บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การทดสอบหาความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* ในสภาพ *In vitro*

การทดสอบหาความเข้มข้นของไคโตซานในการยับยั้งเชื้อ *C. gloeosporioides* บนจานอาหาร PDA ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 10 วันพบว่าชุดที่ผสมไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์ ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 0.50 เปอร์เซ็นต์ ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 0.75 เปอร์เซ็นต์และในจานอาหาร PDA ที่ผสมไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบการเจริญของเชื้อราเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาของการเพาะเชื้อ ส่วนชุดอื่นๆ พบว่ามีการเจริญของเชื้อราในจานอาหาร ดังที่แสดงในตาราง 4.1 แสดงว่าไคโตซานที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ได้ สอดคล้องกับการทดลองของ El – Ghaouth *et al.* (1992) ซึ่งนำผลสตรอเบอรี่สดที่ปลูกเชื้อด้วยสปอร์ของเชื้อ *Botrytis cinerea* และ *Rhizopus stolonifer* แล้วเคลือบด้วยไคโตซาน 1.00 และ 1.50 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การเกิดโรคจากเชื้อราสาเหตุทั้ง 2 ชนิดจะลดลงและกลไกการเกิดโรคจะมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติในการเป็นตัวยับยั้งเชื้อมากกว่าความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ chitinase, chitosanase และ β1,3 – glucanase และยังพบว่าไคโตซานมีผลอย่างมากในการยับยั้งการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเชียร (2541) พบว่าการใช้ ไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.50, 0.75 และ 1.00 เปอร์เซ็นต์ เคลือบผิวผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้และพันธุ์เขียวเสวยสามารถควบคุมโรคที่เกิดขึ้นกับผลมะม่วงทั้งสองพันธุ์ได้ และจากการทดลองของ Cheah *et al.* (1997) พบว่าการเคลือบผิวแครอทด้วยไคโตซานสามารถลดการเน่าและทำให้เส้นใยของเชื้อรา *Sclerotinia sclerotinum* ผิดรูปร่างและตาย ทำให้สามารถลดการเน่าเสียของแครอทลงจาก 88 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 28 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 2 การตรวจหาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยวิธี PTLC bioassay

การเคลือบผิวไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งได้แก่ไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.5, 0.75 1.00 เปอร์เซ็นต์ และไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 0.50 เปอร์เซ็นต์ ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 0.75 เปอร์เซ็นต์และไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมซึ่งผ่านการจุ่มด้วยน้ำเปล่าบนผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่มีอายุ 90, 100, 110 และ 120 วัน ทิ้งไว้บนต้น 3 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์ในห้องทดลอง พบว่าจากการทำ PTLC bioassay โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบที่ได้จากทุกชุดการทดลองแสดงแถบสารที่ต้านทานการเจริญเติบโตของเชื้อรา ซึ่งมี R_f ที่ 0.68 และที่ R_f ในช่วง 0.10 – 0.30 แสดงว่า สารสกัดหยาบที่ได้จากทุกชุดการทดลองมีสารที่มีฤทธิ์ในการต้านทานเชื้อราแต่ความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของแต่ละชุดการทดลองจะแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ นีรนุช (2539) ซึ่งทำการสกัดสารที่ไม่เป็นเรซอร์ซินอลที่ต้านเชื้อราในผิวมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ด้วยวิธี PTLC bioassay พบว่า โครมาโตแกรมของส่วนสกัดหยาบแสดงแถบสารที่ต้านทานการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ R_f 0.10 – 0.23 ซึ่งเป็นแถบที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนที่สุด รัชดาภรณ์ (2540) ทำการศึกษาสารต้านเชื้อราในผิวมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ โดยทำการสกัดส่วนสกัดหยาบแล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* ด้วยวิธี PTLC bioassay พบว่าส่วนสกัดหยาบที่นำมาทดสอบให้บริเวณต้านเชื้อราที่ระยะ R_f 0.07 – 0.23 ได้ชัดเจนที่สุด และนอกจากนี้ยังสังเกตพบบริเวณต้านเชื้อราที่ R_f 0.77 ได้เล็กน้อย สิริพร (2540) ทำการสกัดสารต้านเชื้อราจากมะม่วงพันธุ์เขียวเสวย นำมาทดสอบหาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* บนแผ่น TLC พบว่า โครมาโตแกรมของส่วนสกัดหยาบแสดงแถบสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา 4 แถบสารคือ ที่ R_f 0.16, R_f 0.45, R_f 0.70 และ R_f 0.90 แต่ความสามารถของการยับยั้งเชื้อราของแต่ละแถบสารจะแตกต่างกัน และพบว่าแถบสารที่ R_f 0.16 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของสารเคลือบผิวไคโตซานในการกระตุ้นการสร้างสารต้านเชื้อราของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

การนำสารสกัดหยาบที่ได้จากมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์อายุ 120 วันที่เคลือบผิวด้วยไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 0.50 เปอร์เซ็นต์ มาทำ TLC 2 ครั้ง ขูดแถบสารที่มี R_f อยู่ในช่วง 0.10 – 0.30 ซึ่งมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูง เรียกสารนี้ว่าสาร (I) แล้วเตรียมสารที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในตาราง 4.2 จากนั้นนำมา spot บนแผ่น TLC แล้วนำไปทดสอบกับเชื้อ *C. gloeosporioides* พบว่า ปริมาณของสาร (I) ตั้งแต่ 30 µg สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. gloeosporioides* ได้ ดังแสดงในภาพ 4.5, 4.6 และ 4.7 ซึ่งแสดง inhibition area ในบริเวณที่หยดสาร และเมื่อนำสาร (I) ปริมาณ 0.0010 กรัม จากมะม่วงที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ ที่มีอายุ 90, 100, 110 และ 120 วัน มาหาความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา พบว่ามะม่วงที่ผ่านการเคลือบผิวด้วยไตโตซานทุกชุดการทดลองสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีกว่าชุดควบคุม และเมื่อทำการหาปริมาณสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัมของเปลือกมะม่วงที่ผ่านกรรมวิธีต่างๆ พบว่ามะม่วงชุดที่เคลือบผิวด้วย ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสาร (I) ต่อน้ำหนักเปลือกสดมากที่สุดในทุกช่วงอายุ รองลงมาได้แก่ มะม่วงที่เคลือบผิวด้วยไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 0.75 เปอร์เซ็นต์ มะม่วงที่เคลือบผิวด้วยไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 0.50 เปอร์เซ็นต์ และมะม่วงที่ผ่านการเคลือบผิวด้วยไคโตซาน 1.00 0.75 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมมีปริมาณสาร (I) จากน้ำหนักเปลือกสด 1 กรัม น้อยที่สุดในทุกช่วงอายุ โดยที่ช่วงอายุ 90 วัน มะม่วงชุดที่เคลือบผิวด้วยไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสาร (I) ต่อน้ำหนักเปลือกสด มากกว่าชุดควบคุม 1.5 เท่า และเมื่อมะม่วงมีอายุ 120 วัน ชุดที่เคลือบผิวด้วยไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสาร (I) ต่อน้ำหนักเปลือกสดมากกว่าชุดควบคุมถึง 2.6 เท่า ดังแสดงในภาพ 4.8 และ 4.9 นอกจากนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณสาร (I) ของมะม่วงอายุ 90 วัน และ 120 วัน ชุดที่เคลือบผิวด้วยไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์ กับชุดควบคุมพบว่า ชุดที่เคลือบผิวด้วยไคโตซาน 1.00 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณสาร (I) ลดลงร้อยละ 23.29 (ของน้ำหนักเปลือกสด) ส่วนชุดควบคุมปริมาณสาร (I) ลดลงร้อยละ 55.22 (ของน้ำหนักเปลือกสด)จากผลการทดลองแสดงว่า ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ ทั้งยังสามารถชักนำการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราในผลมะม่วงได้ นอกจากนี้

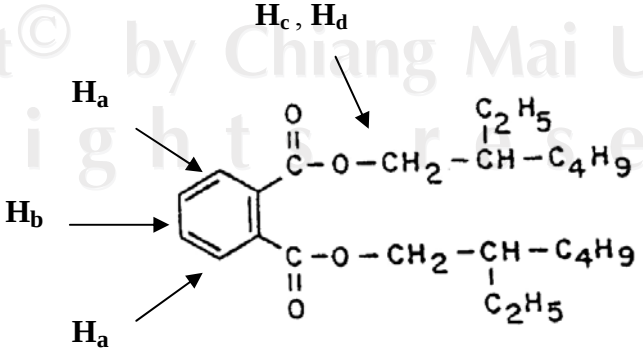
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การใช้ไคโตซานจากเห็ดหอมร่วมกับไคโตซานยังสามารถชักนำให้ผลมะม่วงสร้างสารต้านเชื้อรา ได้ดีกว่าการใช้ไคโตซานเพียงอย่างเดียวอีกด้วย

ทวีสิน (2539) ศึกษาหาปริมาณสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* จากมะม่วง 4 สายพันธุ์ได้แก่ พันธุ์โชคอนันต์ แรด ทองดำ และน้ำดอกไม้ ที่อายุ 2, 3, 4 เดือน และสุก (12 วันหลังเก็บเกี่ยว) พบว่า มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์มีปริมาณสาร (I) (μg) ต่อน้ำหนักเปลือกสด 1 g มากที่สุดในทุกช่วงอายุ รองลงมาได้แก่ มะม่วงพันธุ์ทองดำ แรด และน้ำดอกไม้ โดยช่วงอายุ 4 เดือนมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์มีปริมาณสาร (I) มากกว่ามะม่วงพันธุ์ทองดำ แรด และน้ำดอกไม้ 2.67, 3.67 และ 4.54 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณสาร (I) ในมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ลดลงจาก 701.38 μg/g (ของน้ำหนักเปลือกสด) ในช่วงอายุ 4 เดือน เหลือ 195.12 μg/g (ของน้ำหนักเปลือกสด) ในช่วงสุก (12 วันหลังเก็บเกี่ยว)

การวิเคราะห์หาสารที่เป็นองค์ประกอบจากแถบสารที่มี R_f อยู่ในช่วง $0.10 - 0.30$ โดยใช้ Infrared spectrophotometer (IR) พบว่ามีการดูดกลืนแสงที่ 1,750 cm^{-1} ซึ่งเป็นการยืดของ $C = O$ ใน ester และที่ 1,000 cm^{-1} และ 1,250 cm^{-1} เป็นการยืดของ $C - O - C$ ดังภาพ 4.10 การวิเคราะห์โดยวิธี Gas Chromatography (GC) ได้โครมาโตรแกรมที่มีสารเพียงสารเดียวที่ Retention (R.T.) เท่ากับ 11.195 นาที ดังภาพ 4.11 การวิเคราะห์โดยวิธี Gas Chromatograph – Mass Spectrometer (CG – MS) พบว่ามีเพียงสารเดียวที่ Retention (R.T.) เท่ากับ 18 นาที (ภาพ 4.12) และเมื่อนำสารที่ตำแหน่งนี้มาวิเคราะห์ด้วย Mass Spectrometer พบว่ามี base peak ที่ 149 และน้ำหนักมากที่สุดที่ 280 (ภาพ 4.13) การวิเคราะห์โดยวิธี Magnetic Resonance spectrometer ($^1H - NMR$) ได้สเปกตรัมประกอบด้วยสัญญาณ 3 ชุดคือ ที่ประมาณ 7.6 ppm, 4.2 ppm และ 1.3 ppm ดังภาพ 4.13 ซึ่งคาดว่าสาร (I) มีองค์ประกอบเป็นสาร di-2-ethylhexyl phthalate พีคทั้ง 3 กลุ่มคาดว่าเกิดจากโปรตอนในตำแหน่งต่างๆ (a, b และ c)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 5.1 โครงสร้างของสาร di-2-ethylhexyl phthalate

ข้อเสนอแนะงานในอนาคต

1. วิธีการเคลือบผิวด้วยไคโตซานบนผลมะม่วง ควรใช้วิธีการจุ่มผลมะม่วงทั้งผลในภาชนะ ดีกว่าการใช้วิธีพ่นไคโตซานไปบนผลมะม่วงโดยตรง เนื่องจากวิธีการพ่นอาจจะเคลือบผิวผลมะม่วงไม่ได้ทั้งผล

2. ผลมะม่วงที่ใช้ในการทดลองควรเป็นผลมะม่วงที่ไม่ผ่านการฉีดพ่นสารเคมีเพื่อควบคุมเชื้อรา เนื่องจากสารเคมีจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทำให้ผลการทดลองอาจจะคลาดเคลื่อนได้

3. ควรวิเคราะห์ผลการทดลองหลังจากเก็บผลมะม่วงกลับมาวิเคราะห์ในห้องทดลองในทันที เพราะผลมะม่วงที่เก็บมายังคงมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา

4. ในขั้นตอนการตรวจสอบหาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยการนำ spore suspension ของเชื้อรามา spray บนแผ่น TLC ควรจะมีการตรวจสอบแถบสารที่ R_f 0.68 ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved