และคณะ (2002)

2.4.2 เอนไซม์เฮกโซซามินิเดส หรือ เอนไซม์ไคโตไบเอส (hexosaminidase หรือ N-acety- β -hexoaminidase หรือ chitinase : EC 3.2.1.52, glycosylhydrolase family 3 and 20) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการย่อยสลายไคตินจากบริเวณปลายสาย หรือ เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไคโตไบเอส แล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน 2 โมเลกุล (รัฐ พิษญากร. 2544)

2.4.3 เอนไซม์ไคโตซานเนส (chitosanase : EC 3.2.1.132, glycosylhydrolase family 46) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการย่อยสลายสายไคโตซานโดยไม่ย่อยสลายสายไคตินและให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคซามีน หรือ น้ำตาลกลูโคซามีน 2 โมเลกุล (รัฐ พิษญากร. 2544, Shimono และคณะ. 2002)

2.4.4 เอนไซม์ไคตินดีอะเซทิลเลส (chitin deacetylase : EC 3.5.1.41) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายหมู่อะเซทิลออกจากโมเลกุลของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนในพอลิเมอร์ของไคติน ทำให้ได้ไคโตซานที่มีเปอร์เซ็นต์การย่อยสลายหมู่อะเซทิลในระดับแตกต่างกัน และจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปของกรดอะซิติกอิสระ (Win และ Stevens. 2001)

2.4.5 ไลโซไซม์ (lysozyme หรือ Endo- β -N-acetylmuramidase : EC 3.2.1.17) แยกได้จากเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แมลง พืช นก และจุลินทรีย์ โดยสามารถย่อยสลายไกลแคน (glycan) ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ของ N-acetylglucosaminyl-N-

acetylmuramic acid ขณะที่เอนไซม์ในกลุ่ม endo- β -N-acetylglucosaminidase เมื่อย่อยสลายจะให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลแซคคาไรด์กับกลุ่มของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีนที่ด้านปลายสายรีดิวซ์ (reducing end) (นันทนา นิมเจริญนิคม. 2542, Masaki และคณะ. 1981, Fukamizo และคณะ. 1986)

2.5 คุณสมบัติของเชื้อรา

เชื้อราส่วนใหญ่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ 80 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในรูปของพอลิเมอร์แซคคาไรด์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไคติน ไคโตซาน เซลลูโลส กลูแคน และแมนแนน เป็นต้น เชื้อราที่มีความแตกต่างกันด้านปริมาณ และการรวมตัวของพอลิแซคคาไรด์ต่างชนิดกัน ทำให้เชื้อราแต่ละสายพันธุ์มีความเป็นเอกลักษณ์ จึงนำมาใช้จำแนกคุณสมบัตินี้มาใช้จำแนกเชื้อราออกมาเป็นกลุ่มๆ ได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 พอลิแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรากลุ่มต่างๆ

พอลิแซคคาไรด์	กลุ่มเชื้อรา	ตัวอย่างเชื้อรา
cellulose- β -glucan	Oomycetes ^a	<i>Phytophthora, Pythium, Saprolegnia</i>
cellulose-chitin	Hyphochytridiomycetes	<i>Rhizodimycetes</i>
chitin-chitosan	Zygomycetes	<i>Mucor, Phycomyces, Zygorhynchus</i>
chitin- β -glucan	Chytridiomycetes	<i>Allomyces, Blastocladiella, Neurospora</i>
	Ascomycetes	<i>Ajellomyces, Monascus</i>
	Deuteromycetes	<i>Aspergillus</i>
	Basidiomycetes	<i>Shizophyllum, Fomes, Polyporus</i>
mannan- β -glucan	Ascomycetes	<i>Saccharomyces^b, Candida</i>
chitin-mannan	Basidiomycetes	<i>Rhodotorula</i>
galactosamine	Trichomycetes	<i>Amoebidium</i>

หมายเหตุ a อาจจะมีพบไคตินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อราในกลุ่ม Oomycetes ใน genus *Apodachyla* (Lin และ Kolattukudy. 1980)

b หน่อ (bud) ของ *S. cerevisiae* มีไคตินเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Hartwell และ Phaff. 1974)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Bartnicki-Garcia. 1969

2.5.1 เชื้อรา *Monascus* sp.

Monascus sp. จัดอยู่ใน Class Ascomycetes ซึ่งเป็นเชื้อราที่ภายในเส้นใยมีผนังกัน (septate mold) สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) ไว้ในแอสคัส (ascus) ปกติแล้วเชื้อราในกลุ่มนี้จะสร้างแอสคัสจำนวนมากภายในแอสโคคาร์ป (ascocarp) (Alexopoulos และ Mims. 1979)

Monascus sp. สร้างแอสคัสภายในแอสโคคาร์ปที่มีรูปร่างกลม โดยจะเกิดบนก้าน (stalk) ที่มีผนังกันก็ได้ แอสโคคาร์ปเกิดขึ้นบนเส้นใยแบบโฮโมแทลลิก (homothallic) โดยสร้างโครงสร้างออกมา 2 ชนิด ได้แก่ แอนเทอริเดียม (antheridium) และ แอสโคโกเนียม (ascogonium) แล้วหลอมรวมกัน (fusion) ที่ปลายแอสโคโกเนียมกับส่วนฐาน หรือส่วนกลางของแอนเทอริเดียม จากนั้นจึงมีวิวัฒนาการต่อไป (Carels และ Shepherd. 1975)

2.5.2 เชื้อรา *Mucor rouxii*

Mucor rouxii อยู่ใน Subdivision Zygomycotina ซึ่งเป็นเชื้อราพวกที่ไม่มีผนังกันภายในเส้นใย (coenocytic fungi) ไม่มีแฟลกเจลลา (flagella) และมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยสร้างไซโกสปอร์ (zygospore) ลักษณะเด่นของเชื้อราในกลุ่มนี้ ได้แก่ ผนังเซลล์ประกอบด้วยไคติน และไคโตซานในปริมาณสูง Class Zygomycetes เป็นพวกดำรงชีวิตโดยการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ และแบบเป็นปรสิต (parasite) ในกรณีดำรงชีวิตแบบปรสิตจะมีเส้นใยเจริญแทงทะลุภายในเนื้อเยื่อของเหยื่อ (host) Order Mucorales ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ มีชื่อเรียกต่างๆ ได้แก่ ราเข็มหมุด (pin fungi) หรือ ราน้ำตาล (sugar fungi)

Family Mucoraceae สายพันธุ์ *Mucor* และ *Absidia* เป็นเชื้อราที่พบได้ตามพื้นดิน บางสายพันธุ์ของ *Mucor* พบได้ในมูลสัตว์ Genus *Mucor* มีสายพันธุ์ย่อย 600 สายพันธุ์ เส้นใยมีลักษณะหยาบ อาศัยอยู่ในสภาวะที่มีน้ำ เส้นใยแตกแขนงมากมาย ผนังกันเซลล์ (septate) ปรากฏเมื่อเส้นใยมีอายุมาก สปอร์สร้างขึ้นใกล้ๆ กับผนังกันเซลล์ ถ้าเจริญในอาหารเหลวที่สภาวะไร้อากาศ (anaerobic liquid culture) ส่งผลให้ *Mucor* หยุดการเจริญเป็นเส้นใย และสร้างเซลล์เดี่ยวซึ่งมีลักษณะคล้ายเซลล์ยีสต์ (yeast-like bodies) จากนั้นสามารถเจริญกลับมาสร้างเส้นใยได้อีกครั้งเมื่ออยู่ในสภาวะมีอากาศ ส่วนประกอบของผนังเซลล์จะแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 2.2 (พิไลวรรณ พงษ์พูล. 2525, Lubbehusen และคณะ. 2003)

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบทางเคมีของผนังเชื้อรา *Mucor rouxii* ในลักษณะการเจริญแบบเซลล์เดี่ยว และแบบเส้นใย

ส่วนประกอบ	เส้นใย (เปอร์เซ็นต์)	เซลล์เดี่ยว (เปอร์เซ็นต์)
ไคติน	9.4	8.4
ไคโตซาน	32.7	27.9
Undetermined-aminosugar	2.4	3.1
Fucose	3.8	3.2
Mannose	1.6	8.9
Galactose	1.6	1.1
Carbohydrate อื่นๆ	1.7	0.9

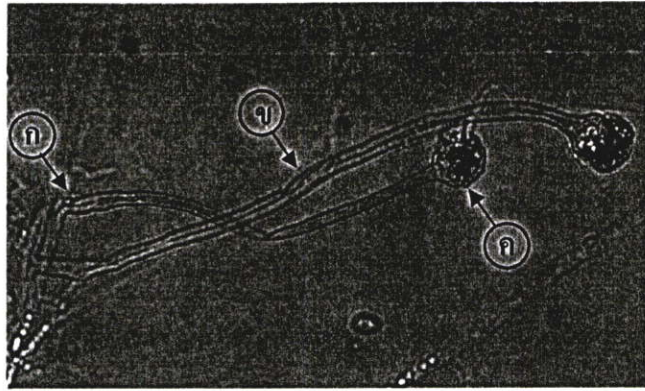
ที่มา : พิไลวรรณ พงษ์พูล. 2525

Mucor rouxii เมื่อเจริญในลักษณะเซลล์คล้ายเซลล์ยีสต์จะมีผนังเซลล์หนากว่าเดิมประมาณ 10 เท่า แต่ในขณะที่เดียวกันการเรียงตัวประสานกันของเส้นใยเล็กเป็นแบบหลวมๆ คล้ายกับแยกกันเป็นสองชั้น ได้แก่ ชั้นนอกและชั้นใน แต่ละชั้นเรียกว่า “ลามลลา (lamella)” โดยทั่วไปผนังเซลล์จะมีลามลลาประมาณสองชั้นขึ้นไป และมากขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ

เนื่องจากส่วนใหญ่ *Mucor* ดำรงชีวิตแบบย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วความสำคัญทางอุตสาหกรรม ได้แก่ การผลิตกรดฟูมิก กรดแลกติก เอนไซม์ต่างๆ เป็นต้น (พิไลวรรณ พงษ์พูล. 2525)

2.5.3 เชื้อรา *Rhizopus oligosporus*

Rhizopus oligosporus อยู่ใน Subdivision Zygomycotina เชื้อราในกลุ่มนี้ไม่มีผนังกันภายในเส้นใย ไม่มีแฟลกเจลลา และสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างไซโกสปอร์ Class Zygomycetes Order Mucorales ซึ่งดำรงชีวิตโดยการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์และเป็นปรสิต Genus *Rhizopus* ลักษณะเส้นใยสีขาวฟู ชูสปอร์ขึ้นไปในอากาศ มีไรซอยด์ในตำแหน่งที่ฐานของสปอร์แรงจิโอฟอร์ (sporangiophore) และสโตลอนส์ (stolons) ดังรูปที่ 2.7 สปอร์แรงจิโอฟอร์ไม่มีการแตกกิ่งก้าน สปอร์แรงเกียม (sporangium) มีรูปร่างกลมสีดำหรือน้ำตาลเข้ม (วรารุณี ครูส่ง. 2532)



รูปที่ 2.7 ลักษณะของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* (ก) rhizoids (ข) sporangiophore
(ค) sporangium

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก วราวุฒิ ครูส่ง (2532)

2.6 ชีวสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานในเชื้อรา

2.6.1 การสังเคราะห์ไคตินในเชื้อรา

การสังเคราะห์ไคตินเกิดขึ้นภายในพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) โดยอาศัย เอนไซม์ไคตินซินเทส (chitin synthase) เพื่อสลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ในสาย นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และยูริดีน ไดฟอสโฟเอินอะเซทิลกลูโคซามีน (uridine diphospho-N-acetyl-glucosamine หรือ UDP-GlcNAc) เซลล์เชื้อราเก็บเอนไซม์ไคตินซินเทสในรูปของ ไมโครเวซิเคิล (microvesicle) หรือเรียกว่า ไคโตโซม (chitosome) ภายในไคโตโซมมีเอนไซม์ 45-65 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ส่วนที่เหลืออยู่ในพลาสมาเมมเบรน

การสังเคราะห์เกิดขึ้นเมื่อไมโครเวซิเคิลสร้างเมมเบรนชั้นใหม่ โดยสังเคราะห์เส้นใยไคตินขนาดเล็กจำนวนมาก (chitin microfibrils) และสะสมรวมเป็นผลึกสายโซ่ การสังเคราะห์เส้นใยไคตินอาศัยยูริดีน ไดฟอสโฟเอินอะเซทิลกลูโคซามีนที่ส่งมาจากภายนอกพลาสมาเมมเบรน ซึ่งมีเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน และไคติน โอลิโกเมอร์เป็นตัวกระตุ้นการสังเคราะห์ไคตินบริเวณผนังเซลล์ ทำให้เส้นใยเชื้อราขยายขนาดยืดยาวออกไป จากนั้นเอนไซม์ไคตินซินเทสจะเข้าร่วมกับสารละลายอื่นๆ และฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ภายในเยื่อชั้นที่ 2 ของพลาสมาเมมเบรน เพื่อรอกทำปฏิกิริยาค้างต่อไป (Neil และ Geoffrey. 1994, Bartnicki-Garcia และคณะ. 2000)

2.6.2 การสังเคราะห์ไคโตซานในเชื้อรา

การสังเคราะห์ไคโตซานผ่านกระบวนการย่อยสลายกลูโคซามีนจากยูรีดินไดฟอสโฟดีคลูโคซามีนให้เป็นไคโตซาน ซึ่งอาศัยการทำงานเชื่อมโยงกันของเอนไซม์ไคตินซินเตส และเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส ดังแสดงในตารางที่ 2.3 เอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่เร่งการสังเคราะห์ไคโตซานอิสระ (Calvo และ Ruiz. 1987)

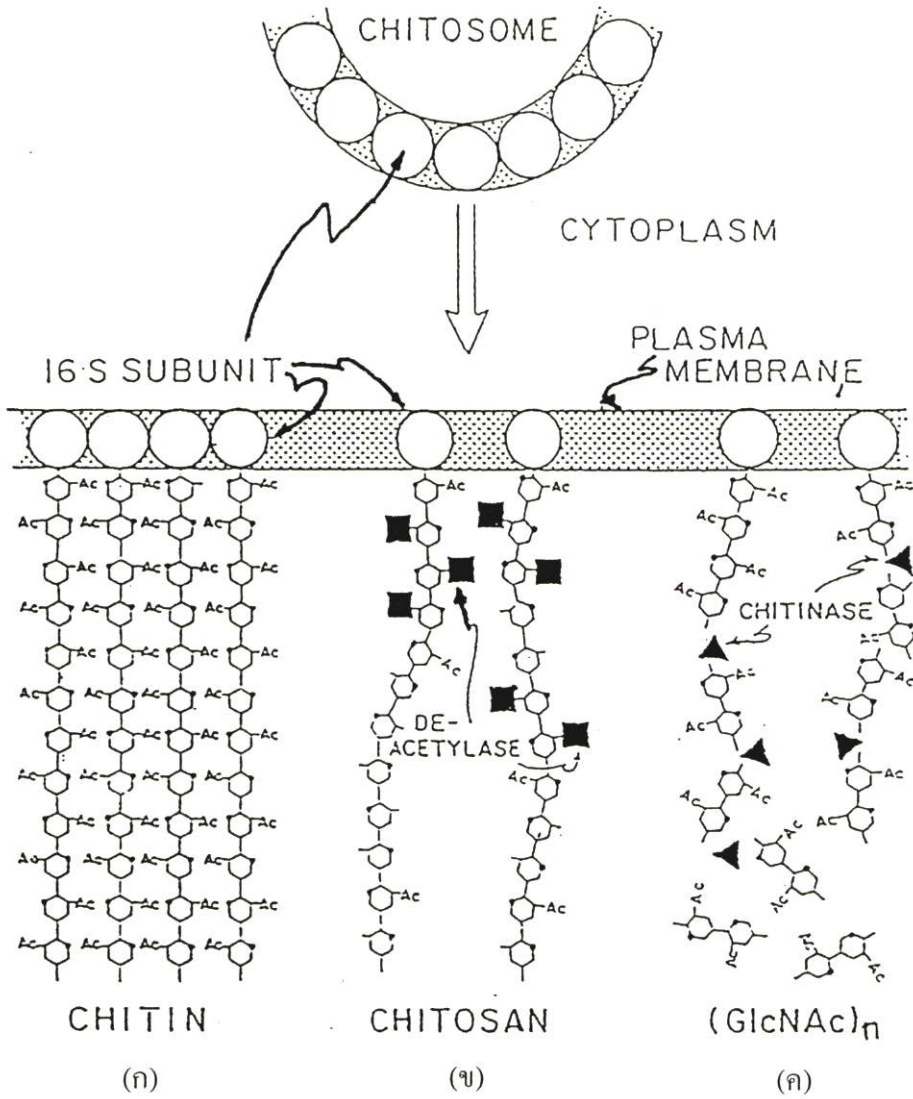
ตารางที่ 2.3 การสังเคราะห์ไคตินและไคโตซาน โดยเอนไซม์ไคตินซินเตส และเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส

เอนไซม์	การสังเคราะห์ไคโตซาน (นาโนโมลต่อนาที)	การสังเคราะห์ไคติน (นาโนโมลต่อนาที)
Chitin deacetylase	0.000	0.001
Chitin synthase	0.003	0.293
Chitin deacetylase+ Chitin synthase	0.197	0.026

ที่มา : Calvo และ Ruiz (1987)

เส้นใยไคตินสังเคราะห์จากไคโตโซม 16S ซึ่งเป็นองค์ประกอบย่อยของไรโบโซมอาร์อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) ในสิ่งมีชีวิตโปรคาริโอทไรโบโซมจะประกอบด้วยหน่วยย่อยขนาด 30S และ 50S หน่วยย่อย 30S ประกอบด้วยไรโบโซมอาร์อาร์เอ็นเอขนาด 16S รวมตัวกับโปรตีนประมาณ 21 ชนิด ส่วนหน่วยย่อย 50S ประกอบด้วยไรโบโซมอาร์อาร์เอ็นเอขนาด 23S และ 5S รวมตัวกับโปรตีนประมาณ 34 ชนิด โดยไรโบโซมอาร์อาร์เอ็นเอที่รวมกับโปรตีนจะอยู่ในรูปของไรโบโซม (ribosomal protein) ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีน (ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ. 2541, อมรา คัมภีรานนท์. 2546, Mignard และ Flandrois. 2006)

แบบจำลองเกี่ยวกับการควบคุมชีวสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานในธรรมชาติพบว่า ศูนย์กลางควบคุมการทำงานของเอนไซม์ไคตินซินเตสอยู่ที่บริเวณผิวเซลล์ ดังนั้นโมเลกุลเอนไซม์ไคตินซินเตสจะถูกส่งไปยังผนังเซลล์โดยไมโครเวซิเคิลดังรูปที่ 2.8 (ก) การเกิดผลึกอย่างรวดเร็วระหว่างสร้างสายโซ่ไคติน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลส หรือเอนไซม์ไคตินซินเตสเข้าสู่สายโซ่ไคติน ดังแสดงในรูปที่ 2.8 (ข) ส่วนสายโซ่ไคตินอิสระ ที่เหลือกระจายตัวอยู่ภายในไมโครเวซิเคิลใกล้กับผนังเซลล์ และเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยเอนไซม์ไคตินซินเตสอย่างรวดเร็วดังรูปที่ 2.8 (ค) (Calvo และ Ruiz. 1987)



รูปที่ 2.8 แบบจำลองการควบคุมชีวสังเคราะห์ของไคตินและไคโตซาน บริเวณผนังเซลล์เชื้อรา

(ก) : เส้นใยไคตินขนาดเล็กที่สร้างขึ้นและจัดเรียงตัวอย่างหนาแน่น

(ข) : สายโซ่ไคตินอิสระ

(ค) : สายโซ่ไคตินอิสระเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยเอนไซม์ไคตินเนส

ที่มา : Calvo และ Ruiz (1987)

2.7 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชในวงศ์ Orchidaceae มีใบเลี้ยงเดี่ยว ครอบคลุมพืชหลายสกุล จึงมีความแตกต่างกันมากในวงศ์เดียวกัน ส่วนใหญ่มีลักษณะลำต้นเป็นข้อปล้อง ลำต้นของกล้วยไม้ไม่มีแก่น เนื้อในภายในลำต้นเสมอกันไม่มีการแบ่งออกเป็นส่วนเนื้อไม้ และเปลือกไม้

กล้วยไม้เป็นพืชไม่มีรากแก้ว มีระบบรากเช่นเดียวกันจึง ข่า อ้อย รากของกล้วยไม้มีหน้าที่ดูดน้ำและอาหารที่สะสมมาค้ำน้ำเข้าไปในลำต้น ใช้ในการยึดเกาะหรือทรงตัว รากของกล้วยไม้แต่ละชนิดมีลักษณะแตกต่างกัน เช่น กล้วยไม้ดินมีรากสั้นและไม่มีแขนงราก กล้วยไม้อากาศมีรากห้อยยาวเพื่อดูดซับอากาศและความชื้น มีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) จึงสามารถทำหน้าที่ปรุงอาหารแทนใบได้

ใบกล้วยไม้มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น แวนด้า (Vanda) ใบกลมมีใบรูปทรงกระบอก แวนด้าใบแบนมีใบรูปทรงแบนยาวและมีหน้าตัดรูปตัววี (V) สกุลช้างมีใบเป็นรูปร่างน้ำ สกุลกุหลาบมีใบแบนเป็นรูปแถบ สกุลสามปอยมีใบรูปกลมยาวคล้ายกิ่งก้าน เป็นต้น ใบของกล้วยไม้ไม่มีส่วนก้านใบปรากฏให้เห็น การเรียงตัวของใบสลับกัน และมีลักษณะการเรียงตัวในขณะที่ยังเป็นดาเรียงซ้อนทับกันหรือ เรียงวนซ้อนทับกัน ใบกล้วยไม้ทำหน้าที่ปรุงอาหารเพื่อสร้างน้ำตาล ผลิตภัณฑ์สารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ช่วยในการคายน้ำเพื่อในเกิดการหมุนเวียนน้ำที่ละลายอาหารซึ่งรากดูดขึ้นมายังลำต้นและทำหน้าที่หายใจ

ช่อดอก เป็นส่วนที่ตั้งของดอก กล้วยไม้มีช่อดอกหลายลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์ ช่อดอกแบ่งเป็นสองส่วน ได้แก่ ก้านช่อ เป็นส่วนที่อยู่ใต้ดอกล่างสุดลงมาถึงโคน แกนช่อเป็นส่วนที่อยู่เหนือขึ้นไปจนสุดปลายช่อ ช่อดอกกล้วยไม้มักจะออกที่บริเวณต่างๆ ได้แก่ ปลายลำต้น ก้านใบ ยอดที่ผลิออกมา กิ่งแก่ที่ทิ้งใบแล้ว หรือตามเหง้าก็ขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้

ดอกกล้วยไม้เป็นดอกประเภทสมบูรณ์เพศ มีทั้งเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียในดอกเดียวกัน แบ่งส่วนสำคัญของดอกได้ดังนี้ 1) กลีบรองดอกหรือกลีบชั้นนอก เป็นส่วนที่ห่อหุ้มและคอยป้องกันส่วนต่างๆ ขณะอยู่ในรูปตาดอก สีของกลีบรองดอกคล้ายกับใบ 2) กลีบดอก โดยทั่วไปกล้วยไม้มีกลีบดอก 6 กลีบ แบ่งเป็น 2 ชั้น ได้แก่ ชั้นนอกและชั้นใน ชั้นละ 3 กลีบ กลีบดอกชั้นนอกอยู่ข้างบน 1 กลีบ และอยู่ด้านข้างหรือข้างล่างอีก 2 กลีบ ซึ่งจะมีขนาดรูปร่างและสีสั้นเหมือนกันทุกประการ กลีบชั้นในมี 3 กลีบ แบ่งเป็นกลีบชั้นบน 2 กลีบ และกลีบชั้นล่าง 1 กลีบ โดยกลีบชั้นบนทั้ง 2 กลีบ มีสีสั้น ขนาด และรูปทรงเหมือนกัน แต่กลีบชั้นล่างจะมีขนาดเล็กหรือใหญ่กว่า มีสีสั้นแตกต่างออกไป มักเรียกกลีบชั้นในคู่ล่างว่า “ปาก” หรือ “กระเป่า” 3) เกสร กล้วยไม้มีเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ลักษณะภายในดอกที่แตกต่างจากดอกไม้ชนิดอื่น เพราะส่วนของก้านชูยอดเกสรเพศเมียกับก้านชูอับเกสรของเพศผู้รวมเป็น

ส่วนเดียวกัน และมียอดเกสรเพศเมียกับเรณูติดอยู่ เรียกว่า เสาเกสร (column) ซึ่งยื่นออกมาจากจุดเดียวกันกับโคนกลีบ ปลายสุดของเสาเกสรเป็นเรณูของเพศผู้ มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ ครอบด้วยฝามิดชิด เกาะกันเป็นก้อนเหนียวหรือเป็นก้อนแข็ง เรียกว่า ก้อนเรณู (pollinia) บริเวณถัดจากปลายเสาเกสรมีลักษณะเป็นแอ่งกลมๆ มีน้ำเหนียวคล้ายแป้งเปียก เรียกว่า แอ่งยอดเกสรเพศเมีย ซึ่งในการผสมพันธุ์กล้วยไม้ก้อนเรณูจะเข้าไปในแอ่งน้ำเหนียวๆ ในแอ่งทำหน้าที่กระตุ้นให้เรณูออกเข้าไปผสมพันธุ์กับไข่ในรังไข่ บริเวณก้านดอกมีรังไข่ ภายในมีไข่อ่อนเป็นเม็ดเล็กๆ เกาะติดอยู่จำนวนมาก หากได้รับการผสมจากเรณูของเกสรเพศผู้จะเจริญเป็นเมล็ด เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ โดยก้านดอกเจริญเป็นฝักภายหลังการผสมเกสร การติดฝักของกล้วยไม้แต่ละชนิดไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ สภาพแวดล้อม และความสมบูรณ์ของพันธุ์ไม้ เมล็ดกล้วยไม้มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ เหมือนผงละเอียด (ชวลิต ดาบแก้ว. 2542, ระพี สาคริก. 2530, 2546, 2548)

กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส (*Phalaenopsis*) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่มีแหล่งกำเนิดอยู่ในภูมิภาคเอเชียเขตร้อน เช่น ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย ไทย พม่า อินโดจีน หมู่เกาะชวา หมู่เกาะฟอร์โมซา หมู่เกาะบอเนียร์ เป็นต้น ในช่วงแรกกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส ถูกขนานนามว่า มอธ ออร์คิด (moth orchid) เนื่องจากมีช่อดอกยาวและมีแขนงช่อ สองด้านของก้านช่อดอกออกเรียงเป็นแถว หากมองในระยะไกล โดยเฉพาะช่วงใกล้ค่ำจะคล้ายผีเสื้อกลางคืนเกาะรวมกันเป็นกลุ่มอยู่กับต้นไม้

กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสมีการเจริญแบบฐานเดี่ยว หรือยอดเดี่ยว (monopodium) ทรงต้นกล้วยไม้ในสกุลนี้มีลักษณะเตี้ย มีโครงสร้างแน่นหนามากกว่าสกุลอื่น เมื่อวิเคราะห์รายละเอียดโครงสร้างด้านกายภาพ พบว่า ข้อปล้องของลำต้นถี่มากจนทำให้การขยายพันธุ์แบบตัดแยกทำได้ยาก แต่ถ้าส่วนยอดเสียหายจะพบการแตกหน่อจากโคนต้น ดังนั้นการขยายพันธุ์กล้วยไม้ในสกุลฟาแลนนอพซิส นั้นอาจใช้วิธีตัดก้านช่อดอกออกมาชำ ตาซึ่งอยู่ตามข้อของก้านช่อจะงอกเป็นต้นเล็กๆ ได้ หรือก้านดอกเก่าๆ ที่หมดดอกแล้วถ้าปล่อยให้ทิ้งไว้อาจมีกล้วยไม้เล็กๆ งอกขึ้นมาจากตาได้ นอกจากนี้ถ้ายอดและใบเน่าเหลือแต่ต่อหกรากยังคงอยู่ และดูแลอาหาร แร่ธาตุ และน้ำได้เพียงพอ จึงสามารถแตกหน่อใหม่ได้ กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสสามารถผสมข้ามสกุลกับกล้วยไม้สกุลต่างๆ ได้หลายสกุล เช่น ผสมกับสกุลแวนด้า ผสมกับสกุลอะแรคนิส (*Arachnis*) ผสมกับสกุลเรเนเธอร่า (*Renanthera*) เป็นต้น การปลูกเลี้ยงช่วงเริ่มแรกมีการนำกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสมาปลูกลงในกระเช้าไม้แขวนไว้ในเรือนกล้วยไม้ร่วมกับกล้วยไม้ทั่วไป พบว่ากล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิสซึ่งปลูกไว้หลังจากเจริญเติบโตต่อมาไม่นานมักถูกฝน ทำให้ยอดและใบเน่าเหลือแต่ต่อ (สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ. 2540, ชวลิต ดาบแก้ว. 2542, ระพี สาคริก. 2530, 2546, 2548)

2.8 การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินและไคโตซานในพืช

ไคตินและไคโตซานสามารถกระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองของพืช เช่น ยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความแข็งแรง การซ่อมแซม หรือ การปรับปรุงเปลี่ยนแปลงสารที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ เพื่อต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อก่อโรค และสร้างสารมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (phytoalexin) ตัวอย่างเช่น stilbene เป็นสารที่อ่อนนุ่มสร้างขึ้น เพื่อต่อต้านเชื้อราก่อโรคในองุ่น (Fritzemeier และ Kindl. 1981) นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถชักนำให้พืชสร้างกลไกการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (pathogenesis related proteins) ได้แก่ กลุ่มของเอนไซม์ที่เป็นตัวยับยั้งเชื้อก่อโรค (inhibitor) เช่น เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์โปรติเอส กลุ่มของเอนไซม์ที่เป็นตัวย่อยสลายผนังเซลล์ เช่น เอนไซม์ไคตินเนส เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เป็นต้น (Mauch และ Staehelin. 1989, Mason และ Davis. 1997, Agrawal และคณะ. 2002)

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เกสนรี จองโซติศิริกุล (2544) ศึกษาผลของไคโตซานต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนส และการชักนำการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในองุ่น พบว่าเมื่อให้ไคโตซานที่ความเข้มข้น 3200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิห้องสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนส และสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสและเอนไซม์เบตา-1,3-กลูคาเนสในองุ่นได้

Tham และคณะ (2001) ศึกษาผลของการฉายรังสีลงบนไคโตซานเพื่อช่วยให้พืชทนต่อพิษของวานาเดียมซึ่งเป็นสารที่ปลดปล่อยมาจากโรงงานอุตสาหกรรมและเหมืองถ่านหิน พบว่าเมื่อใส่ไคโตซานที่ผ่านการฉายรังสีในระดับ 100 kGy ในอาหารเพาะเลี้ยงดินกล้าที่ความเข้มข้น 100-200 ส่วนในล้านส่วน (ppm) สามารถกระตุ้นให้กล้าข้าว และกล้าข้าวสาลีมีการเจริญเติบโตดีขึ้น และทนต่อพิษของวานาเดียมได้

Win และ Stevens (2001) ศึกษาคุณสมบัติของไคตินจากเปลือกกุ้ง เพื่อใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการย่อยสลายโดยเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิเลสที่เชื้อรา *Colletotrichum lindemuthianum* และ *Absidia coerulea* ผลิดขึ้นมา เนื่องจากไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่ละลายในน้ำและตัวทำละลายจึงเกิดตะกอน ดังนั้นจำเป็นต้องลดขนาดอนุภาคไคตินให้เล็กลง โดยอาศัยเอนไซม์เข้าไปตัดหมู่อะเซทิลออกจากไคติน ไคตินโดยทั่วไปมีระดับการกำจัดหมู่อะเซทิลประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ถ้าถูกเอนไซม์ย่อยจะกลายเป็นไคโตซานที่มีระดับการดึงหมู่อะเซทิลสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ทำให้

ไคโตซานมีน้ำหนักโมเลกุล 1.2×10^4 กิโลดาลตัน ซึ่งน้อยกว่าไคตินที่มีน้ำหนักโมเลกุล 2.4×10^5 กิโลดาลตัน

Jia และ Shen (2002) ศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อการเตรียมไคโตซานโมเลกุลต่ำด้วยกรดฟอสฟอริก พบว่าอัตราการย่อยสลายลดลงเมื่อระยะเวลาการย่อยสลายเพิ่มขึ้นที่ระยะเวลาการย่อยสลาย 8 ชั่วโมง ใช้อุณหภูมิ 40 60 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานลดลง คือ 3.70×10^4 3.50×10^4 และ 2.00×10^4 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แสดงว่าน้ำหนักโมเลกุลของไคโตโอลิโกเมอร์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และระยะเวลาในการย่อย

Rakwal และคณะ (2002) ศึกษาความสำคัญของสารออกตะเดคานอยด์ (octadecanoid) ต่อการแตกหน่อในเมล็ดข้าวที่มีใบม้วนงอ โดยการตัดและใช้ไคโตซานโมเลกุล 3000 ถึง 30000 กิโลดาลตัน เป็นตัวช่วยยั้งเชื้อรา ที่มีผล พบว่าสามารถกระตุ้นให้เมล็ดข้าวงอก และแตกหน่อได้ดีขึ้น นอกจากนี้การให้ไคโตซานยังทำให้เกิดการสร้างสาร 12-oxo-phytodieonic acid (OPDA) และ jasmonic acid (JA) ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้มีผลต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันตนเองในพืช

Savard และคณะ (2002) ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานที่ถูกย่อยสลายในระดับต่างๆ โดยทดสอบการยับยั้งยีสต์และแบคทีเรียจำพวกสร้างกรดแลคติกที่ทำให้ผักดองเน่าเสีย พบว่าคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลายไคโตซาน โครงสร้างของจุลินทรีย์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

Sasaki และคณะ (2002) ได้ศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ไคตินเนสแฟมิลี 18 ที่ได้จากพืชและจุลินทรีย์ โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) เอนไซม์ไคตินเนสที่ได้จากข้าวเกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะแบบ (-4)(-3)(-2)(-1)(+1)(+2) จากปลายนอนรีดิวซิ่ง (nonreducing end) ของไคตินเฮกซะแซคคาไรด์ เป็นการย่อยสลายพันธะตำแหน่งที่สองจากปลายสายนอนรีดิวซิ่ง เอนไซม์ไคตินเนสที่ได้จาก *Bacillus circulans* และ *Coccidioides immitis* เกิดปฏิกิริยาแบบ (-2)(-1)(+1)(+2)(+3)(+4) จากปลายนอนรีดิวซิ่ง ซึ่งย่อยสลายพันธะตำแหน่งที่สี่จากปลายสายนอนรีดิวซิ่ง และพบว่า เอนไซม์ไคตินเนสจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถเกิดปฏิกิริยาทรานสไกลโคซิเลชัน (transglycosylation) ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ คือ ไคตินออกตะแซคคาไรด์ [octasaccharide, (GlcNAc)₈] ซึ่งเกิดขึ้นตอนการสร้างขึ้นใหม่หลังจากปฏิกิริยาการย่อยสลายแต่ไม่พบปฏิกิริยาทรานสไกลโคซิเลชันในเอนไซม์ไคตินเนสจากพืช

Khan และคณะ (2003) ศึกษาผลของไคโตซาน และไคตินโอลิโกเมอร์ เพื่อเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia-lyase : PAL) และเอนไซม์ไทโรซีนแอมโมเนียไลเอส (tyrosine ammonia-lyase : TAL) ในใบถั่วเหลือง โดยเปรียบเทียบผลของไคโตซานโอลิโกเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ ไคโตซานเตตระเมอร์ ไคโตซานเพนตะเมอร์ และไคโตซานเฮกซะเมอร์ ไคตินโอลิโกเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ ไคตินเตตระเมอร์ ไคตินเพนตะเมอร์

และโคตินเฮกซะเมอร์ จากการทดลองพบว่า โคตินโพลิโกเมอร์ ชนิดโคตินเฮกซะเมอร์สามารถกระตุ้นให้กิจกรรมของ PAL สูงขึ้น และสูงกว่าการใช้โคโตซานโพลิโกเมอร์ ส่วนกิจกรรมของ TAL มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อให้โคตินโพลิโกเมอร์ และโคโตซานโพลิโกเมอร์ ซึ่งโพลิโกเมอร์ทุกชนิดให้ค่ากิจกรรมที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

Sharathchandra และคณะ (2004) ศึกษาผลของโคโตซานซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า Elexa โดยทดสอบความต้านทานโรคราน้ำค้างและการเจริญเติบโตของเมล็ดข้าวฟ่าง พบว่าเมื่อแช่เมล็ดข้าวฟ่างในสารละลาย Elexa 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 19 ส่วนเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำให้เมล็ดข้าวฟ่างมีการงอกและหน่อแข็งแรงมากที่สุด นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นความสามารถในการต้านทานโรคด้วย

Chatterjee และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตโคโตซานจากเชื้อรา *Mucor rouxii* โดยเลี้ยงเชื้อราในอาหาร 3 ชนิด คือ Molass salt medium (MSM) Potato dextrose broth (PDB) และ Yeast extract peptone glucose (YPG) ซึ่งให้ปริมาณโคโตซาน 0.61 กรัมต่อลิตร 0.51 กรัมต่อลิตร และ 0.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำโคโตซานที่ได้จากเส้นใยเชื้อราไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่องฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR) โดยเปรียบเทียบโครงสร้างโคโตซานที่ได้จากเส้นใยเชื้อรากับโคโตซานมาตรฐานพบพิก (peak) บริเวณเดียวกัน ได้แก่ พิกของหมู่เอไมด์ I (NH-stretching) ที่ช่วง 2900-3000 นาโนเมตร พิกของหมู่คาร์บอนิล (C=O) ช่วง 1650 นาโนเมตร และพิกของหมู่เอไมด์ II (NH-bending) ที่ช่วง 1557 นาโนเมตร

Lin และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ต่อการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เพื่อให้ข้าวมีความต้านทานโรคเพิ่มขึ้น จากการทดลองพบว่า โคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันมีผลต่อการสะสมสารอนุมูลอิสระได้แตกต่างกัน โดยโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีผลทำให้ความต้านทานโรคในเมล็ดข้าวเพิ่มขึ้นมากกว่าโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

Nge และคณะ (2006) ศึกษาการใช้โคโตซานช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ โดยศึกษาผลของโคโตซานที่ได้จากเปลือกกุ้งและโคโตซานที่ได้จากเชื้อราต่อการเจริญและพัฒนารของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารวุ้น พบว่าเมื่อใส่โคโตซานจากเชื้อราในอาหารเหลว 15 ส่วนในตัวอย่างละล้านส่วน ทำให้เนื้อเยื่อกล้วยไม้เจริญเร็วที่สุด ส่วนในอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของโคโตซานจากเชื้อราขนาด 10 กิโลดาลตัน หรือใช้โคโตซานโพลิโกเมอร์ขนาด 1 กิโลดาลตัน ที่ผลทำให้เนื้อเยื่อกล้วยไม้เจริญเติบโตดีที่สุด

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 เป็นเชื้อราที่กลายพันธุ์มาจากเชื้อรา *Monascus* sp. KB11304 ซึ่งผ่านการชักนำการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 20 นาที ทำให้ไม่สร้างสีทั้งในเส้นใย และในอาหารเลี้ยงเชื้อ (นิตยา บุตรดา. 2537) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร. บุญบา ยงสมิทธิ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื้อรา *Mucor rouxii* ได้มาจากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ได้มาจากห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.1.2 พันธุ์กล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพิซิส (*Phalandsopsis*) ในหมวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากตลาดนัดจตุจักร กรุงเทพมหานคร

3.1.3 เอนไซม์

ครูดเอนไซม์ไคตินเนส จากเชื้อเบอร์ 6.0 (ภาคผนวก ก) ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างบริเวณโรงงานกุ้งแช่แข็ง จังหวัดชลบุรี (สมชาย ไกรรักษ์ และธีระพันธ์ เจริญสาคร. 2549)

3.1.4 อุปกรณ์

เครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave) Tomy ; SS-325, Japan

เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Hermle ; Z383K, Germany

ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow) Astec Microflow ; ABS 1200, UK

ตู้อบเชื้อ (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 ; AG 204, Switzerland

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) Cyberscan ; 2000, Singapore

ตู้อบลมร้อน (hot air oven) Memmert ; 600, Germany

เครื่องแยกของเหลวความดันสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

Shimadzu ; Japan ประกอบด้วย

ส่วนควบคุมอัตราการไหลของเฟดเคลื่อนที่ ; LC-10 AD VP

ส่วนวัดการดูดกลืนแสง UV ; SPD-10 A VP

ส่วนประมวลผลและบันทึกผล ; C-R7Ae plus

คอลัมน์ ; Asahipak Shodex NH₂P-50 4E

อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water incubator shaker) ; Memmert, Germany

เครื่องทำแห้งแบบสูญญากาศ (freeze dry) Labconco; LYPH-LOCKL, USA

เครื่องฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (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

เครื่องบดตัวอย่าง (Micro hammer cutter mill) Px-MFC ; Kinematic, Switzerland

ประกอบด้วย ชุดทำความสะอาด 1 ชุด หลอด 12 อัน

ตะแกรงสำหรับคัดขนาด 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 มิลลิเมตร

กล้องถ่ายรูป Olympus ; C5050, Japan

3.1.5 เคมีภัณฑ์ (ภาคผนวก ก)

อาหาร MYS (malt yeast extract starch medium)

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์อิ่มตัวในเมทานอล

สารละลายฟีนอล (phenol) เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

กรดซัลฟูริกเข้มข้น (sulfuric acid)

สารละลายอะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile)

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ที่ความเข้มข้น 2 โมลาร์

กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

สารละลายบอเรทบัฟเฟอร์ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

สารโพแทสเซียมโบรมีน (potassium bromine)

ไคตินจากเปลือกกุ้ง ขนาด 45 ไมโครเมตร ; Siambionet, Thailand.

ไคตินจากแกนหมึก ; Siambionet, Thailand.

ไคโตซาน (chitosan sample) ; Seafresh chitosan (Lab), 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

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS

เลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 *Mucor rouxii* และ *Rhizopus oligosporus* บนอาหารวุ้นMYS (ภาคผนวก ก) โดยใช้ชิ้นวุ้นที่เจาะด้วยค็อกบอร์เรอร์ (cork borer) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 1 ชิ้น วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ใช้เวลาบ่มนาน 7-10 วัน ส่วน *M. rouxii* และ *R. oligosporus* บ่มนาน 2-3 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราทั้งสามชนิดทุกวัน บันทึกลักษณะเส้นใยเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

3.2.2 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว MYS

ใช้เชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 *M. rouxii* และ *R. oligosporus* ที่เจริญบนอาหารวุ้น MYS ซึ่งเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ใช้ระยะเวลาเลี้ยงนาน 7 วัน ส่วนเชื้อรา *M. rouxii* และ *R. oligosporus* ใช้ระยะเวลาเลี้ยงนาน 2 วัน จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นด้วยค็อกบอร์เรอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 4 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลว MYS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือ และน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ภาคผนวก ข)

3.2.3 วิเคราะห์โครงสร้างไคตินและไคโตซานในเส้นใยเชื้อรา

นำเส้นใยเชื้อราอบแห้งมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง ซึ่งใช้ตะแกรงขนาด 0.5 มิลลิเมตร เพื่อคัดขนาดเส้นใยเชื้อรา แล้วเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อิ่มตัวในเมธานอล (ภาคผนวก ก) อัตราส่วนเส้นใยเชื้อรา 1 กรัม ต่อสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อิ่มตัวในเมธานอล 20 มิลลิลิตร (1:20) คนสารละลายตลอดระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

จากนั้นทิ้งให้ตกตะกอน 1 คืน นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านใยแก้ว แล้วตกตะกอนโคตินด้วยน้ำกลั่น เก็บตะกอนโคตินที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบสูญญากาศ จากนั้นบดให้ละเอียดแล้วนำไปวิเคราะห์โครงสร้างโคตินและโคโตนด้วยเครื่อง FT-IR (ภาคผนวก ข)

3.2.4 ศึกษาการผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

ชั่งวัตถุดิบ (โคตินจากเปลือกกุ้ง โคตินจากแกนหมึก เส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.20M1 และเส้นใยเชื้อรา *M. rouxii* ขนาดเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร) น้ำหนักประมาณ 1 กรัม ใส่ในพลาสติกขนาด 120 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปิดฝาด้วยจุกยาง นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 60 และ 80 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 2 4 6 และ 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้กรองผ่านใยแก้ว เก็บส่วนใสมาปรับพีเอชให้เป็นกลาง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาโคตินโพลิโกเมอร์ที่ได้ด้วยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข)

3.2.5 ศึกษาการผลิตโคตินโพลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์โคตินเนส

ชั่งวัตถุดิบ 3 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 30 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที แล้วเติมสารละลายบอเรนัทฟเฟออร์ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลายเอนไซม์โคตินเนสในอัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์โคตินเนส 3 ส่วนต่อสารละลายตัวอย่าง 1 ส่วน ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลายบอเรนัทฟเฟออร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วนของสารละลายบอเรนัทฟเฟออร์ 3 ส่วนต่อสารละลายตัวอย่าง 1 ส่วน บ่มในเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน (ดัดแปลงมาจาก Krairak และคณะ. 2003) เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน วิเคราะห์หาโคตินโพลิโกเมอร์ที่ได้ด้วยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข)

3.2.6 ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโคตินโพลิโกเมอร์ต่อการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพีซิส

นำกล้วยไม้ออกจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ล้างบริเวณรากด้วยน้ำกลั่นเพื่อเอาอาหารเพาะเลี้ยงออกให้หมด จากนั้นแช่กล้วยไม้ในสารละลายโคตินโพลิโกเมอร์ที่เจือจางในอัตราส่วนสารละลายโคตินโพลิโกเมอร์ต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:10 1:50 1:100 และ 1:1000 (โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม) เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วซับน้ำให้แห้งนำไปเพาะเลี้ยงใน

เรือนอนุบาลกล้วยไม้เป็นเวลา 10 สัปดาห์ บันทึกการเจริญทุกๆ 2 สัปดาห์ ด้วยการถ่ายภาพ นับจำนวนยอด จำนวนรากเกิดใหม่ และวัดความยาวรากเกิดใหม่ โดยวางแผนการทดลองแบบ สุ่มตลอด (completely randomized desing ; CRD) ทดริตเมนต์ละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์ผล ทางสถิติ ด้วยวิธีการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ Duncan multiple range test ร่วมกับ Anolysis of variance โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10.0

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS

4.1.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS

เมื่อนำเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 *M. rouxii* และ *R. oligosporus* มาเลี้ยงบนอาหารวุ้น MYS โดยใช้ชิ้นวุ้นที่เจาะด้วยค็อกบอร์เรอร์ ทำให้โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเริ่มต้น 0.4 เซนติเมตร พบว่าเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 มีลักษณะฟู สีขาว ดังรูปที่ 4.1 (ก) เมื่ออายุมากขึ้นประมาณ 7 วันจะเกิดรอยหยัก ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงตามแนวรัศมีของโคโลนี ลักษณะการเจริญของ *M. rouxii* แสดงดังรูปที่ 4.1 (ข) ในวันแรกเส้นใยมีลักษณะฟู สีขาว เส้นใยหยาบ เห็นขอบโคโลนีชัดเจน เมื่ออายุมากขึ้นจะสร้างสปอร์สีน้ำตาล และเจริญเต็มจานเพาะเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร ในวันที่ 4 ลักษณะของ *R. oligosporus* แสดงในรูปที่ 4.1 (ค) วันแรกเส้นใยมีสีขาว พูพุ่งขึ้นไปในอากาศ เมื่ออายุมากขึ้น 2-3 วันจะสร้างสปอร์สีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม ในวันที่ 4 เชื้อรา *R. oligosporus* และ *M. rouxii* เจริญเต็มจานเพาะเชื้อ



(ก)

(ข)

(ค)

รูปที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS

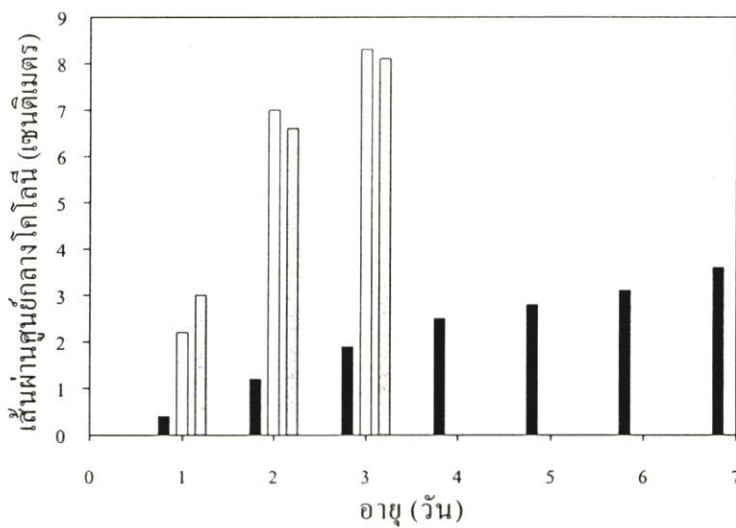
(ก) *Monascus* sp.KB20M1 ระยะเวลา 7 วัน

(ข) *M. rouxii* ระยะเวลา 2 วัน

(ค) *R. oligosporus* ระยะเวลา 2 วัน

4.1.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS

ในวันแรกเชื้อรา *R. oligosporus* เจริญบนอาหารวุ้น MYS ได้ดีกว่าเชื้อรา *M. rouxii* แต่เมื่อเข้าสู่วันที่ 2 และ 3 *M. rouxii* เจริญได้ดีกว่า *R. oligosporus* อย่างไรก็ตามเชื้อราทั้งสองชนิดก็สามารถเจริญได้ดีใกล้เคียง เมื่อเทียบกับเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ดังรูปที่ 4.2 ซึ่ง *Monascus* sp.KB20M1 มีการเจริญอย่างช้าๆ และในวันที่ 7 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 3.6 เซนติเมตร ในขณะที่เชื้อรา *M. rouxii* และ *R. oligosporus* เจริญเต็มจานเพาะเชื้อในวันที่ 4 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร

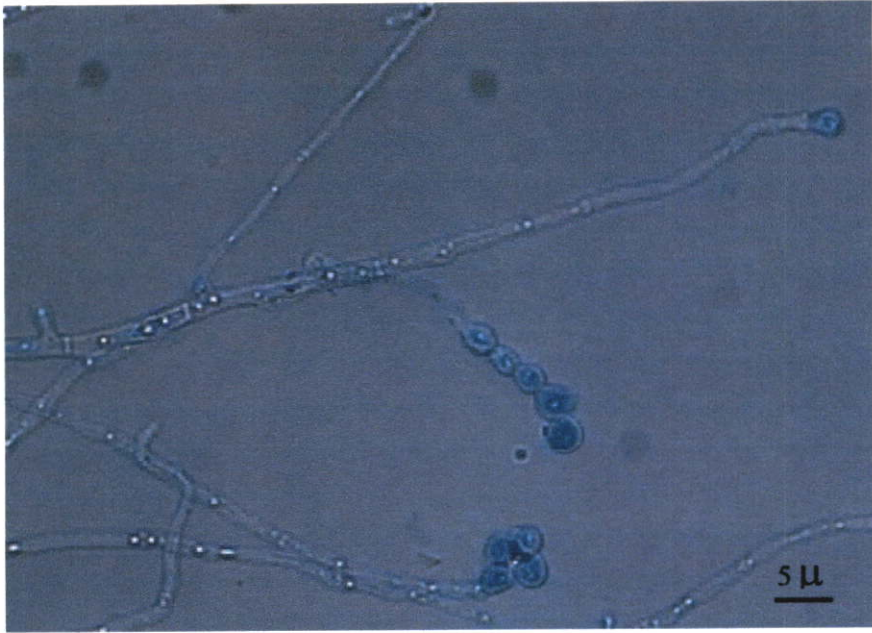


รูปที่ 4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS

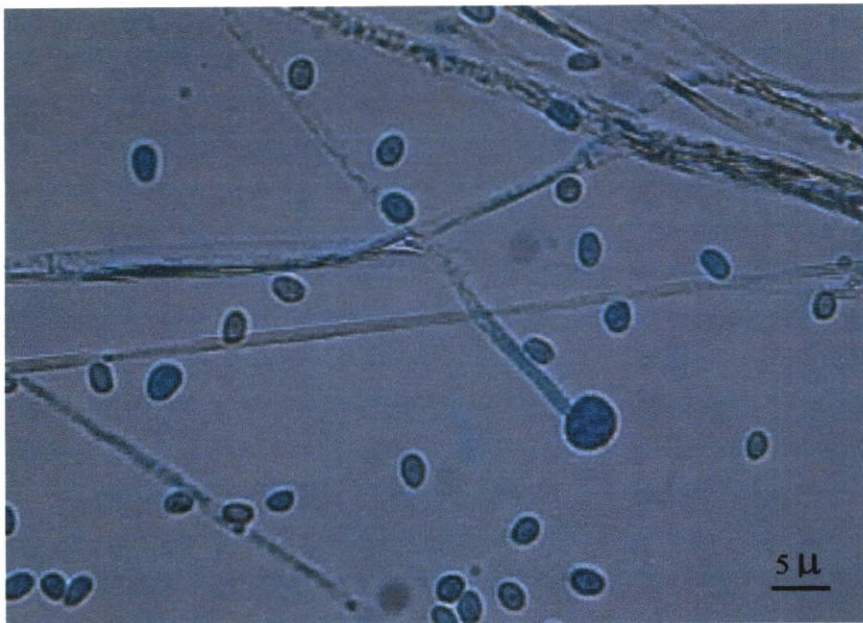
■ *Monascus* sp.KB20M1 □ *M. rouxii* ▨ *R. oligosporus*

4.1.3 ลักษณะเส้นใยเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

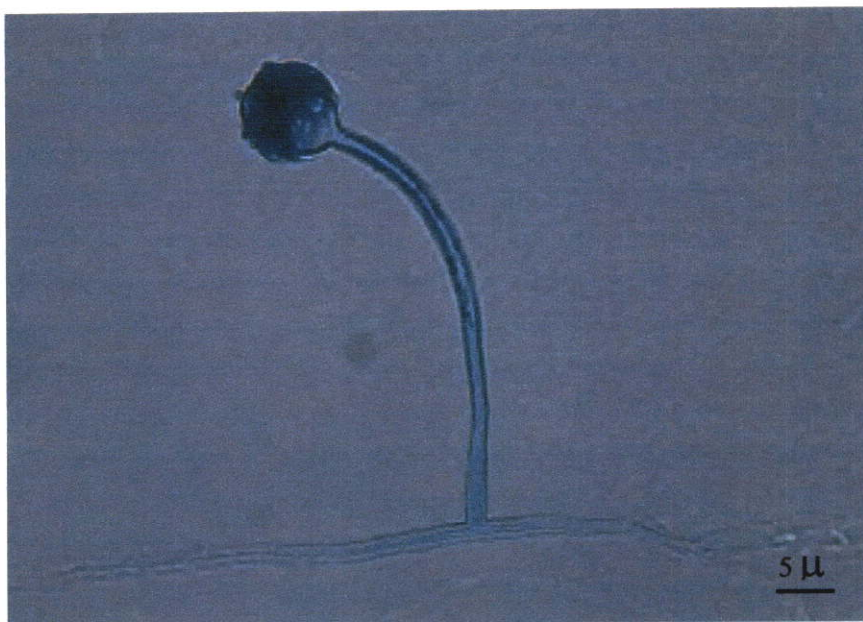
เชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 เส้นใยมีลักษณะบอบบาง ยาวเรียว และแตกแขนงเป็นเส้นยาวๆ จำนวนมาก การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ พบว่ามีการสร้างโคนิเดียรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีรอยตัดที่ฐานจำนวนมาก โคนิเดียถูกสร้างต่อกันเป็นลูกโซ่ ตั้งแต่ 1-12 โคนิเดีย ดังรูปที่ 4.3 *M. rouxii* และ *R. oligosporus* มีลักษณะคล้ายคลึงกัน โดยเป็นเชื้อราที่ไม่มีผนังกันภายในเส้นใย สามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยการสร้างไซโกสปอร์ และสปอร์แรงเจียมรูปร่างกลมสร้างขึ้นที่ปลายของสปอร์แรงจิโอฟอร์ แต่เชื้อรา *M. rouxii* ไม่มีสโตลอนท์หรือไลชอยด์ สปอร์แรงจิโอฟอร์อาจมีการแตกกิ่งก้าน หรือไม่มี ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ส่วนเชื้อรา *R. oligosporus* มีสโตลอนท์หรือไลชอยด์ ในตำแหน่งฐานของสปอร์แรงจิโอฟอร์ สปอร์แรงจิโอฟอร์ไม่แตกกิ่งก้าน ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.3 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า



รูปที่ 4.4 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *M. rouxii* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า



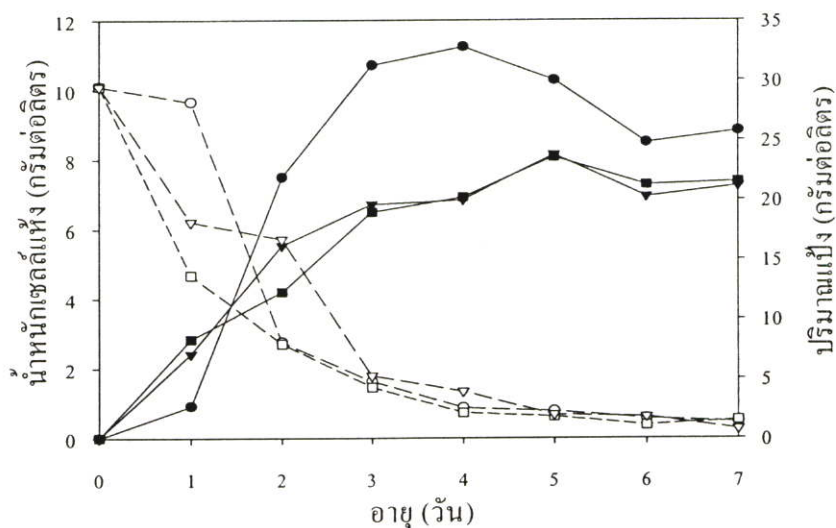
รูปที่ 4.5 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *R. oligosporus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

4.2 ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว MYS

เนื่องจากการทดลองขั้นพื้นฐานเพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ในอาหารเหลว MYS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 เจริญในลักษณะเพลาทเป็นเส้นใยขนาดเล็กยาวสานกันไปมา ให้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 4 ประมาณ 11.24 กรัมต่อลิตร และเมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน สามารถใช้แป้งได้ทำให้แป้งเหลืออยู่เพียง 1.36 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.6 จากรายงานของ นิสิต บุตรดา (2537) ได้ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 โดยเลี้ยงในอาหารเหลว MYS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ให้ปริมาณเส้นใยแห้งสูงสุดประมาณ 6.0 กรัมต่อลิตร นั้นแสดงว่าเมื่อเพิ่มความเร็วการเขย่าอาจมีผลทำให้เชื้อราเจริญได้มากขึ้น เนื่องจากเส้นใยเชื้อรากระจายตัวไม่พันกันเป็นก้อน และได้รับออกซิเจนเพิ่มขึ้น

ดังนั้นเมื่อนำเชื้อรา *M. rouxii* และ *R. oligosporus* มาเลี้ยงในสภาวะเดียวกัน ให้ผลดังรูปที่ 4.6 โดยเชื้อรา *R. oligosporus* เจริญของในลักษณะเพลาทเป็นก้อนขนาดใหญ่ ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 5 มีค่าประมาณ 8.15 กรัมต่อลิตร และในวันที่ 7 มีปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ประมาณ 0.77 กรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อรา *M. rouxii* สามารถเจริญในอาหารเหลว MYS ได้และเพลาทเป็นสีขาว ลักษณะฟุ้งกระจายเป็นเส้นใยไม่พันกัน เนื่องจากความเร็วรอบของการเขย่าที่

แรงเกินไป ทำให้เส้นใยของ *M. rouxii* แดกหัก หรือเสียหาย เพราะเส้นใยมีลักษณะไม่มีผนังกันภายในจึงถูกทำลายได้ง่าย ส่งผลให้เพลเลทไม่เป็นเส้นสายยาว ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 5 มีค่าประมาณ 8.98 กรัมต่อลิตร แต่หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ลดลง และในวันที่ 7 มีปริมาณแ่งที่เหลืออยู่ประมาณ 1.53 กรัมต่อลิตร มีรายงานว่าเชื้อรา *M. rouxii* สามารถเจริญเกิดรูปร่างได้สองแบบเมื่อเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศ และให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำให้เกิดการแตกหน่อเป็นหลายๆ ขั้วในลักษณะคล้ายยีสต์ ส่งผลต่อการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Lubbehusen และคณะ. 2003)



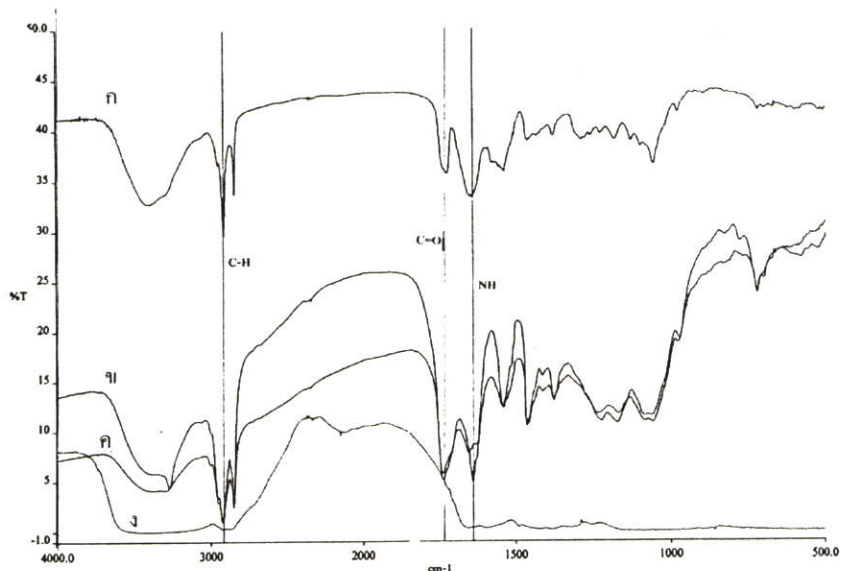
รูปที่ 4.6 ปริมาณแ่งที่เหลือในน้ำหมักและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเหลว MYS

- น้ำหนักเซลล์แห้ง *Monascus* sp.KB20M1
- ปริมาณแ่ง *Monascus* sp.KB20M1
- น้ำหนักเซลล์แห้ง *M. rouxii*
- ปริมาณแ่ง *M. rouxii*
- ▼ น้ำหนักเซลล์แห้ง *R. oligosporus*
- ▽ ปริมาณแ่ง *R. oligosporus*

4.3 วิเคราะห์โครงสร้างไคตินและไคโตซานในเส้นใยเชื้อรา

การศึกษาโครงสร้างไคตินและไคโตซานในเส้นใยเชื้อรา อาศัยเทคนิคฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรโกปี (ภาคผนวก ข) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณที่พื้นที่พีก หรือ ความสูงของพีกที่หมู่เอไมด์ I หรือ II เมื่อเทียบกับพื้นที่พีก หรือ ความสูงของพีกที่คงที่ ได้แก่ พีกของหมู่ไฮดรอกซิล หรือ พีกของวงแหวนไพราโนส การเลือกพีกที่วิเคราะห์ต้องเลือกให้เหมาะสม ตัวอย่างเช่น Chatterjee และคณะ (2005) ศึกษาความเป็นไคตินไคโตซานที่สกัดจากเส้นใยเชื้อรา *M. rouxii*. ใช้พีกที่ 1557 cm^{-1} เป็นพีกของหมู่เอไมด์ II และ 2900 cm^{-1} เป็นพีกของหมู่ไฮดรอกซิล พบว่า สารที่สกัดได้มีเปอร์เซ็นต์ดีดีมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่าสารที่สกัดได้เป็นไคโตซาน

จากการทดลองวิเคราะห์สารตัวอย่างที่สกัดจากเส้นใยเชื้อราทั้งสามชนิดดังรูปที่ 4.7 พบว่าพีกที่ $1640-1660\text{ cm}^{-1}$ เป็นพีกของหมู่เอไมด์ I และ $2920-2930\text{ cm}^{-1}$ เป็นพีกของหมู่ไฮดรอกซิล เมื่อนำพีกที่ได้มาเปรียบเทียบกัน พบว่า สารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 อายุ 3 4 5 6 และ 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์ดีดีเท่ากับ 64.28 65.38 65.11 77.54 และ 92.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา *M. rouxii* อายุ 3 4 5 6 และ 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์ดีดีเท่ากับ 77.89 73.75 76.09 65.55 และ 64.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากเส้นใยเชื้อรา *R. oligosporus* อายุ 3 และ 4 วัน มีเปอร์เซ็นต์ดีดีเท่ากับ 76.49 และ 86.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการวิเคราะห์โครงสร้างโคตินโคโตซานในเส้นใยเชื้อราทำให้ทราบว่า เส้นใยเชื้อราทั้งสามชนิดมีโคตินโคโตซานเป็นองค์ประกอบ โดยในช่วง 5 วันแรก เส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 และ *M. rouxii* มีคุณสมบัติเป็นโคติน เมื่ออายุมากขึ้น โครงสร้างของเส้นใยเปลี่ยนไปเป็นโคโตซาน ส่วนเส้นใยเชื้อรา *R. oligosporus* อายุเพียง 3 และ 4 วัน มีคุณสมบัติเป็นโคโตซาน หลังจากนั้นไม่สามารถนำเส้นใย *R. oligosporus* มาสกัดสารโคตินโคโตซานได้ เนื่องจากเพลเลทมีลักษณะเป็นก้อนขนาดใหญ่ เมื่อนำไปอบแห้งเกิดเป็นก้อนแข็งไม่สามารถบดให้ละเอียดได้ ดังนั้นจึงเลือกให้เส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 อายุ 4 วัน และ *M. rouxii* อายุ 6 วัน ไปใช้ในการผลิตโคตินโพลิโอเมอร์ ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวเป็นช่วงเวลาที่เชื้อราเจริญให้ปริมาณเส้นใยสูงสุด และเส้นใยมีคุณสมบัติเป็นโคติน



รูปที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างโคตินโคโตซานในเส้นใยเชื้อราด้วยเครื่อง FT-IR

ก. *R. oligosporus*

ข. *Monascus* sp.KB20M1

ค. *M. rouxii*

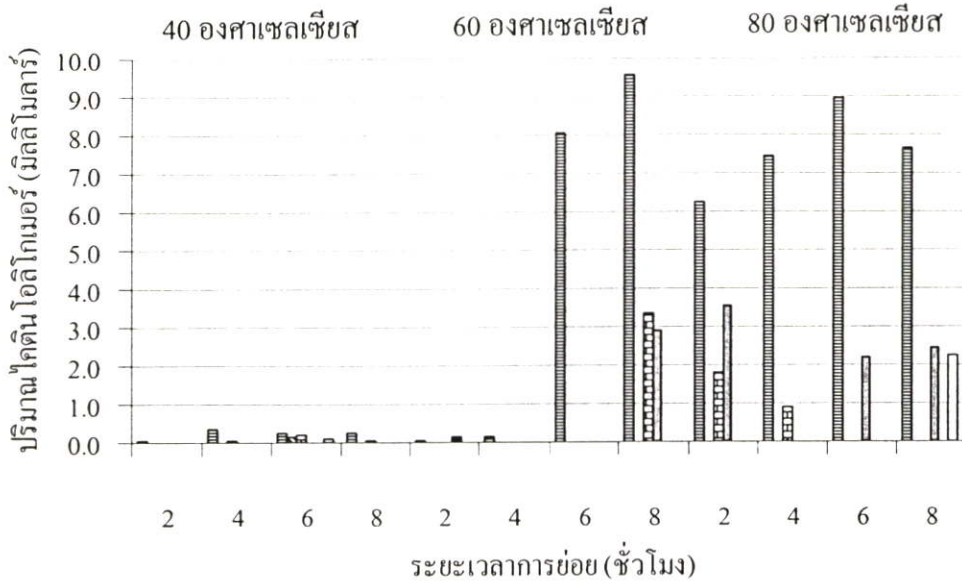
ง. โคตินจากเปลือกกุ้งของสยามไบโอเนต

4.4 การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

ผลการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากเปลือกกุ้ง โดยย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ แสดงในรูปที่ 4.8 การย่อยเปลือกกุ้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ใช้เวลาย่อย 6 ชั่วโมง เป็นสภาวะเหมาะสมที่สุด ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ปริมาณสูงและมีผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน (G1) 0.262 มิลลิโมลาร์ ไคโตไบโอส (G2) 0.130 มิลลิโมลาร์ ไคโตไตรโอส (G3) 0.218 มิลลิโมลาร์ และไคโตเฮกโซส (G6) 0.112 มิลลิโมลาร์

จากการย่อยเปลือกกุ้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อระยะเวลาการย่อยนานขึ้น ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้เพิ่มขึ้นดังรูปที่ 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 แสดงว่าอุณหภูมิ และระยะเวลาการย่อยมีความสัมพันธ์กัน โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ และระยะเวลา พบว่าสามารถย่อยเปลือกกุ้งได้ดีที่สุด เพราะให้ผลิตภัณฑ์ปริมาณสูงในทุกช่วงเวลาการย่อย

การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากแกนหมึก โดยย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลิตภัณฑ์ดังแสดงในรูปที่ 4.9 โดยย่อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น G1 0.295 มิลลิโมลาร์ G3 0.173 มิลลิโมลาร์ และ G6 0.097 มิลลิโมลาร์ ใช้ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียว คือ G1 0.118 มิลลิโมลาร์ ที่ระยะเวลาการย่อย 6 ชั่วโมงได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 0.103 มิลลิโมลาร์ และ G5 0.031 มิลลิโมลาร์ ส่วนที่ 8 ชั่วโมงให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 เพียงชนิดเดียว และมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.529 มิลลิโมลาร์ การย่อยสลายแกนหมึกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G3 และ G6 มีปริมาณ 0.386 0.139 และ 0.095 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ที่ 4 ชั่วโมงพบเพียง G1 0.336 มิลลิโมลาร์ ส่วนการย่อยที่ 6 ให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 0.117 มิลลิโมลาร์ G3 0.066 มิลลิโมลาร์ และ G6 0.100 มิลลิโมลาร์ และ 8 ชั่วโมง ไม่พบ G6 มีเพียง G1 และ G3 เท่านั้น ซึ่งมีปริมาณลดลง เมื่อใช้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสย่อยแกนหมึก พบว่าเวลาการย่อยที่ 2 และ 4 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์เป็น

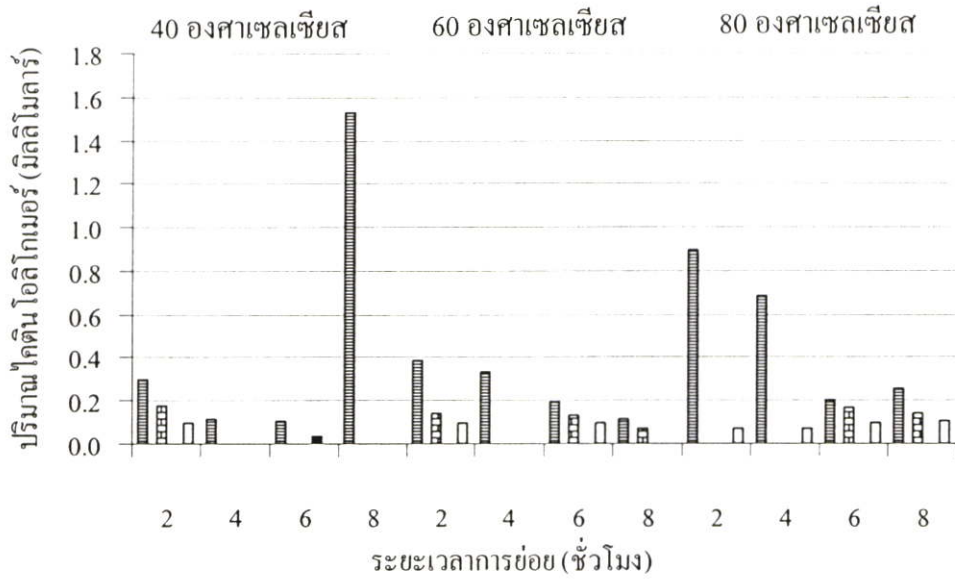


รูปที่ 4.8 ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อยเปลือกกุ้ง ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์

หมายเหตุ ตารางข้อมูลทั้งหมดอยู่ในภาคผนวก ก (ตารางที่ ก.1)

G1 และ G6 ซึ่งระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง ได้ผลิตภัณฑ์ G1 สูงสุดประมาณ 0.892 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ 6 และ 8 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G3 และ G6 โดยที่ 6 ชั่วโมง มีผลิตภัณฑ์ G3 สูงสุดเท่ากับ 0.166 มิลลิโมลาร์ และที่ 8 ชั่วโมง มีผลิตภัณฑ์ G6 สูงสุดประมาณ 0.109 มิลลิโมลาร์ จากการทดลองนี้จะเห็นว่า แขนงหมักให้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด และสามารถย่อยที่อุณหภูมิต่ำได้ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ และระยะเวลา ชนิดผลิตภัณฑ์มีการเปลี่ยนแปลง และผลิตภัณฑ์มีปริมาณเพิ่มขึ้น

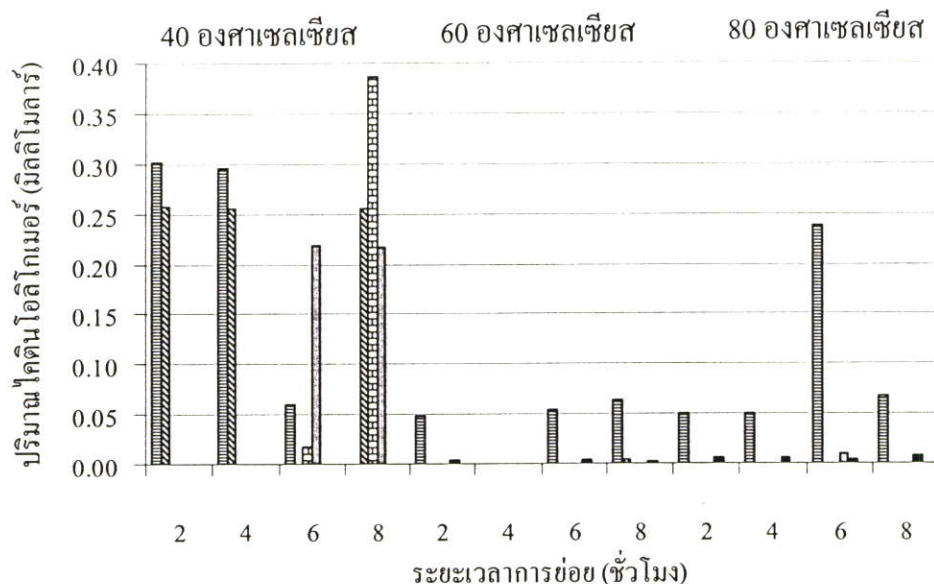
การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ด้วยวิธีทางเคมี โดยย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ใช้อุณหภูมิ 40 60 และ 80 องศาเซลเซียส ได้ผลดังรูปที่ 4.10 เมื่อใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลาการย่อย 2 และ 4 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G2 ในปริมาณใกล้เคียงกัน โดยมี G1 0.300 มิลลิโมลาร์ และ G2 0.250 มิลลิโมลาร์ แต่เมื่อระยะเวลาการย่อยผ่านไป 6 ชั่วโมง กลับไม่พบผลิตภัณฑ์ที่เป็น G2 และ G1 มีปริมาณลดลงเหลือเพียง 0.060 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบ G3 ในปริมาณเล็กน้อย ส่วนผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณมากที่สุดในช่วงเวลาการย่อย 6 ชั่วโมงได้แก่ G4 มีปริมาณ 0.219 มิลลิโมลาร์ การย่อยชั่วโมงที่ 8 ไม่พบ



รูปที่ 4.9 ปริมาณไคติน โอลิโกเมอร์จากการย่อยแกนหมึก ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

หมายเหตุ ตารางข้อมูลทั้งหมดอยู่ในภาคผนวก ก (ตารางที่ ก.1)

ผลิตภัณฑ์ 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 ชั่วโมงได้ผลิตภัณฑ์น้อยมากและที่ 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 ชั่วโมงได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G5 ซึ่งมีปริมาณเท่ากัน ได้แก่ 0.050 และ 0.005 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ต่อมาย่อยที่ 6 ชั่วโมง ให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 0.238 มิลลิโมลาร์ G4 0.009 มิลลิโมลาร์ และ G5 0.005 มิลลิโมลาร์ สำหรับการย่อยที่ 8 ชั่วโมงได้ผลิตภัณฑ์ G1 และ G5 ปริมาณน้อย ดังรูปที่ 4.10 แสดงว่า การย่อยเส้นใย *Monascus sp.* KB20M1 ที่ 40 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุด เพราะให้ผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่มีปริมาณสูง

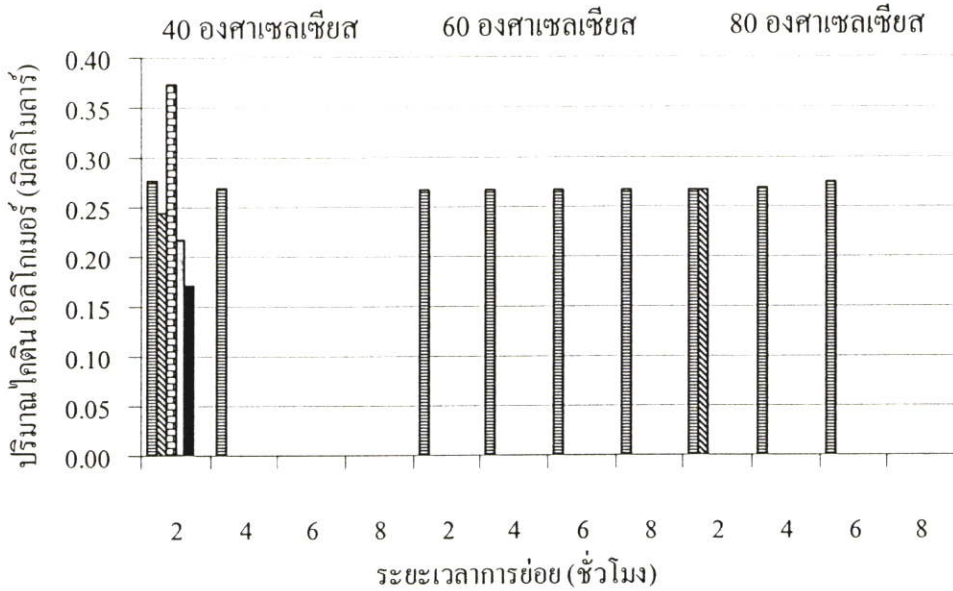


รูปที่ 4.10 ปริมาณไคติน โอลิโกเมอร์จากการย่อยเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์







 เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน
  ไคโตไบโอส
  ไคโตไตรโอส
 ไคโตเตโตส
  ไคโตเพนโตส
  ไคโตเฮกโซส

หมายเหตุ ตารางข้อมูลทั้งหมดอยู่ในภาคผนวก ก (ตารางที่ ก.1)

ไคติน โอลิโกเมอร์ที่ผลิตจากเส้นใยเชื้อรา *M. rouxii* โดยการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 อุณหภูมิการย่อย 40 องศาเซลเซียส พบผลิตภัณฑ์ในช่วง 2 ถึง 4 ชั่วโมง ซึ่งชั่วโมงที่ 2 พบผลิตภัณฑ์หลายชนิดได้แก่ G1 G2 G3 G4 และ G5 ในปริมาณ 0.276 0.244 0.373 0.217 และ 0.171 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนที่ 4 ชั่วโมงพบเพียง G1 ประมาณ 0.270 มิลลิโมลาร์ และในชั่วโมงที่ 6 กับ 8 ไม่พบผลิตภัณฑ์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการย่อยเป็น 60 องศาเซลเซียส พบผลิตภัณฑ์ชนิดเดียว คือ G1 ประมาณ 0.268 มิลลิโมลาร์ ถึงแม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาการย่อยแต่ไม่พบผลิตภัณฑ์อื่น และปริมาณ G1 ยังคงที่ ต่อมาเพิ่มอุณหภูมิการย่อยเป็น 80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมงให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 ประมาณ 0.268 มิลลิโมลาร์ และ G2 ประมาณ 0.268 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ 4 และ 6 ชั่วโมงพบผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียว คือ G1 ซึ่งมีปริมาณ 0.269 และ 0.275 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ส่วนที่ระยะเวลาการย่อย 8 ชั่วโมง ไม่พบผลิตภัณฑ์



รูปที่ 4.11 ปริมาณไคติน โอลิโกเมอร์ จากการย่อยเส้นใยเชื้อรา *M. rouxii* ด้วยกรดฟอสฟอริก เข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

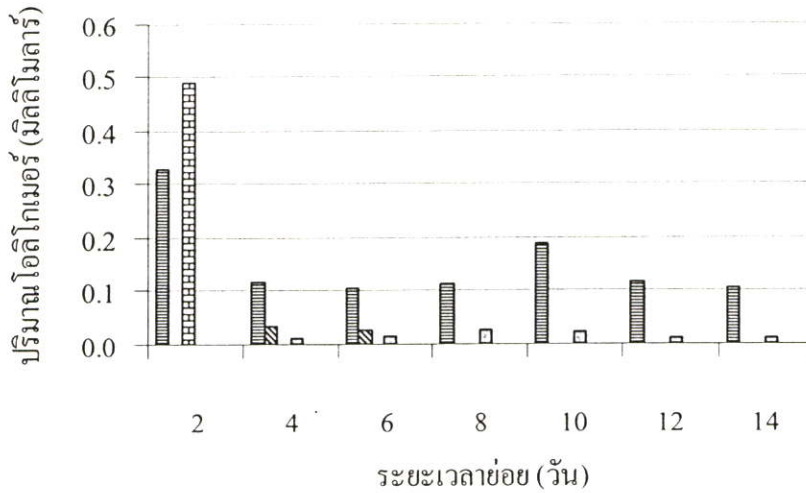
- | | | |
|--|--|--|
|  เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน |  ไคโตไบโอส |  ไคโตไตรโอส |
|  ไคโตเตโตส |  ไคโตเพนโตส |  ไคโตเฮกโซส |

หมายเหตุ ตารางข้อมูลทั้งหมดอยู่ในภาคผนวก ค (ตารางที่ ค.1)

4.5 การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ไคตินเนส

จากการผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากเปลือกกุ้ง โดยใช้เอนไซม์ไคตินเนส พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น 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 มีปริมาณน้อยและแนวโน้มลดเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.12

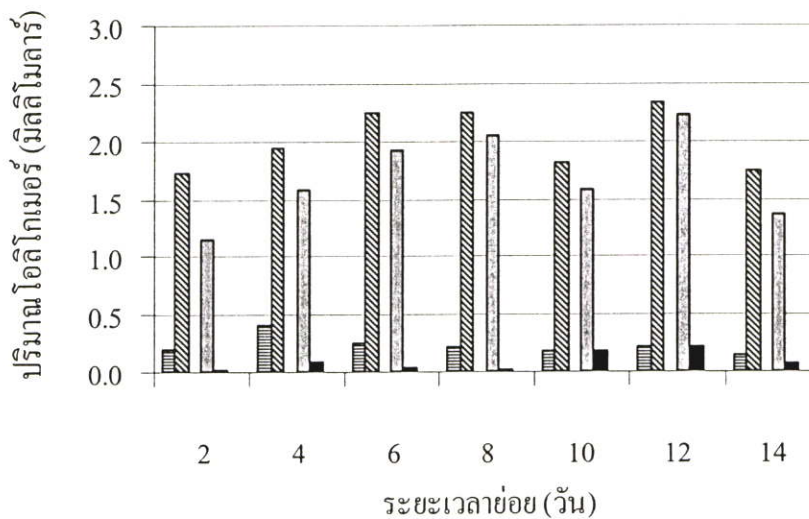
การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากแกนหมึก โดยใช้เอนไซม์ไคตินเนส ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น G1 G2 G4 และ G5 ในวันที่ 2 พบ G1 มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.938 มิลลิโมลาร์ ส่วนวันที่ 12 ให้ผลิตภัณฑ์สูงสุด 3 ชนิด ได้แก่ G2 2.344 มิลลิโมลาร์ G4 2.232 มิลลิโมลาร์ และ G5 0.074 มิลลิโมลาร์ ดังนั้นการย่อยแกนหมึกด้วยเอนไซม์จากเชื้อเบอร์ 6.0 ที่สภาวะเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 12 วัน จึงเป็นระยะเวลาการย่อยที่เหมาะสมที่สุด และให้ผลิตภัณฑ์หลายชนิดดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.12 ปริมาณโคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อยเปลือกกุ้ง ด้วยเอนไซม์โคตินเนส

เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน โคโตไบโอส โคโตไตรโอส
 โคโตเตโตส โคโตเพนโตส โคโตเฮกโซส

หมายเหตุ ตารางข้อมูลทั้งหมดอยู่ในภาคผนวก ก (ตารางที่ ก.2)

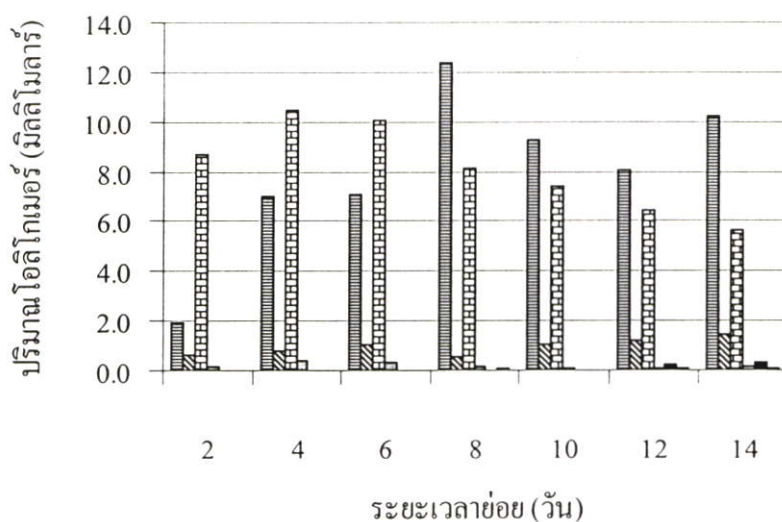


รูปที่ 4.13 ปริมาณโคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อยแกนหมึก ด้วยเอนไซม์โคตินเนส

เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน โคโตไบโอส โคโตไตรโอส
 โคโตเตโตส โคโตเพนโตส โคโตเฮกโซส

หมายเหตุ ตารางข้อมูลทั้งหมดอยู่ในภาคผนวก ก (ตารางที่ ก.2)

การผลิตโคตินโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 โดยใช้เอนไซม์โคติเนส พบว่าใน 4 วันแรกได้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G2 G3 และ G4 ต่อมาในวันที่ 6 มี G5 เพิ่มมาเล็กน้อย ประมาณ 0.040 มิลลิโมลาร์ แต่ไม่พบ G5 ในวันที่ 8 กลับพบว่ามี G6 เพิ่มมาแทน G5 และมี ปริมาณ 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 ซึ่งพบว่าระยะเวลาการ ย่อยนานขึ้นปริมาณผลิตภัณฑ์ G4 G5 และ G6 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.14

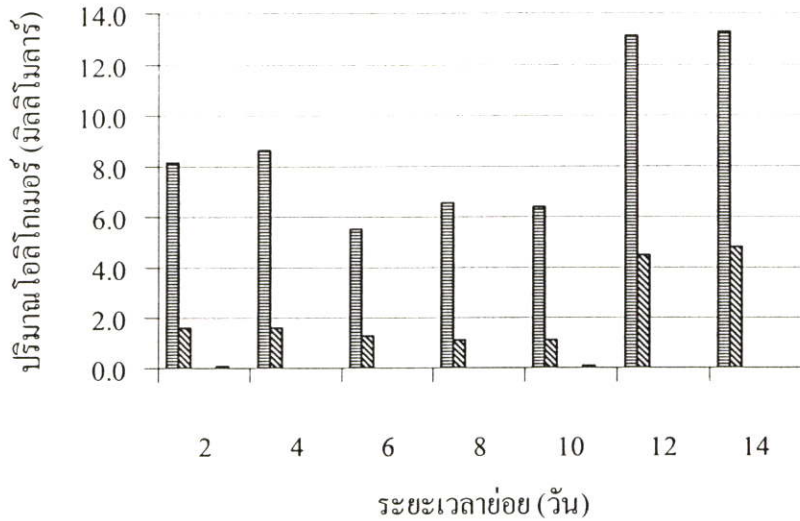


รูปที่ 4.14 ปริมาณโคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อย *Monascus* sp.KB20M1 ด้วยเอนไซม์โคติเนส

- | | | | | | |
|--|-----------------------|--|------------|--|------------|
| | เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน | | โคโตไบโอส | | โคโตไตรโอส |
| | โคโตเตโตส | | โคโตเพนโตส | | โคโตเฮกโซส |

หมายเหตุ ตารางข้อมูลทั้งหมดอยู่ในภาคผนวก ค (ตารางที่ ค.2)

การผลิตโคตินโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา *M. rouxii* โดยใช้เอนไซม์โคติเนส พบว่า ในช่วงวันที่ 2 ถึง 10 ให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 G2 และ G5 ต่อมาในวันที่ 12 ถึง 14 ไม่พบ G5 แต่ ปริมาณ G1 กับ G2 เพิ่มสูงขึ้น และปริมาณสูงสุดในวันที่ 14 มี G1 13.297 มิลลิโมลาร์ และ G2 4.824 มิลลิโมลาร์ ดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์จากการย่อย *M. rouxii* ด้วยเอนไซม์ไคตินเนส

เอนอะเซทิลกลูโคซามิน
 ไคโตไบโอส
 ไคโตไตรโอส

ไคโตเตโตส
 ไคโตเพนโตส
 ไคโตเฮกโซส

หมายเหตุ ตารางข้อมูลทั้งหมดอยู่ในภาคผนวก ค (ตารางที่ ค.2)

จากการทดลองใช้เอนไซม์ไคตินเนส พบว่าสามารถย่อยเส้นใยเชื้อราได้ดีกว่าเปลือกกุ้ง และแกนหมึก โดยให้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณสูง อาจเป็นผลมาจากเปลือกกุ้งและแกนหมึกมีโครงสร้างที่ซับซ้อนและแข็งแรง ยากต่อการย่อยสลาย ในขณะที่เส้นใยเชื้อรามีขนาดเล็ก และโครงสร้างไม่ซับซ้อนจึงง่ายต่อการย่อยสลาย จากการทดลองพบว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคตินเนสที่เป็นเอนไซม์ชนิดย่อยจากปลายสาย (endo-chitinase) ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนมากจึงเป็น G1 และ G2 นอกจากนี้ยังให้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ที่ใช้เป็นครูดเอนไซม์ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะมีเอนไซม์ตัวอื่นๆ ผสมอยู่ อย่างไรก็ตามชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก แม้ว่าจะเพิ่มระยะเวลาการย่อย

การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา พบว่าได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิดขึ้นอยู่กับวิธีการผลิต และสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลาย ซึ่งมีรายงานว่าไคตินไคโตซานที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆ มีผลต่อกระตุ้นการป้องกันตนเองในพืชได้แตกต่าง เช่น การศึกษาในถั่วเหลือง พบว่าเมื่อแช่เมล็ดถั่วเหลืองในสารละลายไคตินโอลิโกเมอร์ชนิด G6 และไคโตซานโอลิโกเมอร์ชนิด G5 ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส (phenylalanine ammonia-lyase : PAL) และเอนไซม์ไทโรซีนแอมโมเนียไลเอส (tyrosine ammonia-lyase : TAL) สูงขึ้น เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้พบในใบถั่วเหลือง ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการป้องกันตนเองของถั่วเหลือง (Khan และคณะ. 2003) และมีการศึกษาในข้าว พบว่า ไคโตซานที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (1335 คาลตัน) สามารถ

กระตุ้นการแสดงออกของยีนกลูคาเนส และโคติเนสในใบข้าวได้สูงกว่าโคโตซานที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (50000 ดาลตัน) (Lin และคณะ. 2005) เป็นต้น ดังนั้นเพื่อศึกษาผลของโคตินโอลิโกเมอร์ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ จึงคัดเลือกตัวอย่างผลิตภัณฑ์มา 3 ชนิด ได้แก่

สารละลาย O1 เป็นผลิตภัณฑ์โคตินโอลิโกเมอร์ที่ผลิตโดยกระบวนการย่อยเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ด้วยเอนไซม์จากเชื้อเบอร์ 6.0 ใช้เวลาย่อยนาน 2 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นโคตินโอลิโกเมอร์ชนิด G3 76.05 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.1

สารละลาย O2 เป็นผลิตภัณฑ์โคตินโอลิโกเมอร์ที่ผลิตโดยกระบวนการย่อยเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ด้วยเอนไซม์จากเชื้อเบอร์ 6.0 ใช้เวลาย่อยนาน 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นโคตินโอลิโกเมอร์ชนิด G1 51.95 เปอร์เซ็นต์ และ G3 41.45 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.1

สารละลาย O3 เป็นผลิตภัณฑ์โคตินโอลิโกเมอร์ที่ผลิตโดยกระบวนการย่อยเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 ด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ใช้เวลาย่อยนาน 8 ชั่วโมง บนอ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นโคตินโอลิโกเมอร์ชนิด G1 90.67 เปอร์เซ็นต์ และ G5 9.35 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเปลือกกุ้ง แกนหมึก เส้นใยเชื้อรา *M. rouxii* และเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 โดยเอนไซม์ไคตินเนส

ลำดับเลข/ผลิตภัณฑ์	ระยะเวลาการย่อย (วัน)						
	2	4	6	8	10	12	14
เปลือกกุ้ง							
G1	40.22	71.51	71.43	80.58	89.91	90.70	89.66
G2	-	20.61	19.05	-	-	-	-
G3	59.78	-	-	-	-	-	-
G4	-	7.88	9.52	19.42	10.09	9.30	10.34
G5	-	-	-	-	-	-	-
G6	-	-	-	-	-	-	-
แกนหมึก							
G1	6.65	10.20	5.72	4.67	4.81	4.41	4.55
G2	55.62	48.23	50.39	49.69	48.38	46.75	52.28
G3	-	-	-	-	-	-	-
G4	37.28	39.40	43.14	45.35	41.82	44.51	40.95
G5	0.45	2.17	0.75	0.29	4.99	4.33	2.22
G6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Monascus</i> sp.KB20M1							
G1	16.91	37.65	38.20	58.04	52.11	49.89	57.25
G2	5.68	4.13	5.85	2.52	5.73	11.66	8.08
G3	75.99	55.89	54.03	38.23	41.59	40.16	31.71
G4	1.42	23.33	1.70	0.75	0.57	0.68	0.73
G5	-	-	0.22	-	-	1.41	1.68
G6	-	-	-	0.46	-	0.54	0.54
<i>M. rouxii</i>							
G1	83.09	84.12	81.16	84.99	84.36	74.90	73.38
G2	16.48	15.77	18.47	14.96	14.44	25.10	26.62
G3	-	-	-	-	-	-	-
G4	-	-	-	-	-	-	-
G5	0.43	0.11	0.37	0.05	1.20	-	-
G6	-	-	-	-	-	-	-

4.6 ศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโคตินโอลิโกเมอร์ต่อการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิส

กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิสมีความพิเศษ คือ ถ้ายอดและใบเน่าเปื่อยเหลือเพียงคอ แต่ รากยังคงอยู่ และทำหน้าที่ได้สมบูรณ์ ก็จะสามารถให้กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิสสามารถเจริญแตก ยอดและใบใหม่ได้ (ระพี สาคริก. 2530) จึงใช้กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิสเป็นต้นแบบศึกษา การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโคตินโอลิโกเมอร์ต่อการเจริญของกล้วยไม้ และใช้สารละลายโคติน โอลิโกเมอร์ O1 O2 และ O3 ในการทดสอบ ซึ่งกล้วยไม้ที่นำมาปลูกใหม่ต้องให้อยู่ในที่ร่ม หรือ ในที่มีแสงน้อยกว่าปกติ ประมาณ 5 ถึง 10 สัปดาห์ เพื่อให้กล้วยไม้สามารถปรับตัวได้แล้ว จึงนำ ออกมาเลี้ยงในสภาวะปกติ (มลิวัลย์ พรหมรักษา. 2539)

4.6.1 การรอดชีวิตและการเกิดรากใหม่ในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิส หลังจากได้รับ โคตินโอลิโกเมอร์แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

จากการนำกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิสจากขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาแช่ใน สารละลาย O1 O2 และ O3 ที่ความเจือจาง 0 10 50 100 และ 1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำลงกระถางเพาะเลี้ยงในเรือนอนุบาลกล้วยไม้ก่อนแล้วบันทึก ผลการทดลองเป็นเวลา 10 สัปดาห์ วิธีวัดการเจริญของพืชนิยมนับที่การเพิ่มขึ้นของใบ ยอด หรือ ราก แต่เนื่องจากกล้วยไม้เป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้า การนับจำนวนใบจึงไม่เหมาะสม ในเชิงปฏิบัติ ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงใช้วิธีวัดค่าความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ทั้งหมดในแต่ละต้น ซึ่งกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิส อยู่ในสกุลที่มีรากขนาดใหญ่ และสามารถแตกหน่อเป็นต้นใหม่ ได้ (สมศักดิ์ รักไพบูรณ์สมบัติ. 2540) การวัดความยาวรากจึงสัมพันธ์กับการเจริญ เมื่อใช้ ร่วมกับการสังเกตการแตกหน่อ และการเพิ่มขึ้นของจำนวนใบ สามารถใช้บ่งบอกการมีชีวิตรอด ของต้นกล้วยไม้ได้ (Nge และคณะ. 2006) ผลทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารละลาย O1 O2 และ O3 ต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเปอร์เซ็นต์การเกิดรากใหม่ของฟาแลนนอโฟซิส แสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4 ตามลำดับ พบว่าการทดลองในกลุ่มควบคุม (แช่ต้นกล้วยไม้ในน้ำ กลั่นเป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมงตามลำดับ) ให้ผลเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการเกิดราก ใหม่แตกต่างกันออกไป โดยไม่มีแนวโน้มทางใดทางหนึ่ง แต่เมื่อวิเคราะห์จากความยาวเฉลี่ย รากใหม่ที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 4.5) พบว่า ระยะเวลาการแช่ในน้ำกลั่นนานขึ้นมีผลทำให้ค่าความยาว เฉลี่ยรากใหม่ที่เกิดขึ้นกลับลดลง อาจเป็นผลมาจากปริมาณน้ำที่รากกล้วยไม้ได้รับ แสดงว่า ระยะเวลาการได้รับน้ำนานขึ้นมีผลต่อการงอกรากใหม่อย่างชัดเจน ซึ่งอาจส่งผลต่อการรอดชีวิต ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิสด้วย (มิสเตอร์ เอ็ม. 2514, มังกร โลหะอุดม. 2545) ขณะที่ กลุ่มการทดลองแช่ต้นกล้วยไม้ในสารละลาย O1 ที่ระดับความเจือจาง 10 เท่า ทุกช่วงเวลากการ

ได้รับสาร (3-9 ชั่วโมง) ทำให้กล้วยไม้ตาย อาจเนื่องมาจากกล้วยไม้ดูดซับสารที่อยู่ในสารละลาย O1 มากเกินไป จึงส่งผลยับยั้งการเจริญ ที่ระดับความเงือก 50 เท่า พบว่า เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 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 O1 ที่ความเงือก 1000 เท่า ที่ระยะเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง ให้การรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ความยาวรากเฉลี่ยกลับมีค่าลดลงจาก 78.3 มิลลิเมตร เป็น 51.7 มิลลิเมตร แสดงว่าระยะเวลาการได้รับสาร 3 ชั่วโมง ดีที่สุด แต่เมื่อเพิ่มเวลาเป็น 5 ชั่วโมง พบความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ลดลง อาจเป็นผลจากการได้รับน้ำเข้ามาในต้นกล้วยไม้ ซึ่งจะเห็นผลชัดขึ้นเมื่อได้รับสารเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ทำให้การรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่มีเปอร์เซ็นต์ลดลง สอดคล้องกับความยาวเฉลี่ยของรากเกิดใหม่ที่มีค่าต่ำสุดในกลุ่มการทดลองนี้

ผลเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ในทางสถิติ พบว่ากล้วยไม้ที่แช่ในสารละลาย O1 ความเงือก 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ดังตารางที่ 4.6 โดยแตกต่างจากต้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญในเชิงสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$) ส่วนการแช่ที่ความเงือก 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง มีการเจริญที่ไม่แตกต่างจากต้นควบคุม แต่การแช่ที่ความเงือก 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง ความเงือก 100 เท่า นาน 9 ชั่วโมง และ ความเงือก 1000 เท่า นาน 6 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส เมื่อนำไปแช่สารละลาย O1 O2 และ O3 ที่ระดับความเงืงจาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

ค่าเงืงจาง (เท่า)	ชุดควบคุม 0	ระยะเวลาแช่ใน O1 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน O2 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน O3 (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		0	0	0	0	33.33	66.67	66.67	33.33	33.33
50		100	66.67	33.33	33.33	100	100	100	66.67	0
100		100	100	100	100	100	100	100	100	100
1000		100	100	33.33	100	100	100	100	100	66.67

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การเกิดรากใหม่ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส เมื่อนำไปแช่สารละลาย O1 O2 และ O3 ที่ระดับความเงืงจาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

ค่าเงืงจาง (เท่า)	ชุดควบคุม 0	ระยะเวลาแช่ใน O1 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน O2 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน O3 (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	66.67	33.33
10		0	0	0	0	0	33.33	66.67	33.33	33.33
50		100	100	33.33	33.33	100	66.67	100	33.33	0
100		33.33	100	100	66.67	100	66.67	100	100	66.67
1000		100	100	33.33	100	100	100	100	66.67	100

ตารางที่ 4.5 ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส เมื่อนำไปแช่สารละลาย O1 O2 และ O3 ที่ระดับความเงืงจาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

ค่าเงืงจาง (เท่า)	ชุดควบคุม 0	ระยะเวลาแช่ใน O1 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน O2 (ชั่วโมง)			ระยะเวลาแช่ใน O3 (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	31.3	9.3
10		0	0	0	0	0	4.3	8.0	2.7	0
50		29.0	36.7	0	17.7	27.7	10.0	56.3	10.0	0
100		41.0	56.0	59.0	45.3	56.3	10.7	44.3	74.3	35.7
1000		78.3	51.7	17.0	94.0	52.0	45.7	69.0	55.7	46.0

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพชีส ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปแช่สารละลาย O1 ที่ระดับความเงือก 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

สภาวะการให้ไคตินโอลิโกเมอร์	ค่าเฉลี่ยความยาวรากเกิดใหม่โดยรวม (มิลลิเมตร)
ชุดควบคุม	15.00 ^c
O1 เงือก 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	29.00 ^{bc}
O1 เงือก 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	56.00 ^b
O1 เงือก 100 เท่า นาน 9 ชั่วโมง	59.00 ^b
O1 เงือก 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	78.00 ^{a*}
O1 เงือก 1000 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	51.67 ^b

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

ตัวอักษรเหมือนกัน คือ การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน คือ การเจริญเติบโตของกล้วยไม้มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ทดลองแช่ต้นกล้วยไม้ในสารละลาย O2 ที่ระดับความเงือก 10 เท่า พบว่า ต้นกล้วยไม้ที่แช่สารนาน 3 ชั่วโมง กล้วยไม้ตายหมด ในขณะที่ 6 และ 9 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเพิ่มขึ้น ตามลำดับ แต่ไม่พบการงอกรากใหม่ที่ 6 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ของต้นที่แช่สาร 9 ชั่วโมง พบว่าเท่ากับกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากต้นกล้วยไม้ได้รับสารมากเกินไป จึงยับยั้งการงอกรากใหม่ ที่ระดับความเงือก 50 เท่า เมื่อเพิ่มเวลาแช่ทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการงอกรากใหม่เพิ่มขึ้นถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 9 ชั่วโมง การงอกรากใหม่กลับลดลง ซึ่งเป็นในทำนองเดียวกับความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ อาจเป็นเพราะแช่ต้นกล้วยไม้ในสารละลายนานเกินไป ขณะที่ระดับความเงือก 100 เท่า พบว่า การแช่สารละลายที่ระยะเวลาต่างๆ (3 ถึง 9 ชั่วโมง) ให้ผลการรอดชีวิตเท่ากัน (100 เปอร์เซ็นต์) แต่การงอกรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ พบเพียงต้นที่แช่สารนาน 6 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาแช่ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่เพิ่มขึ้น จนกระทั่งชั่วโมงที่ 9 ความยาวเฉลี่ยกลับลดลง 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 เหมาะสม

ต่อการดูดซับสารของดินกล้วยไม้ แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ พบว่าเมื่อเวลาแช่เพิ่มขึ้น กลับมีผลทำให้ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ลดลง อาจเป็นเพราะปริมาณน้ำที่กล้วยไม้ได้รับมากเกินไป จึงมีผลยับยั้งการยืดตัวของราก

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของการเจริญเติบโตในกลุ่มนี้ พบว่าดินที่แช่สารละลาย O2 ความเจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง เจริญเติบโตได้ดีที่สุด ซึ่งมีผลการเจริญที่มีความแตกต่างจากดินอื่นอย่างมีนัยสำคัญในเชิงสถิติที่ระดับ 0.05 ($p < 0.05$) การเจริญของดินที่แช่สารละลาย O2 ความเจือจาง 50 เท่า นาน 6 ชั่วโมง ไม่แตกต่างจากการเจริญของกลุ่มควบคุม การเจริญเติบโตของดินที่แช่สารละลาย O2 ความเจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง ที่ความเจือจาง 1000 เท่า นาน 6 ชั่วโมง และความเจือจาง 1000 เท่า นาน 9 ชั่วโมง มีผลการเจริญเติบโตที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซีส ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปแช่สารละลาย O2 ที่ระดับความเจือจาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

สภาวะการให้ไคตินโอลิโกเมอร์	ค่าเฉลี่ยความยาวรากเกิดใหม่โดยรวม (มิลลิเมตร)
ชุดควบคุม	15.00 ^c
O2 เจือจาง 50 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	27.67 ^{bc}
O2 เจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	56.33 ^b
O2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	94.00 ^{a*}
O2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	52.00 ^b
O2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 9 ชั่วโมง	45.67 ^b

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

ตัวอักษรเหมือนกัน คือ การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ
ตัวอักษรต่างกัน คือ การเจริญเติบโตของกล้วยไม้มีความแตกต่างกันทางสถิติ

กลุ่มการทดลองแช่ต้นกล้วยไม้ในสารละลาย O3 ที่ระดับความเงือก 10 เท่า พบว่าระยะเวลาแช่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การรอดชีวิต และการงอกรากใหม่ลดลงตามลำดับ โดยไม่มีช่วงเวลาใดที่การรอดชีวิต และการงอกรากใหม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ พบว่าให้ผลไปในทางเดียวกัน ซึ่งความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าระยะเวลาที่ต้นกล้วยไม้ได้รับสารนานขึ้น มีผลยับยั้งการงอกรากใหม่ และส่งผลกระทบต่อการรอดชีวิตด้วย ที่ระดับความเงือก 50 เท่า พบว่าแช่ที่ 3 ชั่วโมง ให้ผลการรอดชีวิตและการงอกรากใหม่ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ 6 ชั่วโมง เริ่มลดลง และตายหมดในชั่วโมงที่ 9 เมื่อวิเคราะห์ความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่ พบว่าให้ผลไปในทางเดียวกัน แสดงว่าการแช่สารละลายเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ต้นกล้วยไม้ได้รับสารเพียงพอ ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และการงอกรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ระดับความเงือก 100 เท่า พบว่าทุกช่วงเวลาแช่ (3 ถึง 9 ชั่วโมง) มีผลทำให้การรอดชีวิตและการงอกรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นที่ 9 ชั่วโมง การงอกรากใหม่ กลับลดลงเหลือเพียง 66.69 เปอร์เซ็นต์ และความยาวเฉลี่ยรากเกิดใหม่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาแช่ จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 9 จึงลดลง อาจเป็นเพราะต้นกล้วยไม้ได้รับสารมากเกินไป ส่วนที่ระดับความเงือก 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

ผลเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้หลังแช่สารละลาย O3 แล้วเพาะเลี้ยง 10 สัปดาห์ พบว่าสถานะที่มีผลทำให้กล้วยไม้เจริญดีที่สุด คือต้นที่แช่สารละลาย O3 ความเงือก 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง แต่การเจริญในสถานะนี้ไม่มีความแตกต่างจากกล้วยไม้ที่แช่ในความเงือก 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง และ ความเงือก 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง นอกจากนี้การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ที่แช่สารละลาย O3 ความเงือก 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง และ ความเงือก 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง ยังมีการเจริญที่ไม่มีความแตกต่างจากต้นที่แช่ ในความเงือก 100 เท่า นาน 3 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพชีส ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปแช่สารละลาย O3 ที่ระดับความเจือจาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

สภาวะการให้ไคตินโอลิโกเมอร์	ค่าเฉลี่ยความยาวรากเกิดใหม่โดยรวม (มิลลิเมตร)
ชุดควบคุม	15.00 ^c
O3 เจือจาง 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	56.33 ^{ab}
O3 เจือจาง 100 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	44.33 ^b
O3 เจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	74.33 ^{a*}
O3 เจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	69.00 ^{ab}

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

ตัวอักษรเหมือนกัน คือ การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกัน คือ การเจริญเติบโตของกล้วยไม้มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อนำการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ทั้งหมดที่มีการรอดชีวิต และการเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ มาเปรียบเทียบเพื่อหาต้นที่มีการเจริญดีที่สุด โดยวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยความยาวรากเกิดใหม่โดยรวม ดังแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่ากล้วยไม้ที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลาย O2 ความเจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง มีการเจริญดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับต้นที่แช่สารละลาย O1 ความเจือจาง 100 เท่า นาน 9 ชั่วโมง ต้นที่แช่สารละลาย O1 ความเจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง ต้นที่แช่สารละลาย O3 ความเจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง และต้นที่แช่สารละลาย O3 ความเจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง ซึ่งกล้วยไม้ดังกล่าวไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับต้นที่มีการเจริญเติบโตในกลุ่ม b ถึงแม้ว่ากล้วยไม้ต้นที่แช่สารละลาย O2 ความเจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง จะมีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับ 4 ต้นดังกล่าว แต่มีการเจริญเติบโตที่ความแตกต่างจากกล้วยไม้ในกลุ่ม b c และ d อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 (p<0.01)

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซิส ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปแช่สารละลาย O1 O2 O3 ที่ระดับความเจือจาง 0-1000 เท่า เป็นเวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

สถานะการให้ไคตินโอลิโกเมอร์	ค่าเฉลี่ยความยาวรากเกิดใหม่โดยรวม (มิลลิเมตร)
ชุดควบคุม	15.00 ^c
O1 เจือจาง 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	29.00 ^{cd}
O1 เจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	56.00 ^{bc}
O1 เจือจาง 100 เท่า นาน 9 ชั่วโมง	59.00 ^{abc}
O1 เจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	78.00 ^{ab}
O1 เจือจาง 1000 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	51.67 ^{bc}
O2 เจือจาง 50 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	27.67 ^{cd}
O2 เจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	56.33 ^{bc}
O2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	94.00 ^{a*}
O2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	52.00 ^{bc}
O2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 9 ชั่วโมง	45.67 ^{bcd}
O3 เจือจาง 50 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	56.33 ^{bc}
O3 เจือจาง 100 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	44.33 ^{bcd}
O3 เจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง	74.33 ^{ab}
O3 เจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง	69.00 ^{ab}

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

ตัวอักษรเหมือนกัน คือ การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

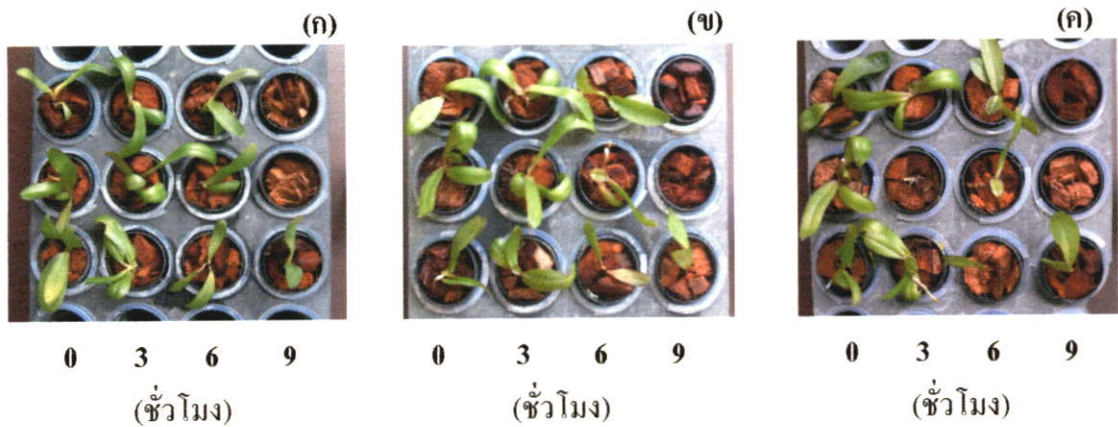
ตัวอักษรต่างกัน คือ การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการทดลองพบว่ากล้วยไม้ที่ผ่านการแช่ O2 เจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตสูงสุด ซึ่ง O2 ประกอบด้วยไคตินโอลิโกเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่ G1 และ G3 ในปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วน O1 มีเพียงไคตินโอลิโกเมอร์ชนิด G3 อย่างเดียวเท่านั้น และ O3 มีไคตินโอลิโกเมอร์ชนิด G1 กับ G5 แต่มี G5 ในปริมาณที่น้อยมากเมื่อถูกเจือจาง G5 อาจไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ หรือ มีผลน้อยมาก ดังนั้นการที่ O2 สามารถกระตุ้นให้กล้วยไม้เจริญเติบโตได้ดี เนื่องมาจากการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินโอลิโกเมอร์ชนิด G1 และ G3 ฤทธิ์เสริมกันในการทำงานเดียวกันงานวิจัยของ Khan และคณะ (2003) พบว่าไคโตซาน และไคตินโอลิโกเมอร์ มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส และเอนไซม์ไทโรซีนแอมโมเนียไลเอส ในใบถั่วเหลือง

ความเจือจาง 1000 เท่า อาจอยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไคตินโอลิโกเมอร์ โดยมีงานวิจัยหลายฉบับความเข้มข้นไคตินไคโตซานที่ระดับต่างๆ สามารถออกฤทธิ์ได้ดีกว่าความเข้มข้นระดับสูง เช่น งานวิจัยของ เกศนรี จงโชติศิริกุล (2544) ศึกษาผลของไคโตซานต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนส และการชักนำการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส และเบต้า-1,3-กลูคาเนส ในองุ่น พบว่า ไคโตซานที่มีความเข้มข้น 3200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอส 4.5 ที่อุณหภูมิห้อง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ซึ่งก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนส และกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส และเบต้า-1,3-กลูคาเนส ในองุ่นได้ Tham และคณะ (2001) ได้ศึกษาการใช้ไคโตซานที่ผ่านการฉายรังสีใส่ในอาหารเพาะต้นกล้า โดยใช้ความเข้มข้น 100-200 ส่วนในตัวทำลายล้างส่วน มีผลทำให้ต้นกล้าข้าวและกล้าข้าวสาเลีมีการเจริญเติบโตดีขึ้น และทนต่อพิษของสารวานาเดียม ซึ่งปล่อยมาจากโรงงานอุตสาหกรรม และเหมืองแร่ถ่านหิน นอกจากนี้ Sharathchandra และคณะ (2004) ได้ศึกษาผลของไคโตซานที่มีชื่อทางการค้าว่า Elexa โดยใช้อัตราส่วนของสาร Elexa 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 19 ส่วน แช่เมล็ดข้าวฟ่างนาน 6 ชั่วโมง ทำให้เมล็ดข้าวฟ่างมีการงอก และหน่อแข็งแรงมากขึ้น นอกจากนี้ยังกระตุ้นความสามารถในการต้านทานโรคด้วย

4.6.2 ลักษณะกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิส หลังได้รับโคตินโอลลิกโอเมอร์แล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์

กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิสชุดควบคุม ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนโคตินโอลลิกโอเมอร์ ใน 2 สัปดาห์แรกต้นที่แช่ 0 3 และ 6 ชั่วโมง มีใบสีเขียวสด บางต้นเริ่มแตกใบอ่อนเล็กๆ แต่ที่แช่ 9 ชั่วโมง เกิดอาการใบเหลือง รากเน่าเปื่อย และตายในที่สุดดังรูปที่ 4.16 (ก) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 6 กล้วยไม้ต้นที่รอดชีวิตเริ่มมียอดอ่อน และรากใหม่เกิดขึ้น แต่สีของใบเริ่มเหลือง ดังแสดงในรูปที่ 4.16 (ข) สัปดาห์ที่ 10 แสดงในรูปที่ 4.16 (ค) ใบมีสีเหลืองมากขึ้น บางต้นใบแห้งตาย กล้วยไม้ต้นที่ไม่ผ่านการแช่น้ำก่อนนำไปเลี้ยงใบมีลักษณะเหี่ยวเฉา อาจเนื่องมาจากรากเก่าทำหน้าที่ดูดซับน้ำได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ และไม่มีรากเกิดใหม่ ดังนั้นการที่กล้วยไม้ไม่มีรากเกิดใหม่อาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการดูดน้ำและแร่ธาตุลดลง ใบจึงเหลืองและเหี่ยวเฉาตายในที่สุด



รูปที่ 4.16 ลักษณะการเจริญของต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิส ในกลุ่มควบคุมแช่กล้วยไม้ในน้ำกลั่นที่เวลา 0 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์(ก) 6 สัปดาห์ (ข) 10 สัปดาห์ (ค)

การศึกษาผลของ O1 ต่อการเจริญในกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอโฟซิสให้ผลดังรูปที่ 4.17 กล้วยไม้ที่แช่ O1 แล้วเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ ดังแสดงในรูปที่ 4.17(ก) พบว่าเมื่อแช่กล้วยไม้ใน O1 นาน 3 และ 6 ชั่วโมง กล้วยไม้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ใบสีเขียวสด ไม่มีการแตกใบใหม่ แต่เริ่มรากเกิดใหม่และความยาวรากเพิ่มขึ้น ส่วนต้นที่แช่ O1 นาน 9 ชั่วโมง บางต้นมีใบลักษณะเน่าเปื่อย และตาย โดยเฉพาะต้นที่แช่ใน O1 เจือจาง 1000 เท่า ต่อมาสัปดาห์ที่ 6 กล้วยไม้บางต้นใบเริ่มมีสีเหลือง ดังรูปที่ 4.17 (ข) เริ่มมีการแตกใบอ่อน มีรากเกิดใหม่เพิ่มขึ้น และรากมีความยาวรวมประมาณ 25 ถึง 35 มิลลิเมตร การเจริญของกล้วยไม้ที่แช่ O1 ในสัปดาห์ที่ 10 ดังรูปที่ 4.17 (ค) เมื่อเจือจาง O1 10 เท่า แล้วแช่กล้วยไม้ นาน 3 6 และ 9 ชั่วโมง

พบว่ากล้วยไม้ตายหมดทั้ง 3 ช่วงเวลา ค่าการเงิองาง 50 เท่า ใช้เวลาแช่ 3 และ 6 ชั่วโมง ใบกล้วยไม้มีเหลืองอมม่วง และมีอาการเน่าเปื่อยบริเวณโคนใบ บางใบแห้งตาย ส่งผลให้จำนวนใบเหลือเพียง 1 ถึง 3 ใบ ไม่พบการแตกใบใหม่ในช่วงเวลานี้ เพิ่มค่าเงิองางเป็น 100 เท่า พบว่าทุกช่วงเวลากการแช่กล้วยไม้สามารถเจริญเติบโตได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 3 ช่วงเวลา นอกจากนี้ยังมีเปอร์เซ็นต์การเกิดรากใหม่สูง รากที่เกิดใหม่มีความสมบูรณ์ ขนาดใหญ่ สีเขียวอ่อนซึ่งมีบางรากสีขาวและช้ำขาว 10-20 มิลลิเมตร ส่งผลให้ใบมีลักษณะอวบน้ำ สีใบเป็นสีเขียวสด และพบการแตกยอดใหม่ที่ค่าเงิองางนี้ กล้วยไม้ที่แช่ O1 เงิองาง 1000 เท่า ใช้เวลาแช่ 3 และ 6 ชั่วโมง กล้วยไม้เจริญได้มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะใบสด มีสีเขียว รากเกิดใหม่สมบูรณ์ แข็งแรง ขนาดใหญ่ สีขาวและสีเขียวอ่อน มีความยาวรากโดยเฉลี่ยประมาณ 50 ถึง 80 มิลลิเมตร ในขณะที่ 9 ชั่วโมง มีการรอดชีวิตเพียง 33.33 เปอร์เซ็นต์

การเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซีสหลังแช่ O2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในสัปดาห์ที่ 2 มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.18 (ก) ใบยังมีสีเขียวสดในทุกค่าการเงิองาง ยกเว้นค่าเงิองาง 10 เท่า ที่ใบเริ่มมีสีเหลืองอมม่วง และบางต้นใบเน่าเปื่อย ต่อมาในสัปดาห์ที่ 6 การเจริญของกล้วยไม้แสดงในรูปที่ 4.18 (ข) พบว่ากล้วยไม้ที่แช่ O2 เงิองาง 10 และ 50 เท่า ไม่พบการเกิดรากใหม่มีเพียงรากเดิมที่ยาวขึ้นประมาณ 5 ถึง 10 มิลลิเมตร ใบเริ่มมีสีเหลืองอมม่วง มากขึ้นและมีใบเน่าเปื่อย ต้นที่แช่ O2 เงิองาง 100 และ 1000 เท่า เริ่มมีการแตกใบอ่อนเกิดรากใหม่ประมาณ 1 ถึง 2 ราก ความยาวรากโดยรวมเฉลี่ยประมาณ 20 ถึง 30 มิลลิเมตร ในสัปดาห์ที่ 10 แสดงผลการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซีส ดังรูปที่ 4.18 (ค) กล้วยไม้ที่ผ่านการแช่ O2 เงิองาง 10 และ 50 เท่า ทุกช่วงเวลากการแช่ใบเกิดการเน่าเปื่อย ทำให้เหลือแต่ต่อส่วนต้นที่แช่ O2 เงิองาง 100 และ 1000 เท่า ใบมีสีเขียวสด ไม่มีอาการเน่าเปื่อย พบการแตกใบและรากอ่อนอยู่สม่ำเสมอ วัดความยาวรากโดยรวมเฉลี่ยประมาณ 55 ถึง 75 มิลลิเมตร

ระยะเวลาการแช่ต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟูซี่ในสารละลาย O1 3 ชั่วโมง



ระยะเวลาการแช่ต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟูซี่ในสารละลาย O1 6 ชั่วโมง



ระยะเวลาการแช่ต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟูซี่ในสารละลาย O1 9 ชั่วโมง



10 50 100 1000

ระดับความเจือจาง (เท่า)

10 50 100 1000

ระดับความเจือจาง (เท่า)

10 50 100 1000

ระดับความเจือจาง (เท่า)

รูปที่ 4.17 ลักษณะการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟูซี่ในกลุ่มที่ได้รับสารละลาย O1 ความเจือจางต่างๆ (ระดับความเจือจาง 10 50 100 และ 1000 เท่า) ณ.ระยะเวลา 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วย่นามาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก) 6 สัปดาห์ (ข) 10 สัปดาห์ (ค)

เมื่อแช่กล้วยไม้ในสารละลาย O2 นาน 6 ชั่วโมง ใน 6 สัปดาห์แรกกล้วยไม้ที่แช่สารละลาย O2 ความเจือจาง 10 เท่า ใบแสดงอาการเน่าเปื่อยและบางต้นตายไป ดังรูปที่ 4.18 (ก) และ (ข) ส่วนต้นที่ในความเจือจาง 50 100 และ 1000 เท่า ใบมีสีเขียวสด พบเพียงบางต้นที่ใบเริ่มเหลือง แต่ก็มีบางต้นเริ่มแตกใบอ่อนและมีรากเกิดใหม่ รากเดิมมีการเจริญยืดยาวขึ้น สามารถวัดความยาวรากโดยเฉลี่ยประมาณ 20 ถึง 40 มิลลิเมตร เพาะเลี้ยงกล้วยไม้ที่ผ่านการแช่สารละลาย O2 จนถึงสัปดาห์ที่ 10 ได้ผลดังรูปที่ 4.18 (ค) กล้วยไม้มีใบสีเขียวสดมากขึ้น ต้นที่ความเจือจาง 10 เท่า พบอาการเน่าเปื่อยบริเวณโคนใบและตายในที่สุด ส่วนต้นที่ความเจือจาง 50 100 และ 1000 เท่า ใบอ่อนที่เกิดใหม่มีสีเขียวสดในขณะที่ใบแก่เริ่มเหลือง พบการเกิดรากใหม่ในต้นที่แช่ในความเจือจาง 100 และ 1000 เท่า ประมาณต้นละ 2 ถึง 5 ราก แต่รากเกิดใหม่มีลักษณะสั้นๆ ทำให้มีความยาวรากโดยรวมเฉลี่ยประมาณ 30 ถึง 50 มิลลิเมตร

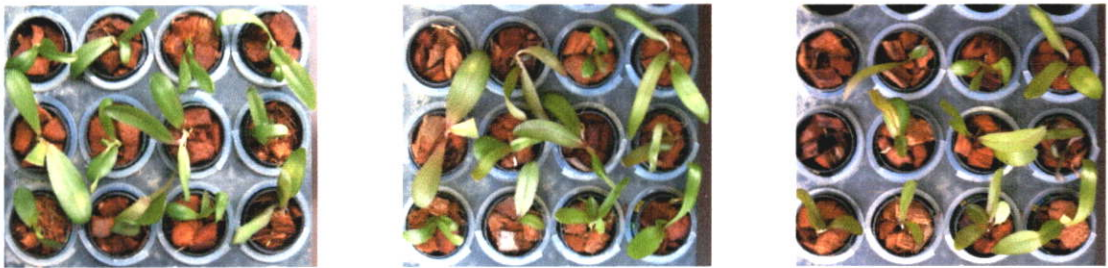
กล้วยไม้ผ่านการที่แช่สารละลาย O2 นาน 9 ชั่วโมง มีการเจริญใน 6 สัปดาห์แรกแสดงผลในรูปที่ 4.18 (ก) และ (ข) พบว่าในทุกความเจือจางมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ส่วนใหญ่ใบล่างสุดจะเหลืองและเฉาตาย แต่ใบที่อยู่ถัดมายังคงมีสีเขียวสด อีกทั้งมีการแตกใบอ่อนในบางต้นด้วย การเกิดรากใหม่มีให้เห็นในต้นที่แช่สารละลาย O2 ความเจือจาง 50 100 และ 1000 เท่า วัดความยาวรากโดยรวมเฉลี่ยประมาณ 10 ถึง 13 มิลลิเมตร สัปดาห์ที่ 10 กล้วยไม้ที่แช่สารละลาย O2 นาน 9 ชั่วโมง ใบล่างมีสีเหลืองมีอาการเหี่ยวเฉาและบางใบหลุดร่วงไป บางต้นเกิดโรคโคนเน่า ดังรูปที่ 4.18 (ค) ลักษณะดังกล่าวอาจคาดการณ์ได้ว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน่าจะลดลง นอกจากนี้ยังพบว่ามีใบบางส่วนเป็นสีเหลืองมีจุดสีน้ำตาลบริเวณใบด้วย จำนวนใบเหลือเพียง 1 ถึง 3 ใบเท่านั้น เมื่อดูการเกิดรากใหม่ทั้ง 4 ค่าเจือจางมีรากเกิดใหม่ต้นละ 1 ถึง 2 ราก วัดความยาวรากโดยรวมเฉลี่ยประมาณ 15 ถึง 35 มิลลิเมตร

การเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอพซีสหลังแช่สารละลาย O3 นาน 3 ชั่วโมง ใน 6 สัปดาห์แรกมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ใบยังมีสีเขียวสด ไม่มีการแตกใบอ่อนดังรูปที่ 4.19 (ก) และ (ข) พบการเกิดรากใหม่ในต้นที่แช่สารละลาย O3 ความเจือจาง 50 และ 100 เท่า เพียงต้นละ 1 รากเท่านั้น รากเดิมมีการเจริญยืดยาวออกวัดความยาวรากโดยรวมเฉลี่ยประมาณ 10 ถึง 30 มิลลิเมตร ต่อมาในสัปดาห์ที่ 10 ใบเริ่มเหลืองมากขึ้น บางส่วนเหี่ยวเฉาและร่วงโรยไป ใบอ่อนที่เกิดใหม่โตขึ้นมีสีเขียวสด ดังแสดงในรูปที่ 4.19 (ค) พบการเกิดรากใหม่ทั้ง 4 ความเจือจางและต้นที่แช่สารละลาย O3 ความเจือจาง 50 100 และ 1000 เท่า มีการเกิดรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ วัดความยาวรากโดยรวมเฉลี่ยประมาณ 30 ถึง 70 มิลลิเมตร

ระยะเวลาการแช่ต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟูซี่ในสารละลาย O2 3 ชั่วโมง



ระยะเวลาการแช่ต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟูซี่ในสารละลาย O2 6 ชั่วโมง



ระยะเวลาการแช่ต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟูซี่ในสารละลาย O2 9 ชั่วโมง



10 50 100 1000

ระดับความเจือจาง (เท่า)

10 50 100 1000

ระดับความเจือจาง (เท่า)

10 50 100 1000

ระดับความเจือจาง (เท่า)

รูปที่ 4.18 ลักษณะการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอฟูซี่ในกลุ่มที่ได้รับสารละลาย O2 ความเจือจางต่าง (ระดับความเจือจาง 10 50 100 และ 1000 เท่า) ณ.ระยะเวลา 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วยนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก) 6 สัปดาห์ (ข) 10 สัปดาห์ (ค)

ผลการแช่กล้วยไม้ในสารละลาย O3 นาน 6 ชั่วโมง พบว่าเพียง 2 สัปดาห์ กล้วยไม้เริ่มมีอาการเน่าเปื่อยบริเวณโคนใบ และบางต้นตายไป ดังรูปที่ 4.19 (ก) ต่อมาในสัปดาห์ที่ 6 ที่ความเงือจาง 10 50 และ 1000 เท่า ใบเริ่มมีสีเหลืองมากขึ้น และมีอาการเน่าเปื่อย แต่ต้นที่แช่ความเงือจาง 100 เท่า มีการแตกใบอ่อนขึ้นมาใหม่ เช่นเดียวกับการเกิดรากใหม่ ซึ่งพบเพียงต้นที่แช่ในสารละลาย O3 ความเงือจาง 100 และ 1000 เท่าเท่านั้น วัดความยาวรากโดยรวมเฉลี่ยประมาณ 10 ถึง 20 มิลลิเมตร การเจริญของกล้วยไม้ที่ผ่านการแช่สารละลาย O3 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในสัปดาห์ที่ 10 ได้ผลดังรูปที่ 4.19 (ค) พบว่าต้นที่แช่สารละลาย O3 ความเงือจาง 10 และ 50 เท่า เริ่มเน่าเปื่อยและบางต้นเฉาตาย ต้นที่มีชีวิตอยู่ส่วนใหญ่ใบมีสีเหลือง ต้นที่แช่ O3 ความเงือจาง 100 เท่า ใบล่างเริ่มมีสีเหลือง ส่วนใบอ่อนที่เกิดใหม่มีขนาดใหญ่ขึ้นมีสีเขียวสด และที่ความเงือจาง 1000 เท่า ใบมีอาการเน่าเปื่อยเหลือแต่คอ แต่ในสัปดาห์ที่ 10 กลับเกิดใบอ่อนขึ้นมาใหม่ 2 ใบ พร้อมกัน การเกิดรากใหม่ของกล้วยไม้ที่แช่สารละลาย O3 นาน 6 ชั่วโมง พบในต้นที่แช่สารละลาย O3 ความเงือจาง 100 และ 1000 เท่า มีประมาณต้นละ 2 ถึง 4 ราก วัดความยาวโดยรวมเฉลี่ยประมาณ 50 ถึง 60 มิลลิเมตร

เมื่อแช่กล้วยไม้ในสารละลาย O3 เป็นเวลา 9 ชั่วโมง แล้วเพาะเลี้ยงเพียง 2 สัปดาห์แรกต้นที่แช่ความเงือจาง 10 50 และ 1000 เท่า มีอาการเน่าเปื่อย และตายในที่สุด ดังรูปที่ 4.19 (ก) ซึ่งมีเพียงต้นที่แช่ในความเงือจาง 100 เท่า ที่รอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ และใบยังคงมีสีเขียวสด ต่อมาสัปดาห์ที่ 6 กล้วยไม้ที่แช่ในสารละลาย O3 ความเงือจาง 10 และ 50 เท่า ตายเกือบหมด ดังรูปที่ 4.19 (ข) ในขณะที่ต้นที่แช่ความเงือจาง 100 และ 1000 เท่า เริ่มมีการแตกใบอ่อน และมีรากเกิดใหม่ในบางต้น วัดความยาวรากเกิดใหม่โดยรวมเฉลี่ยประมาณ 10 ถึง 20 มิลลิเมตร ในสัปดาห์ที่ 10 กล้วยไม้ที่ผ่านการแช่สารละลาย O3 เป็นเวลา 9 ชั่วโมง เหลือเพียงต้นที่แช่ในความเงือจาง 100 และ 1000 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 4.19 (ค) ซึ่งใบมีสีเหลืองและบางใบมีอาการเน่าเปื่อย และร่วงไป ส่วนใบที่เกิดใหม่มีขนาดใหญ่ขึ้นสีเขียวอมเหลือง แต่ยังมีรากเกิดใหม่เพิ่มขึ้นประมาณต้นละ 2 ถึง 4 ราก วัดความยาวโดยรวมเฉลี่ยประมาณ 20 ถึง 40 มิลลิเมตร

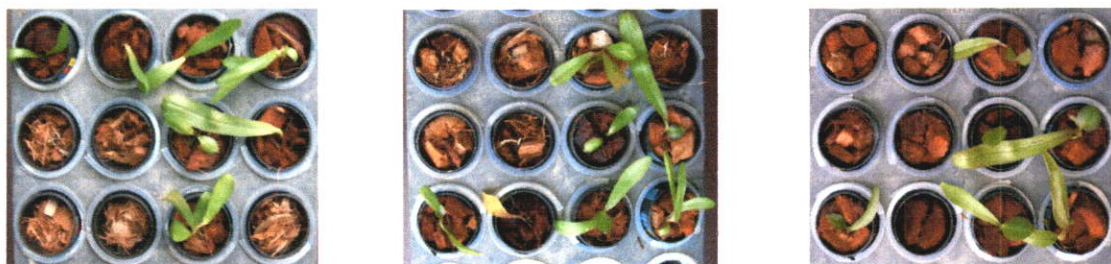
ระยะเวลาการแช่ต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิสในสารละลาย O3 3 ชั่วโมง



ระยะเวลาการแช่ต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิสในสารละลาย O3 6 ชั่วโมง



ระยะเวลาการแช่ต้นกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิสในสารละลาย O3 9 ชั่วโมง



10 50 100 1000

ระดับความเจือจาง (เท่า)

10 50 100 1000

ระดับความเจือจาง (เท่า)

10 50 100 1000

ระดับความเจือจาง (เท่า)

รูปที่ 4.19 ลักษณะการเจริญของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิสในกลุ่มที่ได้รับสารละลาย O3 ความเจือจางต่าง (ระดับความเจือจาง 10 50 100 และ 1000 เท่า) ณ.ระยะเวลา 3 6 และ 9 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก) 6 สัปดาห์ (ข) 10 สัปดาห์ (ค)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราบนอาหารวุ้น MYS พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 สามารถเจริญบนอาหารวุ้น MYS ได้ เส้นใยมีลักษณะฟู สีขาว เมื่ออายุประมาณ 7 วัน จะเริ่มเกิดรอยหยักคลี่ออกตามแนวรัศมีของโคโลนี และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.6 เซนติเมตร ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เส้นใยมีลักษณะบาง ยาวเรียว และแตกแขนงเป็นเส้นยาวจำนวนมาก มีการสร้างโคนิเดียรูปร่างกลม หรือไข่ โคนิเดียถูกสร้างต่อกันเป็นลูกโซ่ ตั้งแต่ 1 ถึง 12 โคนิเดีย ลักษณะของเชื้อรา *Mucor rouxii* บนอาหารวุ้น MYS ในวันแรกเส้นใยมีลักษณะฟู สีขาว เส้นใยหยาบเหนียว เห็นขอบโคโลนีชัดเจน เมื่ออายุมากขึ้น จะสร้างสปอร์สีน้ำตาล และเจริญเต็มจานเพาะเชื้อในวันที่ 4 โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ภายในเส้นใยไม่มีผนังกัน มีสปอร์แรงเจียมขนาดใหญ่รูปร่างกลมที่ปลายของสปอร์แรงจิโอฟอร์ แต่ที่ฐานของสปอร์แรงจิโอฟอร์ ไม่มีสโตลอนท์ หรือไรซอยด์ และสปอร์แรงจิโอฟอร์อาจมี หรือไม่มีการแตกกิ่งก้าน ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *R. oligosporus* บนอาหารวุ้น MYS ในวันแรกเส้นใยเป็นสีขาวฟู และชูขึ้นไปในอากาศ วันที่ 2 เริ่มมีการสร้างสปอร์สีดำ หรือสีน้ำตาลเข้ม ในวันที่ 4 เชื้อรา *R. oligosporus* เจริญเต็มจานเพาะเชื้อมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า พบว่าเส้นใยมีลักษณะคล้ายกับ *M. rouxii* แต่ต่างกับที่ *R. oligosporus* มีสโตลอนท์ หรือไรซอยด์ในตำแหน่งฐานของสปอร์แรงจิโอฟอร์ และสปอร์แรงจิโอฟอร์ไม่มีการแตกกิ่งก้าน

เมื่อศึกษาการเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว MYS บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 มีการเจริญในลักษณะของเพลเลทที่เป็นเส้นใยขนาดเล็กยาวสานกันไปมา มีปริมาณเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 4 ประมาณ 11.24 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 มีปริมาณแห้งเหลืออยู่เพียง 1.36 กรัมต่อลิตร เชื้อรา *M. rouxii* สามารถเจริญในอาหารเหลว MYS ได้ มีปริมาณเส้นใยสูงสุดประมาณ 8.08 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 เมื่อเลี้ยงครบ 7 วัน มีปริมาณแห้งที่เหลืออยู่เพียง 1.53 กรัมต่อลิตร และเชื้อรา *R. oligosporus* สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MYS โดยมีปริมาณเส้นใยสูงสุดในวันที่ 5 ประมาณ 8.15 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 มีปริมาณแห้งเหลืออยู่เพียง 0.77 กรัมต่อลิตร ดังนั้น แสดงว่าเชื้อราทั้งสามชนิดสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารได้ แต่เนื่องจาก *R. oligosporus* เจริญเป็นเพลเลทขนาดใหญ่จึงไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในการผลิตไคติน โอลิโกเมอร์

การวิเคราะห์โครงสร้างโคตินและโคโดซานในเส้นใยเชื้อรา ด้วยเครื่อง FT-IR พบว่าเส้นใยเชื้อราทั้งสามชนิดให้พีคของหมู่เอไมด์ I ในช่วง $1640-1660\text{ cm}^{-1}$ และพีคของหมู่ไฮดรอกซิลที่ช่วง $2920-2930\text{ cm}^{-1}$ แสดงว่าเส้นใยเชื้อราทั้งสามชนิดมีโคตินโคโดซานเป็นองค์ประกอบ จากนั้นนำไปผลิตโคตินโอลิโกเมอร์ ด้วยวิธีทางเคมี โดยการย่อยด้วยกรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เปลือกกุ้งเป็นวัตถุดิบ พบว่า การย่อยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุด เพราะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความหลากหลาย และมีปริมาณสูงในทุกช่วงเวลา การย่อยแกนหมึกที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุด โดยให้ชนิดของเพิ่มขึ้น และผลิตภัณฑ์บางชนิดมีปริมาณสูงกว่าย่อยที่ 40 และ 60 องศาเซลเซียส ส่วนการผลิตโคตินโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา พบว่า การย่อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เหมาะสำหรับย่อยเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 และ *M. rouxii* ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณสูง อย่างไรก็ตามวิธีทางเคมีไม่เหมาะสำหรับย่อยเส้นใยเชื้อรา เพราะปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้น้อยมากเมื่อเทียบกับการย่อยเปลือกกุ้ง และแกนหมึก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรง ทำให้โครงสร้างเส้นใยเชื้อราเสียหายไป

การผลิตโคตินโอลิโกเมอร์ ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยการย่อยด้วยเอนไซม์โคตินเนส ที่สภาวะการย่อยแบบให้อากาศความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า การย่อยเปลือกกุ้งเป็นเวลา 2 วัน ดีที่สุด ให้ผลิตภัณฑ์เป็น G1 และ G3 ในปริมาณสูง ในขณะที่การย่อยแกนหมึกใช้เวลา 12 วัน ดีที่สุด การย่อยเส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 พบว่า ทุกช่วงเวลาให้ผลิตภัณฑ์ในปริมาณสูง และมีหลายชนิดแตกต่างกันออกไป ดังนั้นการเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยจึงขึ้นอยู่กับความต้องการผลิตภัณฑ์ชนิดใด ส่วนการย่อยเส้นใยเชื้อรา *M. rouxii* ระยะเวลาการย่อยที่เหมาะสม ได้แก่ วันที่ 12 และ 14 ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น G1 และ G2 ที่มีปริมาณสูง เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์โคตินเนส พบว่า เปลือกกุ้ง และแกนหมึกให้ผลิตภัณฑ์ปริมาณน้อยกว่า เส้นใยเชื้อราทั้งสองชนิด แสดงว่าการย่อยเส้นใยเชื้อรา ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยใช้เอนไซม์โคตินเนส เหมาะสำหรับใช้ย่อยเส้นใยเชื้อรามากกว่าวิธีทางเคมี ซึ่งใช้กรดฟอสฟอริกเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์

ผลการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโคตินโอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา ต่อการเจริญในกล้วยไม้สกุลฟาแลนดอปซิส พบว่า ดันที่เชื้อสารละลาย O1 ความเจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ส่วนกลุ่มที่เชื้อสารละลาย O2 ดันที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ได้แก่ ดันที่เชื้อความเจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง และในกลุ่มที่เชื้อสารละลาย O3 ดันที่เจริญดีที่สุด ได้แก่ ดันที่เชื้อความเจือจาง 100 เท่า นาน 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติการเจริญของกล้วยไม้ที่มีการรอดชีวิต และการงอกรากใหม่ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าดันที่เชื้อสารละลาย O2 ความเจือจาง 1000 เท่า นาน 3 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตดีที่สุด โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะการเลี้ยงเชื้อรา *R. oligosporus* เพื่อให้เพลเลทมีลักษณะเป็นเส้นใย สำหรับนำไปใช้ผลิตไคติน โอลิโกเมอร์
2. ควรศึกษาผลของไคติน โอลิโกเมอร์ที่ได้จากเส้นใยเชื้อรา ต่อการเจริญเติบโต และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันตนเองในพืช
3. ควรศึกษาการเพิ่มขนาดการผลิตเส้นใยเชื้อรา และการผลิตไคติน โอลิโกเมอร์จากเส้นใยเชื้อรา เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

บรรณานุกรม

- เกศนรี จงโชติศิริกุล. 2544. “การศึกษาผลของไคโตซานต่อเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรกโนส และการชักนำการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในองุ่น.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชวลิต ดาบแก้ว. 2542. การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สำหรับผู้สำหรับผู้แรกเริ่ม. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- ธีระพันธ์ เจริญสาคร. 2548. “การผลิตไคตินโอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียในระยะ Active Cells และ Resting Cells.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นันทนา นิมเจริญนิคม. 2542. “การผลิตและการทำไคตินดีอะเซทิลเลสจาก *Rhizopus oligosporus*. NS1 ให้บริสุทธิ์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิตา บุตรดา. 2537. “การศึกษาเปรียบเทียบสมบัติบางประการของเชื้อราสายพันธุ์สีแดง สีเหลือง และไม่สร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส คบ.11304.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ. 2541. พันธุศาสตร์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิมพ์ทิพย์ โภชนะวิทย์. 2542. “การผลิตและคุณสมบัติของไคโตซานจากจุลินทรีย์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิไลวรรณ พงษ์พูล. 2525. ราวิทยาเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- มลิวัดย์ พรหมรักษา. 2539. กล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : ยูนิเวอร์แซลกราฟฟิค.
- มังกร โลหะอุดม. 2545. “การเลี้ยงกล้วยไม้เป็นงานอดิเรก.” หน้า 16-18 ใน วารสารความสุขฉบับกล้วยไม้. กรุงเทพฯ : สมาคมกล้วยไม้ไทย.
- มิสเตอร์ เอ็ม. 2514. “ว่ากันถึงฟาแลนนอพีซิส.” หน้า 29-32. ใน วารสารกล้วยไม้ฉบับปฐมฤกษ์. ชลบุรี : สมาคมกล้วยไม้ชลบุรี.
- รัฐ พิชญากูร. 2544. “การตัดไคตินและไคโตซานโดยเอนไซม์.” หน้า 41–51. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซาน จากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ระพี สาคริก. 2530. กล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ชองนนทรี.
- ระพี สาคริก. 2546. การปลูกกล้วยไม้เป็นการค้าและการพัฒนาบนพื้นฐานความมั่นคง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ระพี สาคริก. 2548. **กล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : บริษัทวชิระจำกัด.
- รัตนา รุจิรวนิช. 2544. “สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคติน-ไคโตซาน.” หน้า 1-10. ใน **การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซาน จากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รวราวุฒิ ครุสง. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม**. กรุงเทพฯ : โอ เอส พรินต์ติ้งเฮาส์.
- สมชาย ไกรรักษ์ และธีระพันธ์ เจริญสาคร. 2549. “การผลิตเอ็น-อะซิทธิลกลูโคซามีน และไคติน โอลิโกเมอร์โดยแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไคติน”. ใน **การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 44**. 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2549. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, บางเขน. 380-390.
- สมศักดิ์ รักไพบุลย์สมบัติ. 2540. **ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้จากประสบการณ์จริง**. กรุงเทพฯ : สุริวงศ บุกเซนเตอร์.
- สุวบุญ จิระชาญชัย และคณะ. 2544. “สมบัติทางเคมีและกายภาพของไคติน-ไคโตซาน.” หน้า 11-40. ใน **การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุวดี จันทร์กระจ่าง. 2544. “การประยุกต์ใช้ไคติน/ไคโตซาน.” หน้า 52-58. ใน **การประชุมเชิงปฏิบัติการไคตินและไคโตซานจากวัตถุดิบธรรมชาติสู่การประยุกต์ใช้**. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อมรา คัมภีรานนท์. 2546. **พันธุศาสตร์ของเซลล์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อังคณา โทการกุล. 2540. “การแยกเชื้อยีสต์ที่มีเอนไซม์ไคตินดีอะเซทิลเลส.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อัยฎาวุช แสงภาพัญญ. 2542. “การสกัดไคโตซานจากเซลล์จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม (กรดซिटริก).” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, 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.
- Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. 1979. **Intro. Mycol**. New York : John Wiley and Son, Inc.
- 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.

- Assis, O.B.G. and Pessoa, J.D.C. 2004. "Preparation of thin films of chitosan for use edible coatings to inhibit fungal growth on sliced fruits." **Brazilian Journal of Food Technology**. 7(1) : 17-22.
- Bartnicki-Garcia, S. 1969. "Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi." **Annual Reviews Microbiol.** 22 : 87-108.
- Bartnicki-Garcia, S., Bracker, C.E., Gierz, G., Franco, R.L. and Lu, H. 2000. "Mapping the growth of fungal hyphae: orthogonal cell wall expansion during tip growth and the role of turgor." **Biophysical Journal**. 79(1) : 2382-2390.
- Ben-Shalom, N., Ardi, R., Pinto, R., Aki, C., and Fallik, E. 2003. "Controlling gray mould by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan." **Crop Protection**. 22(1) : 285-290.
- Calvo, C and Ruiz, B. 1987. **Chitin and chitosan special biopolymers for food, medicine, and industry**. New York : Technical Insights Inc.
- Carels, M. and Shepherd, D. 1975. "Sexual reproduction cycle of *Monascus* sp. in submerged shaken culture." **Journal of Bacteriology**. 122(1) : 288-294.
- Chang, K.B., Lee, J. and Fu, W.R. 2000. "HPLC analysis fo *N*-acetyl-chito-oligosaccharides during the acid hydrolysis of chitin." **Journal of 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.
- Fritzemeier, K.M. and Kindl, H. 1981. "Coordinate induction by ultraviolet light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate-4-hydroxylase in leaves of Vitaceae." **Plant**. 151(1) : 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.
- Hartwell, F.G. and Phaff, H.J. 1974. Glucanase in *Schizosaccharomyces* : Isolation and properties of the cell wall-associated beta-1,3-glucanases. **Journal of Biology and Chemistry**. 149(1) : 1717-1728.

- Hiraga, K., Shou, L., Kitazawa, M., Takahashi, S., Shimada, M., Sato, R. and Oda, K. 1997. "Isolation and characterization of chitinase from a flake-chitin degrading marine bacterium, *Aeromonas hydrophila* H-2330." **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 61(1) : 174-176.
- 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.
- Jia, Z. and Shen, D. 2002. "Effect of reaction temperature and reaction time on the preparation of low-molecular-weight chitosan using phosphoric acid." **Carbohydrate Polymers**. 49(1) : 393-396.
- Kamst, E., Jaarsveld, K.Z., Marel, G.A., Boom, J.H., Lugtenberg, B.J.J. and Spaink, 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.
- Krairak, S., Aiba, S., Sashiwa, H., Yamano, N., Ishikawa, K., Shimomura, A., Kawabata, G., Hiraga, K. and Oda, K. 2003. "Production of N-acetyl-D-glucosamine from citin using crude enzymes derived from *Trichoderma viride* and *Aeromonas hydrophila* H-2330." **International chitin-chitosan Conference**. 1(1) : 126-130.
- 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.
- Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K. and Lorito, M. 2001. "*Trichoderma* : from genes to biocontrol ." **Journal of Plant Pathology**. 83(2) : 11-23.
- Lin, T.S. and Kolattukudy. 1980. "Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from phytopathogenic fungi." **Physiology and Plant Pathology**. 17(1) : 1-15.

- Lin, W., Hu, X., Zhang, W., Rogers, W.J. and Cai, W. 2005. "Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice." **Journal of Plant Pathology**. 162(1) : 937-944.
- Lubbehusen, L., Nielsen, J. and McIntyre, M. 2003. "Morphology and physiology of the dimorphic fungus *Mucor circinelloides* (syn. *M. racemosus*) during anaerobic growth." **The British Mycological Society**. 107(2) : 223-230.
- 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.
- Mignard, S. and Flandrois, J.P., 2006. "16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment." **Journal of Microbiological Methods**. 67(1) : 574-581.
- Muzzarelli, C. and Muzzarelli, A.A. 2003. "Chitin related food science today and two centuries ago." **AGROFood industry hi-tech**. 1(1) : 39-42.
- Nawani, N.N. and Kapadnis, B.P. 2005. "Optimization of chitinase production using statistics based experimental design." **Process Biochemistry**. 40(1) : 651-660.
- Neil, A.R. and Geoffrey M. 1994. **The Growing Fungus**. London : Chapman and Hall.
- Nge, K.L., Nwe, N., Chandkrachang, S. and Stevens, W.F. 2006. "Chitosan as a growth stimulator in orchid tissue culture." **Plant Science**. 170(6) : 1185-1190.
- No, H.K., Park, N.Y., Lee, S.H., Hwang, H.J. and Meyers, S.P. 2002. "Antibacterial activities of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights on spoilage bacteria isolated from tofu." **Journal of Food Science**. 67(4) : 1511-1514.
- Rakwal, R., Tamogami, S., Agrawal, G.K. and Iwahashi, H. 2002. "Octadecanoid signaling component "burst" in rice (*Oryza sativa L.*) seedling leaves upon wounding by cut and treatment with fungal elicitor chitosan." **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 295(1) : 1041-1045.

- 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., Fujishima, S., Yamano, N., Kawasaki, N., Nakayama, A., Muraki, E., Hiraga, K., Oda, K. and Aiba, S.I. 2002. "Production of *N*-acetyl-D-glucosamine from α -Chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330." **Carbohydrate Research**. 337(1) :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*-acetyl chitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes." **Carbohydrate Polymers**. 51(1) : 391-395.
- Savard, T., Beaulieu, C., Boucher, I. and Champagne, C.P. 2002. "Antimicrobial action of hydrolyzed chitosan against spoilage yeast and lactic acid bacteria of fermentables." **Journal of Food Protection**. 65(5) : 828-833.
- Sharathchandra, R.G., Raj, S.N., Shetty, N.P., Amruthesh, K.N. and Shetty, H.S. 2004. "A chitosan formulation *elixa*TM induces domny mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet." **Crop Protection**. 23(1) : 881-888.
- Shimono, K., Shigeru, K., Tsuchiya, A., Itou, N., Ohta, Y., Tanaka, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. and Kawamukai, M. 2002. "Two glutamic acid in chitosanase A from *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001 are the catalytically important residues." **Journal of Biochemistry**. 131(1) : 87-96.
- Tham, L.X., Nakasawa, N., Matsushashi, S., Ishioka, N.S., Ito, T. and Kume, T. 2001. "Effect to radiation-degraded chitosan on plant stressed with vanadium." **Radiation physics and chemistry**. 61(1) : 171-175.
- Tokuyasu, K., Ono, H., Mitsutomi, M., Hayashi, K. and Mori, Y. 2000. "Synthesis of a chitosan tetramer derivative, β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcNAc through a partial *N*- acetylation reaction by chitin deacetylase." **Carbohydrate Research**. 325(1) : 211-215.
- Wang, S.L., Shih, I.L., Wang, C.H., Tseng, K.C., Chang, W.T., Twu, Y.K., Ro, J.J. and Wang, C.L. 2002. "Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*." **Enzyme and Microbial Technology**. 31(1) : 321-328.

Win, N.N. and Stevens, W.F. 2001. "Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase."
Applied Microbiology Biotechnology. 57(1) : 334-341.

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

1.2 อาหารวุ้น MYS (malt yeast extract starch agar)

ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch)	20.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
มอลต์สกัด (Malt extract)	3.0	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	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

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 ซึ่งเอนไซม์ที่ได้เป็นชนิดที่เชื่อผลผลิตแล้วจับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme)

2 สารเคมีการวิเคราะห์ปริมาณแป้ง

สารละลายแป้งมันสำปะหลัง (starch) มาตรฐาน

เตรียมโดยชั่งแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้งด้วยอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง 1.0 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตรเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนๆ คนให้แป้งมันละลายเป็นของเหลวใสๆ เก็บเป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กรดซัลฟูริกเข้มข้น

สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายฟีนอล 5.0 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3 สารเคมีในการวิเคราะห์โครงสร้างไคตินและไคโตซานในเส้นใยข้าวรา

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์อิ่มตัวในเมทานอล

นำเมทานอลปริมาตร 500 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมแคลเซียมคลอไรด์ คนตลอดเวลาจนแคลเซียมคลอไรด์ไม่สามารถละลายในเมทานอลได้

4 สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วย HPLC

อะซิโตนไตรล 70 เปอร์เซ็นต์

อะซิโตนไตรล	700.0	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากไอออน (Deionized water)	300.0	มิลลิลิตร

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

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1 เทคนิคการทำ slide culture

การเตรียมเส้นใยเชื้อราสำหรับทำ slide culture

1. เทอาหารวุ้น MYS ลงในจานเพาะเชื้อให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้เย็น และผิวน้ำอาหารแห้ง
2. ใช้มีด หรือมีดผ่าตัดจุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟเพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงกรีดอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างด้านละประมาณ 6 มิลลิเมตร
3. ใช้ปากกิบ คีบสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วเผาไฟ 2 ครั้ง ก่อนวางลงบนแท่งแก้ว ซึ่งถือเป็นข้อศอกในจานเพาะเชื้อ
4. ใช้มีดยกชิ้นวุ้น ที่ตัดเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส มาวางตรงกลางสไลด์ในจานเพาะเชื้อ ที่เตรียมไว้ในข้อ 3
5. ใช้เข็มเขี่ย เขี่ยรามาตะตะที่ส่วนหนาทั้งสี่ด้านของชิ้นวุ้น
6. นำกระจกปิดสไลด์จุ่มแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และเผาไฟแล้ว ค่อยๆ วางปิดชิ้นวุ้น ซึ่งปลุกเชื้อแล้ว
7. เทน้ำกลั่นซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ชุ่ม
8. บ่มเชื้อไว้ในตู้อุณหภูมิห้อง โดยบ่มเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 เป็นเวลา 7 วัน ส่วนเชื้อรา *Mucor rouxii* และ *Rhizopus oligosporus* เป็นเวลา 2 วัน

การตรวจผล

- หลังจากบ่มเชื้อจนเชื้อราเจริญดีแล้ว นำมาเตรียมทำสไลด์ถาวร หรือกึ่งถาวร โดย
1. ยกกระจกปิดสไลด์ขึ้น หยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงไปที่ตรงกลางของกระจกปิดสไลด์ด้านในซึ่งมีเส้นใยเชื้อราเจริญอยู่ เพื่อให้แอลกอฮอล์กระจายเข้าสู่เส้นใยเชื้อรา
 2. ก่อนที่แอลกอฮอล์จะแห้ง ให้นำกระจกปิดสไลด์วางลงบนน้ำยาแลคโตฟีนอล (lactophenol) ซึ่งหยดอยู่ตรงกลางสไลด์แผ่นใหม่
 3. เขี่ยชิ้นวุ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสออกไป และหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์ แล้วหยดน้ำยาแลคโตฟีนอลลงไปที่ตรงกลางแผ่นสไลด์ก่อนแอลกอฮอล์แห้งสนิท ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์แผ่นใหม่
 4. นำสไลด์ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ทั้งสองแผ่น ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะโครงสร้างของเชื้อรา

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 อบกระถางฟอยด์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง แล้วนำไปทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desicator) ประมาณ 30 นาที จึงนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2.2 ปิเปิดตัวอย่างอาหารที่มีเชื้อราเจริญ 10 มิลลิลิตร กรองด้วยผ้าลินินและล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นต้มเดือด 3 ครั้ง

2.3 นำเซลล์ที่ล้างแล้วเทใส่กระถางฟอยด์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

2.4 นำออกมาใส่ในโถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำให้ได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักของจากอวลูมิเนียมมาหักออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของเซลล์ใน 10 มิลลิลิตร

4 การวิเคราะห์ปริมาณไคตินโอลิโกเมอร์ด้วย HPLC

การเตรียมตัวอย่าง

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

การเตรียมกราฟมาตรฐานของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน และโคตินโอลิโกเมอร์ ด้วยวิธี

HPLC

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น (stock solution)

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

เตรียมสารละลายโคโคโบไอโอสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง โคโคโบไอโอส 42.46 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโคไตรโอสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง โคโคไตรโอส 62.76 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโคเตตระโอสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง โคโคเตตระโอส 8.31 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโคเพนโตสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง โคโคเพนโตส 10.34 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

เตรียมสารละลายโคโคเฮกซะโอสความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยชั่ง โคโคเฮกซะโอส 12.37 มิลลิกรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน และปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร

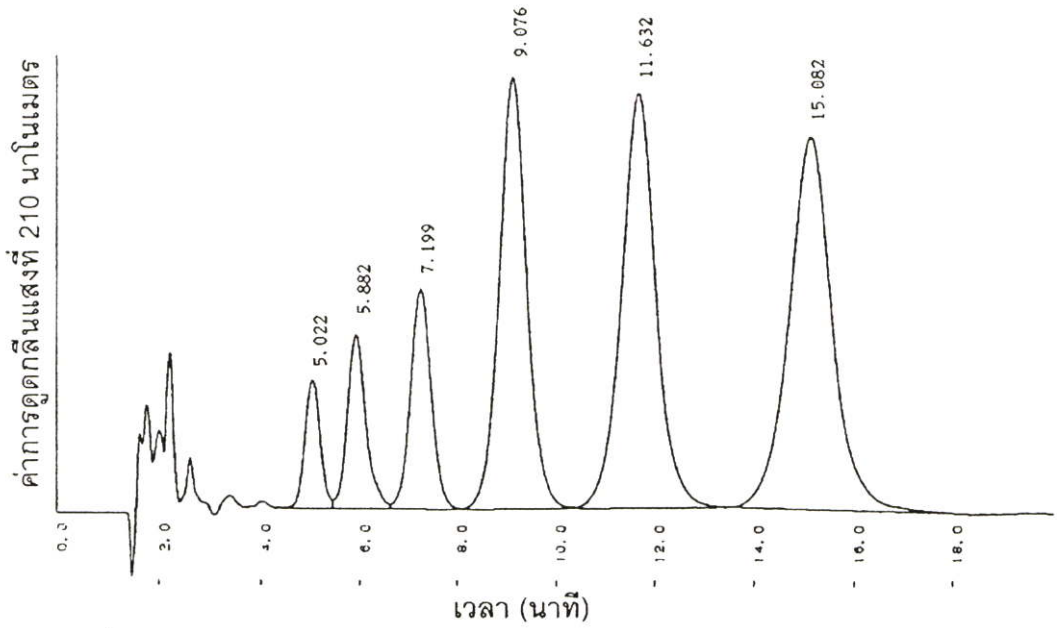
2. เจือจางสารละลายมาตรฐานเข้มข้นจากข้อ 1 แต่ละชนิดด้วยน้ำปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิโมลาร์

3. ผสมสารละลายมาตรฐานที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 3 ส่วน กับอะซิโตไนไตรล์ 7 ส่วน

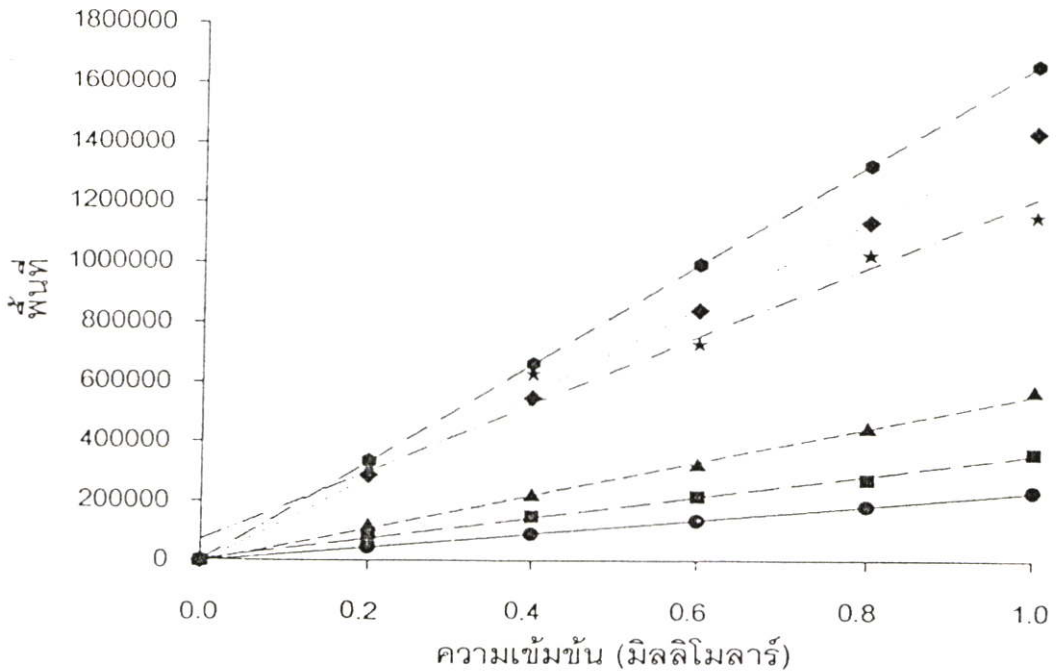
4. กรองผ่านเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

5. วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง

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



รูปที่ ข.1 เวลาที่เทนชัน (retention time) ของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน (5.022 นาที) ไคโตไบโอส (5.882 นาที) ไคโตไดรโอส (7.199 นาที) ไคโตเตตระโอส (9.076 นาที) ไคโตเพนโตส (11.632 นาที) ไคโตเฮกโซส (15.082 นาที)
 ที่มา : ชีระพันธ์ เจริญสาคร (2548)



เอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน สมการเส้นตรง $(Y) = 229477 (X) - 1373$
 $R^2 = 0.9997$

ไคโตไบโอส สมการเส้นตรง $(Y) = 346742 (X) + 5892$
 $R^2 = 0.9969$

ไคโตไครโอส สมการเส้นตรง $(Y) = 556925 (X) - 3067$
 $R^2 = 0.9983$

ไคโตเตตระโอส สมการเส้นตรง $(Y) = 1427125 (X) - 7232$
 $R^2 = 0.9996$

ไคโตเพนโตส สมการเส้นตรง $(Y) = 1653704 (X) + 1401$
 $R^2 = 1.0000$

ไคโตเฮกโซส สมการเส้นตรง $(Y) = 1139208 (X) - 72114$
 $R^2 = 0.9769$

รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของเอ็นอะเซทิลกลูโคซามีน และไคตินโอลิโกเมอร์ ระหว่างความเข้มข้น กับพื้นที่ ซึ่งได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

ที่มา : ธีระพันธ์ เจริญสาคร (2548)

5 วิเคราะห์โครงสร้างโคตินและโคโตนานด้วยเครื่อง FT-IR

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

วิธีทำ KBr-pellet ใช้สารตัวอย่างประมาณ 2.0 มิลลิกรัม ผสมกับ KBr 100-200 มิลลิกรัม ในโกร่งอะเกต แล้วบดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน การทำ KBr-pellet ควรใช้สารตัวอย่างมีความเข้มข้นประมาณ 0.1-2.0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณได้ ขึ้นอยู่กับสารตัวอย่างนั้น คุณกลืนแสงอินฟราเรดได้ดีเพียงใด เมื่อบดดีแล้วนำไปใส่เครื่องอัดซึ่งเรียกว่า die หลังจากเปิดปั๊มดูดอากาศออกประมาณ 1 นาที จึงเริ่มอัดด้วยเครื่องอัดขนาด 15 ตัน ใช้แรงดันประมาณ 10 ตันสำหรับแผ่นตัวอย่างขนาด 13 มิลลิเมตร ไม่ควรใช้ความดันสูงเกินไปเพราะอาจทำให้แผ่นตัวอย่างเสียหาย ควรอัดประมาณ 3-4 นาที หลังจากลดความดันและปลดปั๊มออกแล้ว นำตัวอย่างที่เป็นแผ่นใสบางออกมาอย่างระมัดระวัง เพราะอาจแตก หรือหักได้ จากนั้นใส่ลงใน disc holder เพื่อนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ ค.2 ปริมาณโคติน โอลิโกเมอร์จากการย่อยเปลือกกุ้ง แขนหมึก เส้นใยเชื้อรา *Monascus* sp.KB20M1 และ *Mucor rouxii* ด้วยเอนไซม์โคติเนส

ลำดับเลข/ผลึกภัณฑ์	ระยะเวลาการย่อย (วัน)						
	2	4	6	8	10	12	14
เปลือกกุ้ง							
G1	0.329	0.118	0.105	0.112	0.187	0.117	0.104
G2	-	0.034	0.028	-	-	-	-
G3	0.489	-	-	-	-	-	-
G4	-	0.013	0.014	0.027	0.021	0.012	0.012
G5	-	-	-	-	-	-	-
G6	-	-	-	-	-	-	-
แกนหมึก							
G1	0.205	0.410	0.254	0.211	0.181	0.221	0.152
G2	1.716	1.938	2.237	2.245	1.822	2.344	1.745
G3	-	-	-	-	-	-	-
G4	1.150	1.583	1.915	2.049	1.575	2.232	1.367
G5	0.014	0.087	0.033	0.013	0.188	0.217	0.074
G6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Monascus</i> sp.KB20M1							
G1	1.927	7.038	7.085	12.378	9.254	8.033	10.229
G2	0.648	0.773	1.085	0.538	1.017	1.178	1.444
G3	8.663	10.448	10.022	8.154	7.385	6.466	5.666
G4	0.162	0.436	0.316	0.159	0.101	0.110	0.130
G5	-	-	0.040	-	-	0.228	0.301
G6	-	-	-	0.097	-	0.087	0.097
<i>M. rouxii</i>							
G1	8.198	8.653	5.522	6.573	6.439	13.147	13.297
G2	1.626	1.622	1.257	1.157	1.102	4.446	4.824
G3	-	-	-	-	-	-	-
G4	-	-	-	-	-	-	-
G5	0.042	0.012	0.025	0.004	0.092	-	-
G6	-	-	-	-	-	-	-

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเดือนเพ็ญ อางไธสง เกิดวันที่ 18 พฤศจิกายน 2522 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจาก โรงเรียนราชสีมาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2540 เข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์บางพระ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2544 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2546 ถึงปีการศึกษา 2549