ภาคผนวก ก

การสกัดไคโตซานจากเห็ดหอม (อาทิตย์. 2550)

1. การสกัดไคโตซนจากเห็ดหอม

1.1 การเตรียมผงเห็ดหอม

นำเห็ดหอมมาอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเห็ดหอมไปบดด้วยเครื่องบด sample mill ให้ละเอียดพอสมควร (ขนาดประมาณ 1 มิลลิเมตร)

1.2 การกำจัดแร่ธาตุ

ชั่งผงเห็ดหอม 30 กรัม เพื่อนำมากำจัดแร่ธาตุ โดยเติมลงในกรดไฮโดรคลอริก 5เปอร์เซ็นต์ 450 มิลลิลิตร (1 : 15 w/v) คนให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ นำมากรองเอาตะกอนออก ล้างตะกอนด้วยน้ำจนน้ำล้างเป็นกลาง

1.3 การกำจัดโปรตีน

นำตะกอนที่ได้มาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ 300 มิลลิลิตร (1 : 10 w/v) ให้ความร้อนที่ 85 – 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วมากรองเอาตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำจนน้ำล้างเป็นกลาง

1.4 การฟอกสี

นำตะกอนที่ได้มาฟอกสีโดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 8.8 เปอร์เซ็นต์ และกรดไฮโดรคลอริก 0.925 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง แล้วนำมากรองเอาตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำจนน้ำล้างเป็นกลาง

1.5 การผลิตไคโตซาน

นำตะกอนที่ได้มาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40เปอร์เซ็นต์ (1 : 50 w/v) รีฟลักซ์ที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ปล่อยให้เย็นตัวลง กรองเอาตะกอน ล้างตะกอนด้วยน้ำจนน้ำล้างเป็นกลาง จากนั้นนำตะกอนไปอบแห้ง จะได้ไคโตซานลักษณะเป็นแผ่นสีเหลือง

2. การตรวจสอบไคโตซาน

นำไคโตซานที่ได้ไปวัด IR สเปกตรัม (KBr disc) เปรียบเทียบกับไคโตซานมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัท
1. เมธานอล	Merck
2. เอธานอล 70%, เอธานอล 95%	Merck
3. ไดคลอโรมีเธน	Fisher Scientific
4. เอธิลอะซีเตต	VWR International
5. เฮกเซน	Labscan Asia
6. โซเดียมซัลซัลเฟต	Ajak Finechem
7. glucose – D	Boot Manufacturing
8. acetic acid	Merck

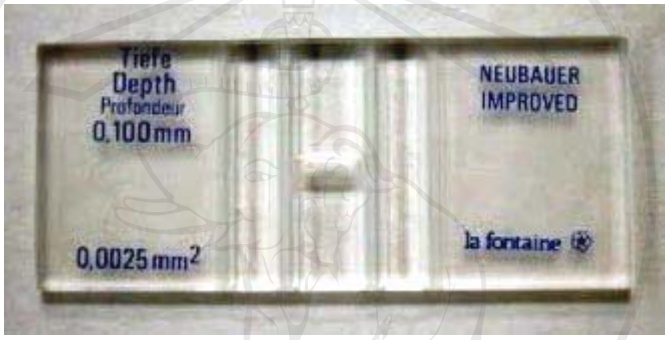
วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์	บริษัท
1. เครื่องปั่นไฟฟ้า	National
2. เครื่องระเหยสาร (rotary evaporator)	Buchi
3. TLC (Silica Gel F 254 TLC Aluminium Sheet)	Merck
4. tank แก้ว ขนาด 20 x 5 x 20 cm.	-
5. Digital Balance	Mettler – Toledo รุ่น AB 204 – S
6. กรวยแยกสาร	-
7. micro hematocrit tube	Biomed
8. Haemacytometer	-
9. ไคโตซาน	Nippon Kayaku

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วยเครื่องมือ Haemacytometer

ก่อนการเตรียม Inoculum ของเชื้อ ควรทราบวิธีการใช้เครื่องมือวัดความเข้มข้น ที่เรียกว่า Haemacytometer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ขนาดเล็กมีรูปร่างดังในภาพลักษณะของ Haemacytometer คล้ายสไลด์ ที่มีความหนามากกว่าสไลด์แก้วธรรมดา ตรงกลางมีร่องเป็นรูปตัว H ซึ่งทำให้เกิดบริเวณที่ใช้ในการตรวจนับขึ้น 2 บริเวณ ตรงกลางตัว H ซึ่งทำเป็น scale ที่ใช้ในการตรวจนับเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารแขวนลอย เช่น สปอร์ หรือเซลล์ต่าง ๆ

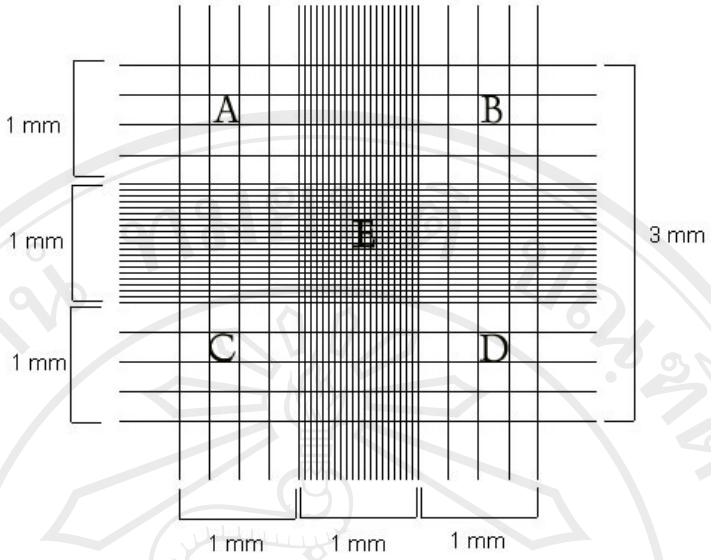


ภาพภาคผนวก 1 ลักษณะและขนาด (เท่าจริง) ของ Haemacytometer

วิธีใช้

ปิด cover slip ให้คลุม scale ทั้งสอง จากนั้นใช้ loop จุ่มลงใน spore suspension ที่เขย่าจนเข้ากันได้ดีแล้วแล้วย้าย loop ไปแตะตรงบริเวณขอบ slide ทั้งสองด้าน spore suspension จะซึมเข้าไปจนเต็มบริเวณ scale ทั้งสองด้าน อย่าใช้ dropper ในการย้าย spore suspension มาใส่ Haemacytometer เพราะจะได้ spore suspension มากเกินไปและจะไหลล้นช่องข้าง scale ซึ่งจะพาเอาสปอร์ไปด้วยทำให้สปอร์ที่นับได้ไม่ตรงกับความเป็นจริง เมื่อใส่ spore suspension แล้วทิ้งไว้ประมาณ 1 – 2 นาที เพื่อให้สปอร์นอนก้นก่อนจึงนับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพภาคผนวก 2 แสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C D และ E (Counting areas) ตัวอย่างที่ต้องการคำนวณหาความเข้มข้น

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemacytometer

1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (small squares) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (smallest squares) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จำนับจำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย

2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ 25 x 16 x 1/400 ตารางมิลลิเมตร

3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ 25 x 16 x 1/400 x 1/10 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

4. สมมุตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

5. ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรหรือ 1 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 มิลลิลิตร เท่ากับ 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ดังนั้น ถ้าในปริมาตร 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นับสปอร์ได้ = Y สปอร์

ถ้าใน 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (1 มล .) จะมีสปอร์ = Y x 1000 x 1/0.1 สปอร์

= $Y \times 1 \times 10^4$ สปอร์ / มล

.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. ในกรณีสปอร์ หรือ เซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมุตินับจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มิลลิลตร = $Z/5 \times 1 \times 10^4$ สปอร์/มิลลิลิตร

7. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ Suspension กระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับมากครั้งขึ้น เช่น 5-10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรือบางครั้งอาจจำเป็นต้องเติม Wetting agent เช่น Tween 20 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์ หรือ เซลล์กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นถูกต้องแม่นยำมากขึ้น) จากนั้นจึงใช้ Dropper หรือ Loop หยด Suspension ของเชื้อลงบน Scale ของ Haemacytometer ข้างละ 1 หยด จากนั้นใช้ Cover slip ปิดทับ กดเบา ๆ หากใส่หยดของ Spore suspension พอดีจะไม่มีเชื้อเหลือล้นออกมาจากสไลด์

8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์ หรือเซลล์ของเชื้อ แล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีคำนวณข้างต้น ซึ่งความเข้มข้นที่มักใช้ในการปลูกเชื้อโดยทั่วไป เช่น เชื้อราจะอยู่ในช่วง 10^5-10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การคำนวณหาปริมาณของสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสด

นำสาร (I) 0.0010 กรัม ละลายในไดคลอโรมีเธน 1 ml นำสารละลายที่ได้ทั้งหมด spot ลงบน แผ่น TLC จากนั้นนำมา spray เชื้อราแล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition area ได้เท่ากับ **A** mm นำมาเทียบกับสมการของ calibration curve จะทราบว่ามีสาร (I) เท่ากับ **B** µg

สาร (I)	**C**	g	มาจากเปลือกสด	100	g
สาร (I)	0.0010	g	มาจากเปลือกสด	(100 x 0.0010) /C	g
สาร (I)	**B**	g	มาจากเปลือกสด	(100 x 0.0010) /C	g

ดังนั้น ถ้าน้ำหนักเปลือกสด 1 g จะมีสาร (I) **BC**/0.1 µg

หมายเหตุ

A = ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition area

B = ปริมาณสาร (I) µg เทียบจากสมการของ calibration curve

C = ปริมาณสาร (I) g

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณของสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสดมะม่วงพันธ์โชคอนันต์อายุ 90 วัน ที่ผ่านการเคลือบผิวด้วย chitosan 0.5เปอร์เซ็นต์

นำสาร (I) 0.0010 g ละลายในไดคลอโรมีเธน 1 ml นำสารละลายที่ได้มา spot ลงบนแผ่น TLC จากนั้นนำแผ่น TLC มา spray เชื้อรา แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition area ได้เท่ากับ 14.5 mm นำมาเทียบกับสมการของ calibration curve จะทราบว่ามีสาร (I) เท่ากับ 1048.97 µg

สาร (I)	0.1210	g	มาจากเปลือกสด	100	g
สาร (I)	0.0010	g	มาจากเปลือกสด	(100 x 0.0010) / 0.1210	g
สาร (I)	1048.97	µg	มาจากเปลือกสด	(100 x 0.0010) / 0.1210	g

ดังนั้น ถ้าน้ำหนักเปลือกสด 1 g จะมีสาร (I) = (1048.97 x 0.1210) / 0.1 µg

= 1269.25 µg

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 1 เปอร์เซ็นต์ของสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสด 100 กรัม ที่ได้จากการทำ PTLC ของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์อายุ 90, 100,110 และ 120 วัน

กรรมวิธี	นน.สารสกัดหยาบ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ของสาร (I) ที่ได้ (กรัม)
ไคโตซาน 0.50%	0.2478	0.1210
	0.2469	0.1197
	0.2462	0.1190
	0.2464	0.1193
ไคโตซาน 0.75%	0.2479	0.1214
	0.2482	0.1209
	0.2464	0.1199
	0.2470	0.1195
ไคโตซาน 1.00%	0.2485	0.1217
	0.2480	0.1210
	0.2469	0.1208
	0.2476	0.1209
ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10%	0.2500	0.1229
+ ไคโตซาน 0.50%	0.2493	0.1220
	0.2502	0.1218
	0.2489	0.1220
ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10%	0.2491	0.1228
+ ไคโตซาน 0.75%	0.2502	0.1230
	0.2497	0.1225
	0.2488	0.1220
ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10%	0.2514	0.1235
+ ไคโตซาน 1.00%	0.2501	0.1230
	0.2497	0.1227
	0.2500	0.1229

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 1 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์ของสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสด 100 กรัม ที่ได้จากการทำ PTLC ของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์อายุ 90, 100, 110 และ 120 วัน

กรรมวิธี	นน.สารสกัดหยาบ (กรัม)	เปอร์เซ็นต์ของสาร (I) ที่ได้ (กรัม)
ชุดควบคุม	0.2462	0.1210
	0.2454	0.1187
	0.2456	0.1181
	0.2450	0.1160

หมายเหตุ ช่วงอายุของมะม่วงที่ใช้ในการทดลอง จะเริ่มนับตั้งแต่วันที่ดอกบาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 2 ความสามารถของสาร (I) โดยใช้ปริมาณสาร (I) 0.0010 กรัม ในการยับยั้งการ เจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

กรรมวิธี	ช่วงอายุ (เดือน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition area (mm)	ปริมาณสาร (I)
ไคโตซาน 0.50%	90	14.5	1048.97
	100	13.0	933.58
	110	11.5	818.20
	120	9.0	625.89
ไคโตซาน 0.75%	90	15.5	1125.89
	100	14.0	1010.51
	110	12.5	895.12
	120	10.0	702.81
ไคโตซาน 1.00%	90	16.0	1164.35
	100	15.0	1087.43
	110	13.5	972.05
	120	12.0	856.66
ไคโตซานจากเห็ดหอม	90	17.5	1279.74
0.10% + ไคโตซาน 0.50%	100	16.0	1164..35
	110	1535	1087.43
	120	14.5	1048.97
ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10%	90	19.0	1395.12
+ ไคโตซาน 0.75%	100	18.0	1318.20
	110	16.5	1202.82
	120	15.0	1087.43
ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10%	90	20.5	1510.51
+ ไคโตซาน 1.00%	100	19.0	1395.12
	110	17.5	1279.74
	120	16.0	1164.35

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางภาคผนวก 2 (ต่อ) ความสามารถของสาร (I) โดยใช้ปริมาณสาร (I) 0.0010 กรัม ในการยับยั้ง การ เจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides*

กรรมวิธี	ช่วงอายุ (เดือน)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition area (mm)	ปริมาณสาร (I)
ชุดควบคุม	90	14.0	1010.51
	100	11.5	818.20
	110	9.5	664.35
	120	7.0	472.05

หมายเหตุ ช่วงอายุของมะม่วงที่ใช้ในการทดลอง จะเริ่มนับตั้งแต่วันที่ดอกบาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางตารางภาคผนวก 3 ปริมาณสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัม ของผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์อายุ ที่ผ่านการเคลือบผิวด้วยกรรมวิธีต่างๆ

กรรมวิธี	ช่วงอายุ (เดือน)	ปริมาณสาร (I) (µg) ต่อน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัม
ไคโตซาน 0.50%	90	1269.25
	100	1117.50
	110	973.66
	120	746.69
ไคโตซาน 0.75%	90	1366.83
	100	1221.71
	110	1073.25
	120	839.86
ไคโตซาน 1.00%	90	1417.01
	100	1315.79
	110	1174.24
	120	1035.70
ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10% + ไคโตซาน 0.50%	90	1572.80
	100	1420.51
	110	1324.49
	120	1279.74
ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10% + ไคโตซาน 0.75%	90	1713.21
	100	1621.39
	110	1473.45
	120	1326.66
ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10% + ไคโตซาน 1.00%	90	1865.47
	100	1716.00
	110	1570.24
	120	1430.99

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางตารางภาคผนวก 3 (ต่อ) ปริมาณสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัม ของผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์อายุ ที่ผ่านการเคลือบผิวด้วย กรรมวิธีต่างๆ

กรรมวิธี	ช่วงอายุ (เดือน)	ปริมาณสาร (I) (µg) ต่อน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัม
ชุดควบคุม	90	1222.72
	100	971.20
	110	784.60
	120	547.57

หมายเหตุ ช่วงอายุของมะม่วงที่ใช้ในการทดลอง จะเริ่มนับตั้งแต่วันที่ดอกบาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – สกุล	นางสาวปัญชลี เขียวขจี
วัน – เดือน – ปี เกิด	6 ธันวาคม 2525
ภูมิลำเนา	22/4 หมู่ 3 ต.บางปิด อ.แหลมงอบ จ.ตราด 23120
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนสตรีประเสริฐศิลป์ จ.ตราด ปีการศึกษา 2543
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2547

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved