การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคโตซานจาก *Mucor* sp. และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค

The Optimization of Chitosan Production from *Mucor* Sp. and Its Effective to Inhibited Pathogenic Microorganism

จารุชา ยี่แสง[1*] จรัญเพ็ชร สุขเขียว[1] และ ไอรดา ดวงจันทร์[1]

[1]*สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม*
[*]*pond_mo@hotmail.com*

บทคัดย่อ

กากน้ำตาลเป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่สามารถตกผลึกน้ำตาลได้อีก จึงเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานน้ำตาลที่มีมากในประเทศไทย การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาลโดยนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์จึงถือเป็นการเพิ่มมูลค่าของทรัพยากรอย่างหนึ่ง งานวิจัยนี้จึงศึกษาการนำเอากากน้ำตาลที่มีมากในพื้นที่ จ.นครปฐม มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตไคโตซานจากเชื้อ Mucor sp. จากการศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาล พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตไคโตซาน พบว่าที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 5 สภาวะ pH เริ่มต้น 10 และ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน จะให้การเจริญเติบโตและผลิตไคโตซานได้ดีที่สุดเท่ากับ 4,654 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และ 2.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อนำไคโตซานที่สกัดได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรค 5 สายพันธุ์ พบว่าไคโตซานที่สกัดได้สามารถยับยั้งเชื้อ Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus และ Candida hypolytica ได้ร้อยละ 60, 52, 41 และ 23 ตามลำดับ โดยไคโตซานที่สกัดได้สามารถยับยั้งเชื้อ E. coli และ B. subtilis ได้ดีกว่าไคโตซานทางการค้า ในขณะที่ไคโตซานที่ผลิตได้และไคโตซานทางการค้าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ Aspergillus niger ได้เลย

คำสำคัญ: ไคโตซาน, กากน้ำตาล, *Mucor* sp.

Abstract

Molasses; by-products from sugar production that cannot further precipitated and become waste products from the sugar productions in Thailand. A new application of molasses as substrate for bio production has been interested to add value of local natural product resources, especially Nakhon Pathom Province. The aim of this study was to utilized molasses as the useful carbon source for chitosan production of Mucor sp. The effect of molasses concentration, initial pH and optimum temperature on cell growth and chitosan production were investigated. The results found that, the highest cell growth and the highest chitosan production of 4,654 cell/cm^2 and 2.94 mg/m, respectivelyl was obtained at molasses concentration of 5%, initial pH 10 and optimum temperature 37 ^{o}C for 7 days. Moreover, inside of against 5 pathogen activity, chitosan from this study could exhibit Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus and Candida hypolytica as 60%, 52%, 41% and 23%, respectively. From this result found that chitosan from isolated Mucor sp. had high potential to inhibited pathogen as E. coli and B. Subtilis more than commercial chitosan. However, both of chitosan from this study and commercial grade could not inhibit Aspergillus niger.

Keywords: chitosan, molasses, *Mucor* sp.

1. บทนำ

สารพอลิเมอร์จากธรรมชาติหลายชนิดที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ สารตัวหนึ่งที่น่าสนใจ คือ ไคโตซาน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคติน ไคโตซาน เป็นพอลิเมอร์ ของ β - 1, 4-2-amino-2-deoxy-D-glucan เป็นสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลยาว มีสูตรคล้ายไคตินต่างกันที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เป็น -NH_2 จึงทำให้ไคโตซานละลายได้ในสารละลายหลายชนิดที่มีพีเอชเป็นกรด (วิสิฐและลูกจันทร์, 2533) ไคโตซานนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภทดังนี้ ทางการเกษตรใช้ประโยชน์ในการเคลือบผลไม้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาให้นานขึ้น ไคโตซานใช้เป็นสารตกตะกอนจึงนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสีย และใช้ในการแยกโลหะหนักบางชนิด ในทางการแพทย์ใช้รักษาบาดแผล ช่วยในการปลูกถ่ายอวัยวะ เป็นยาลดไขมันและคลอเลสเทอรอลได้ นอกจากนี้ยังใช้ในการตรึงเซลล์หรือเอนไซม์อีกด้วย (Sashiwa *et al*., 2003; Sashiwa and Aiba, 2004)

ไคโตซานที่ผลิตเพื่อการค้าส่วนมากผลิตจากไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้งและปูด้วยวิธีทางเคมี โดยการแยกหมู่อะเซ็ททิลออกจากไคตินด้วยการต้มกับสารละลายด่างเข้มข้น 50% เรียกวิธีนี้ว่า Deacetylation (Sashiwa and Aiba, 2004) ในธรรมชาติจะคโตซานเป็นส่วนประกอบขอพบไงผนังเซลล์ราพวก Zygomycetes วงศ์ Mucoraceae ตัวอย่างเช่น *Absidia* spp., *Mucor* spp., *Phycomyces* spp. และ *Rhizopus* spp. (Mario *et al*., 2008) จากการศึกษาส่วนประกอบของผนังเซลล์ของ *Mucor rouxii* พบว่ามีไคโตซานเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 33 (Arcidiacono and Kaplan, 1992) ไคโตซานที่ผลิตด้วยวิธีการทางเคมี มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ นักวิจัยหลายกลุ่มจึงหันมาผลิตไคโตซานจากราในวงศ์ Mucoraceae ในปี 2003, Andrade *et al*.ทำการผลิตและสกัดไคโตซานจาก *Mucor circinelloides* โดยทำการศึกษาปัจจัยของอาหารที่มีผลต่อการเลี้ยงเชื้อรา พบว่า *M. circinelloides* ให้การผลิตไคโตซานสูงสุดที่ 60 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี D-glucose เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีการศึกษาการผลิตไคโตซานจากราในหลายสายพันธุ์ อาทิ *Rhizopus oryzea* (ธัญพร คลี่ขยาย, 2551), *Mucor rouxii* (Arcidiacono and Kaplan, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยังมีผลต่อคุณสมบัติของไคโตซานที่ผลิตได้อีกด้วย (Chatterjee *et al*., 2004; Tayel *et al*., 2010) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการผลิตไคโตซานจากเชื้อรา สายพันธุ์ Mucor sp. โดยใช้กากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้น ตลอดจนการนำไคโตซานที่ผลิตได้มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เพื่อเป็นแนวทางในการนำไคโตซานที่ได้ไปประยุกต์ใช้ต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพไคโตซานจาก *Mucor* sp.
2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคโตซานเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน
2.3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวภาพของไคโตซานที่ผลิตได้

3. ขอบเขตของการวิจัย

ในการทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษานำกากน้ำตาลมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *Mucor* sp. เพื่อผลิตไคโตซาน โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมทั้งต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตไคโตซาน รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานที่สกัดได้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Aspergillus niger* และ *Candida hypolytica*

4.วิธีการดำเนินการวิจัย

4.1 ประเภทของการวิจัย
ใช้วิธีวิจัยแบบทดลองปฏิบัติ (Experimental research)

4.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง
1. กากน้ำตาล จากตัวแทนจำหน่าย หมู่ 3 ต.ทัพหลวง อ.เมือง จ.นครปฐม
2. ไคโตซานทางการค้า ไคโตซานจากบริษัท Aquatic Nutrition Lab (A.N. Lab) จำกัด ประเทศไทย

3. จุลินทรีย์ผลิตไคโตซานได้แก่ ราสายพันธุ์ *Mucor* sp.

4. จุลินทรีย์ก่อโรคได้แก่ *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Aspergillus niger และ Candida hypolytica*

4.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์วิทยาศาสตร์และสารเคมีสำหรับตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาห้องปฏิบัติการ
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงและเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง
3. กล้องจุลทรรศน์พร้อมชุดคอมพิวเตอร์

4.4 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

เขี่ยเส้นใยรา ลงในอาหาร PDA ที่เติม Streptomycin (ความเข้มข้นร้อยละ 0.002 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจนับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ ปรับความเข้มข้นสปอร์ให้อยู่ระหว่าง 1-3 X10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในทุกชุดการทดลอง

2. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลต่อการเจริญและการผลิตไคโตซาน

เตรียมอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อสูตร PDB ดัดแปลง โดยเติมกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็น เติมกล้าสปอร์เชื้อรา *Mucor* sp. เริ่มต้น ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 ของการเพาะเลี้ยง เพื่อนับจำนวนเซลล์และวิเคราะห์หาค่าพีเอช น้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณไคโตซานที่เชื้อผลิตได้ เลือกระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ให้การเจริญเติบโตและผลิตไคโตซานสูงสุด นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคโตซาน

นำอาหารสูตรที่ให้การเจริญเติบโตและปริมาณไคโตซานสูงสุดจากข้อ (2) มาปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH4, pH7 และ pH10 ทำการทดลองและเก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ (2) เลือกค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่ให้ที่ให้การเจริญเติบโตและผลิตไคโตซานสูงสุด นำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อผลิตไคโตซาน

นำอาหารสูตรที่ให้ปริมาณไคโตซานสูงสุดจากข้อ (2) และ ค่าpH เริ่มต้นของอาหารจากผลการทดลองในข้อ (3) มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Mucor* sp. ทำการทดลองโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 45 องศาเซลเซียล เก็บตัวอย่างเช่นเดียวกับชุด การทดลองที่ (2) เลือกค่าอุณหภูมิที่ให้การเจริญเติบโตและผลิตไคโตซานสูงสุด นำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตไคโตซาน

5. การเตรียมไคโตซานที่ผลิตได้และไคโตซานทางการค้า

เตรียมสารละลายไคโตซานที่ผลิตได้และไคโตซานทางการค้าที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย ละลายไคโตซานแต่ละชนิด 1 กรัม ในกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จนไคโตซานละลายได้หมด ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็นกลางโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นนำไปกรองผ่านแผ่นกรอง (filter membrane) ขนาด 0.45 ไมครอนเพื่อฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง

6.ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของไคโตซานที่สกัดได้

การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในห้องปฏิบัติการโดยวิธี agar well diffusion method ทำโดยนำจุลินทรีย์ก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *A. niger* และ *C. hypolytica* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB, PDB และ YPD บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *A. niger* เลี้ยง 48 ชั่วโมง เตรียมสารละลายของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตรวจนับโดยใช้ฮีมาไซโตมีเตอร์ จากนั้นใช้ไม้พันสำลีจุ่มเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละสายพันธุ์ บิดข้างหลอดแก้วพอหมาดแล้วนำไปเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ NA, PDB และ YPD ทิ้งให้แห้งนำ paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร จุ่มลงในไคโตซานที่สกัดได้ ไคโตซานทางการค้า (ชุด

ควบคุมทางบวก) และ น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุมทางลบ) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลการยับยั้งโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clear zone) ที่ได้

ค่าร้อยละการยับยั้ง = $100 - \left[\left(\frac{R}{r}\right) x\ 100\right]$

โดยที่ R = เส้นผ่านศูนย์กลางของชุดควบคุม (เส้นผ่านศูนย์กลางของ cock borer)

r = เส้นผ่านศูนย์กลางของชุดทดสอบ

4.5การวิเคราะห์

1. พีเอช วัดค่าพีเอชโดยเครื่อง pH-meter
2. น้ำตาลรีดิวซ์ วิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐาน DNS method
3. น้ำหนักเซลล์แห้ง นำตัวอย่างที่เก็บในแต่ละช่วงมากรองเอาเซลล์ออกด้วยกระดาษกรอง (ที่อบจนน้ำหนักคงที่) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง
4. ปริมาณไคโตซาน ดัดแปลงตามวิธีของ Tayel และคณะ (2010) นำตัวอย่างที่เก็บแต่ละช่วงปริมาตร 100 มิลลิลิตรมากรองเซลล์ด้วยกระดาษกรอง Whatman No.4 ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเส้นใยราที่ได้มาละลายในสารละลาย1 N NaOH ในอัตราส่วน 1:20 (น้ำหนักเซลล์เปียกต่อปริมาตร) นำเซลล์ที่ได้ไปให้ความร้อนด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที แยกสารละลายด่างออกจากตะกอนไคโตซาน โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีปรับสภาพไคโตซานที่ได้ให้มีสภาวะเป็นกลางด้วยกรดอะซิติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 กรองตะกอนไคโตซานและนำไคโตซานที่ได้ไปทำให้แห้งโดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 2 วัน จนน้ำหนักคงที่ ชั่งปริมาณไคโตซานที่ได้

5. ผลการวิจัย

5.1 ผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลการเจริญและการผลิตไคโตซาน

จากการศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไคโตซานของเชื้อ *Mucor* sp. ทำโดยเลี้ยงเชื้อ *Mucor* sp. ในอาหาร PDB สูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลที่ 4 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองดังในภาพที่ 1 ผลการทดลองที่ได้พบว่าเชื้อ *Mucor* sp. สามารถเจริญเติบโตและผลิตไคโตซานได้ในทุกระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาล โดยอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตไคโตซานมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นจากวัน ที่ 0 - 3 และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 โดยที่ทุกระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลจะให้ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่จะพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ร้อยละ 5 จะให้อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่สูงสุดที่ 4,562 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และมีการผลิตไคโตซานสูงที่สุดเท่ากับ 1.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคโตซาน

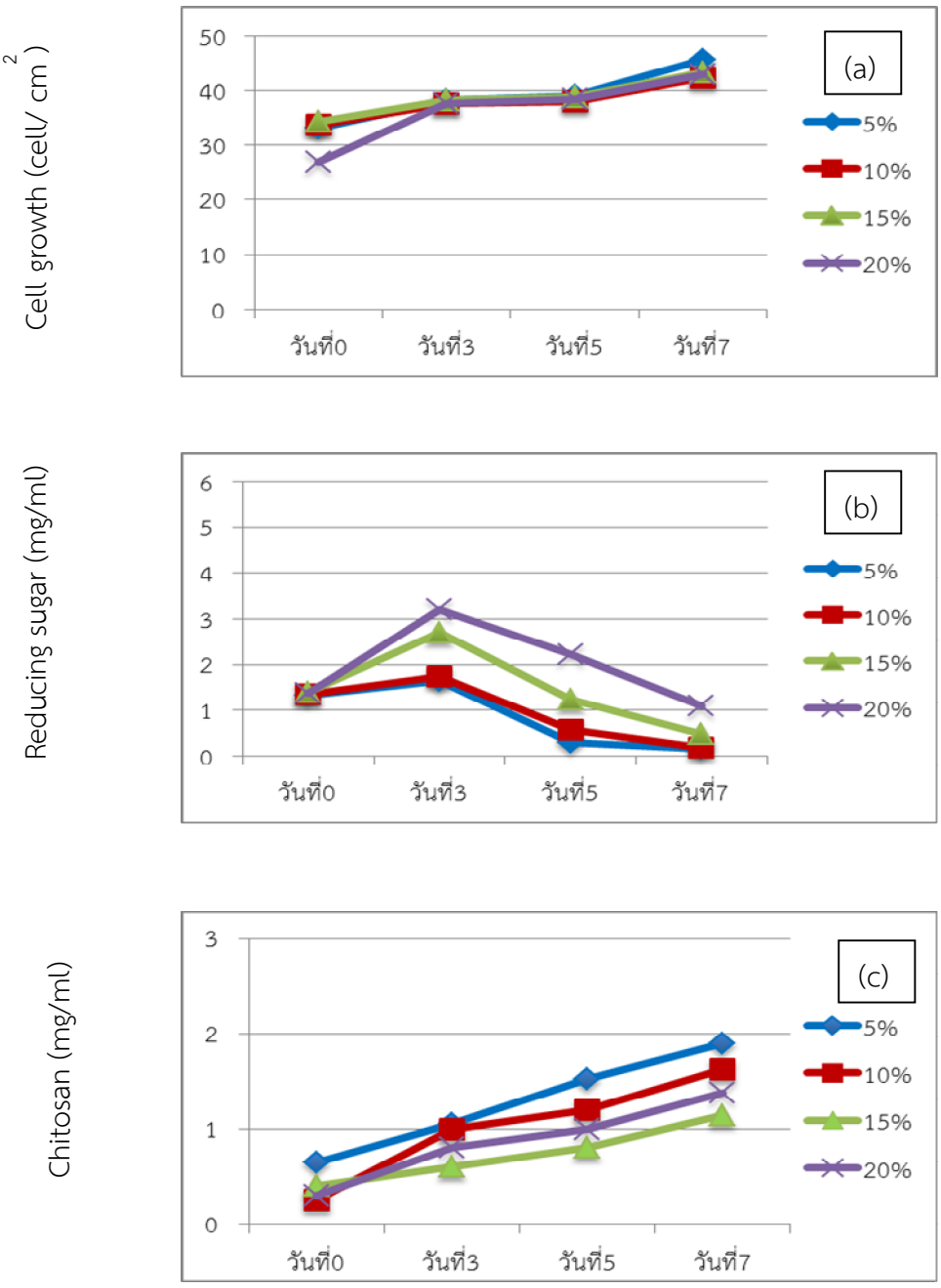
จากการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตไคโตซานจากเชื้อ *Mucor* sp. โดยนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหาร PDB สูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 5 และปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ pH4, pH7 และ pH10 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลอง ดังแสดงในภาพที่ 2 (a, b และ c) โดยจะพบว่าเชื้อ *Mucor* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ในทุก pH เริ่มต้นของอาหาร โดยในวันที่ 0-5 มีแนวโน้มการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเมื่อถึงวันที่ 7 ที่เชื้อมีการเจริญอย่างเต็มที่จะพบว่าที่ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 และ 10 จะให้ปริมาณจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกันเท่ากับ 4,562 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และ 4,654 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4 จะให้ปริมาณจำนวนเซลล์น้อยที่สุด 4,021 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และที่ pH 10 จะให้การผลิตไคโตซานสูงที่สุดเท่ากับ 1.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคโตซาน

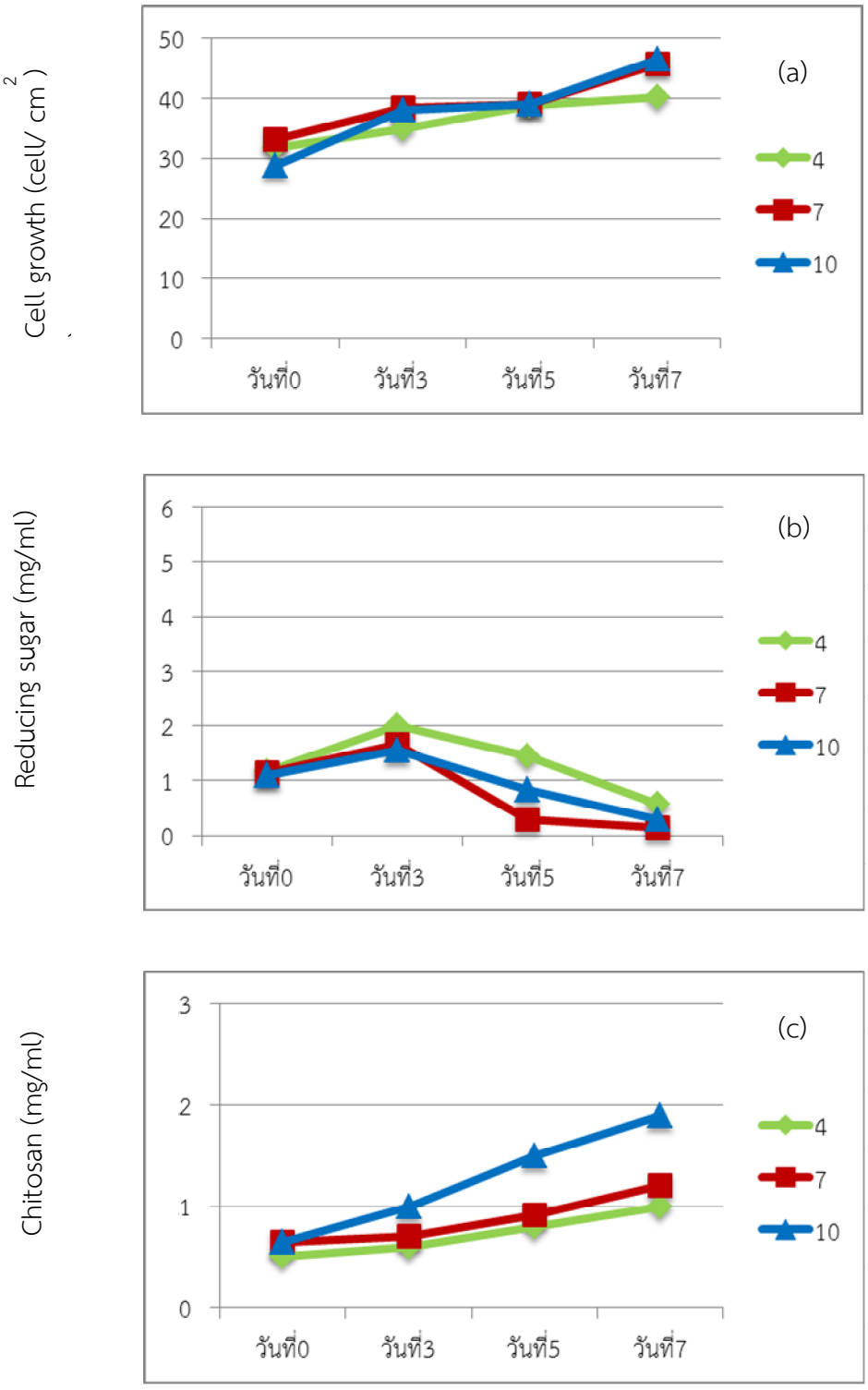
จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไคโตซานจากเชื้อ *Mucor* sp. ในอาหาร PDB สูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 5 และปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20, 37 และ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 3 (a, b และ c) จากผลการทดลองที่ได้พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ที่อุณหภูมิ 20 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างต่ำและคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะมีแนวโน้มของการเจริญเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 3-7 ของการเพาะเลี้ยงและให้ปริมาณเซลล์สูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 4,654 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และมีการผลิตไคโตซานได้สูงสุดเท่ากับ 2.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของไคโตซานที่สกัดได้

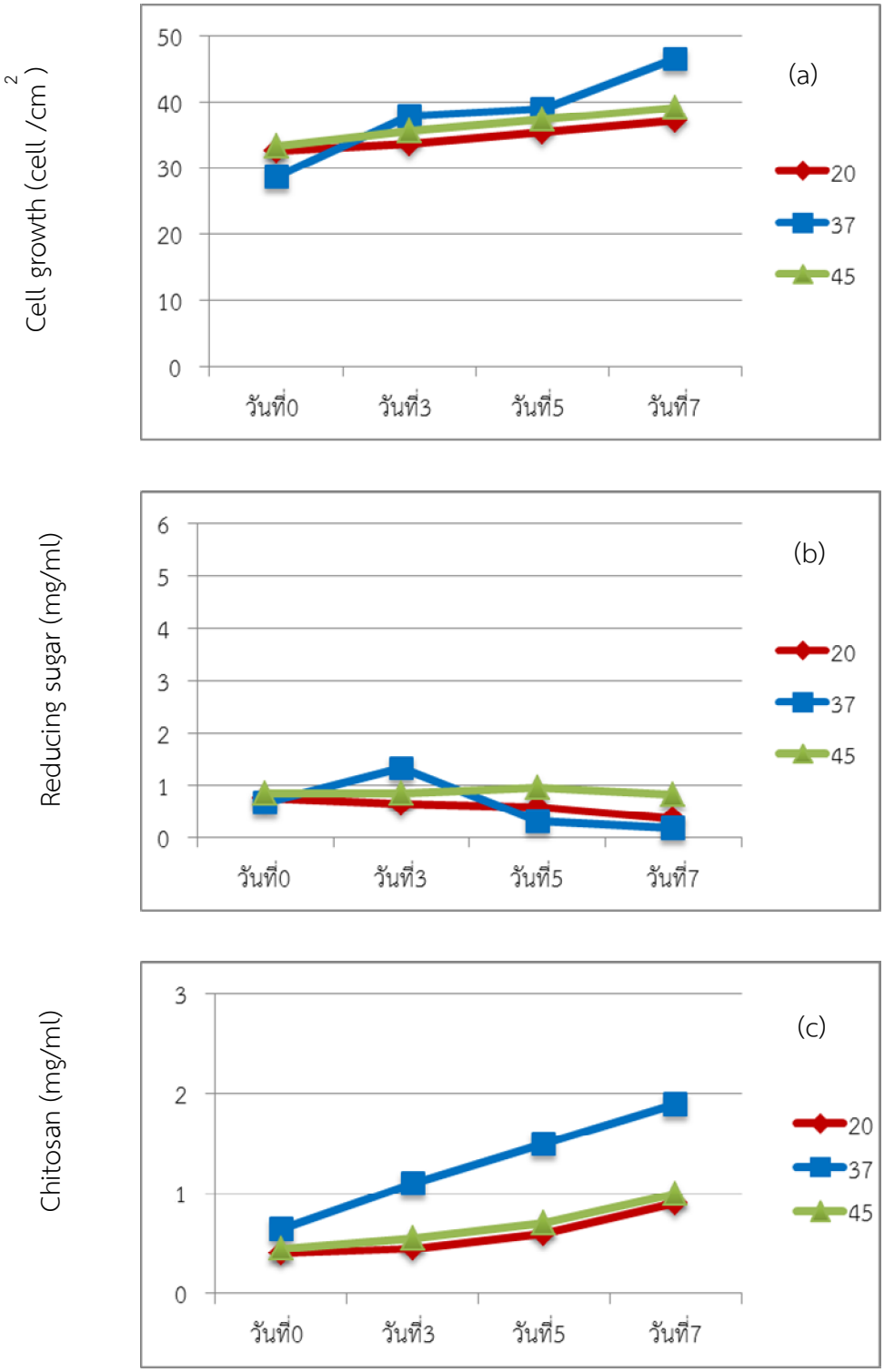
การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของไคโตซานที่ผลิตได้จาก *Mucor* sp. ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* , *B. subtillis*, *S. aureus*, *C. hypolitica* และ *A. niger* โดยวิธี agar well diffusion method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA , YPD และ PDA วัดขนาดวงใสและคำนวณร้อยละค่าการยับยั้ง ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่า ไคโตซาน ที่สกัดได้และ ไคโตซานทางการค้ามีค่าการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ร้อยละ 41 เท่ากัน ในส่วนของเชื้อ *B. subtilis* ไคโตซานที่ผลิตได้ยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ร้อยละ 60 และ ไคโตซานทางการค้ายับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ที่ร้อยละ 51 สำหรับเชื้อ *S. aureus* ไคโตซานที่ผลิตได้ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ร้อยละ 52 ยับยั้งเชื้อและไคโตซานทางการค้า *S. aureus* ได้ร้อยละ 55 เชื้อ *C. hypolytica* ไคโตซานที่ผลิตได้ยับยั้งเชื้อ *C. lypotica* ได้ร้อยละ 23 และไคโตซานทางการค้ายับยั้งเชื้อ *C. hypolitica* ได้ร้อยละ 39 แต่ในส่วนของเชื้อ *A. niger* ไคโตซานที่ผลิตได้และไคโตซานทางการค้าไม่สามารถยับยั้ง *A. niger* ได้



ภาพที่ 1 การเจริญเติบโตและการผลิตไคโตซานของเชื้อ *Mucor* sp.ในอาหารสูตร BG medium ดัดแปลงที่เติมความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่างกัน
(a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (c) ปริมาณไคโตซาน



ภาพที่ 2 การเจริญเติบโตและการผลิตไคโตซานของเชื้อ *Mucor* sp. ในอาหารสูตร BG medium ดัดแปลงที่ค่าพีเอชเริ่มต้นต่างกัน
(a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (c) ปริมาณไคโตซาน



ภาพที่ 3 การเจริญเติบโตและการผลิตไคโตซานของเชื้อ *Mucor* sp. ในอาหารสูตรBG medium ดัดแปลงที่อุณหภูมิต่างกัน
(a) การเจริญเติบโตของเชื้อ (b) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (c) ปริมาณไคโตซาน

ตารางที่ 1 ผลของไคโตซานที่มีผลยับยั้งเชื้อก่อโรค

	E. coli		*B. subtillis*		*S. aureus*		*C. lypotica*		*A. niger*	
	cm	%	cm	%	cm	%	cm	%	cm	%
ไคโตซาน	0.85	41	1.25	60	1.05	52	0.65	23	-	-
ไคโตซานทางการค้า	0.85	41	1.025	51	1.125	55	0.825	39	-	-

6. อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตไคโตซานของเชื้อ *Mucor* sp. ถึงแม้จะพบว่าเชื้อรา *Mucor* sp. สามารถเจริญเติบโตและผลิตไคโตซานได้ในทุกระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาล แต่จะพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ร้อยละ 5 จะให้อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อที่สูงสุด โดยจะพบว่าการเจริญเติบโตและการผลิตไคโตซานมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นจากวันที่ 0–3 ของการเพาะเลี้ยง และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 7 โดยที่ทุกระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลจะให้ผลการเจริญเติบโตเป็นไปในทิศทางเดียวกัน สำหรับผลการผลิตไคโตซานจะสอดคล้องกับการเจริญเติบโต และจะพบว่าการผลิตไคโตซานมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกากน้ำตาลเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของกากน้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 15 และ 20 ผลผลิตไคโตซานที่ได้จะลดลง ทั้งนี้อาจมีผลเนื่องมาจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่สูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญเติบโตเมื่อเซลล์ เช่น การเจริญและผลิตลิปิดของยีสต์ *Rhodosporidium toruloides* Y4 ลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณกลูโคสสูงกว่า 120 กรัมต่อลิตร (Li *et al*., 2007)

นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะแปรผันกลับกับการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. นั่นคือเชื้อมีการนำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้ในการเจริญเติบโต จึงทำให้มีปริมาณเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้นแต่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง สำหรับผลผลิตของไคโตซานที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Mucor* sp. ในสูตรอาหาร PDB สูตรดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาล และพบว่าที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 5 ให้การผลิตไคโตซานสูงที่สุดเท่ากับ 1.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Mucor* sp. สามารถเจริญได้ดีที่สุดในความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 5 จึงมีผลทำให้การผลิตไคโตซานผลิตได้สูงกว่าความเข้มข้นอื่น

สำหรับค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคโตซานของเชื้อ *Mucor* sp. พบว่าที่ pH 10 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้การเจริญเติบโตและการผลิตไคโตซานสูงที่สุด โดยพบว่าที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ pH 7 และ pH 10 ให้ปริมาณจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน ในขณะที่ pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH 4 ให้ปริมาณจำนวนเซลล์น้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่ *Mucor* sp. เป็นราในกลุ่มที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นด่าง การปรับ pH ของอาหารเริ่มต้นให้เท่ากับ 4 จึงเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่มนี้ (Chen *et al*., 2008) เช่นเดียวกับรายงานการทดลองของ Abdel-Aziz *et al*. (2012) ที่พบว่าการเจริญของเชื้อรา *Mucor rouxii* ในสภาวะปกติสามารถเจริญได้ในช่วงค่า pH 5.0-7.5 แต่ความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพเพิ่มสูงขึ้นเมื่อ pH ของอาหารเพิ่มขึ้น และผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพได้สูงที่สุดที่ค่า pH 10 ในขณะที่ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไคโตซาน ของเชื้อ *Mucor* sp. พบว่า อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ที่อุณหภูมิ 20 และ 45 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือมีอัตราการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างต่ำและคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การเจริญเติบโตของเชื้อ *Mucor* sp. ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 3-7 ของ การเพาะเลี้ยงและให้ปริมาณเซลล์สูงสุดทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Mucor* sp. มีการเริ่มสร้างสปอร์เมื่อเชื้อเจริญได้ประมาณ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (เกวลี และ ศันสนลักษณ์, 2548) ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองที่ *Mucor* sp. สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญและให้การผลิตไคโตซานสูงสุดเช่นเดียวกัน ในขณะที่ Mahapatra and Banerjee (2013) รายงานว่าเชื้อราที่ผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีและผลิตพอลิเมอร์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิระหว่าง 22-30 องศาเซลเซียส และมีเพียงบางรายงานการทดลองเท่านั้นที่ระบุว่าเชื้อราผลิตพอลิเมอร์จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (Kim and Yun, 2005)

สำหรับการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของไคโตซานที่ผลิตได้จาก *Mucor* sp. ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 5 สายพันธุ์ *E. coli* , *B. subtillis*, *S. aureus*, *C. hypolytica* และ *A. niger* เปรียบเทียบกับไตโตซานทางการค้า พบว่าไคโต

ซานที่สกัดได้มีค่าการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด สูงถึงร้อยละ 60 และสูงกว่าฤทธิ์ยับยั้งของไคโตซานทางการค้า ในขณะที่ผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* พบว่าทั้งไคโตซานที่ผลิตได้ และไคโตซานทางการค่าจะมีฤทธิ์ยับยั้งที่ไม่แตกต่างกัน แต่ในส่วนของเชื้อ *A. niger* ไคโตซานที่ผลิตได้และไคโตซานทางการค้าไม่สามารถยับยั้ง *A. niger* ได้ ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากไคโตซานขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งที่มาของไคโตซาน และขนาดโมเลกุลของไคโตซานที่นำมาใช้ (ฐิติมา และคณะ 2554)

7. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

7.1 สรุปผลการทดลอง

7.1.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลในการผลิตไคโตซาน

(1) ผลความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลในการผลิตไคโตซาน

ความเข้มข้นของกากน้ำตาลร้อยละ 5 ให้การเจริญเติบโตและการผลิตไคโตซานได้ดีที่สุด เท่ากับ 4,562 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และ 1.89 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(2) ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคโตซาน

pH เริ่มต้นเท่ากับ 10 ให้การเจริญเติบโตและการผลิตไคโตซานได้ดีที่สุด เท่ากับ 4,654 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และ 1.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

(3) ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคโตซาน

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้การเจริญเติบโตและการผลิตไคโตซานได้ดีที่สุด เท่ากับ 4,860 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และ 2.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

7.1.2 ผลของคุณสมบัติสารต้านจุลชีพของไคโตซานที่ผลิตได้

จากการศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของไคโตซานที่ผลิตได้จาก *Mucor* sp. ต่อจุลินทรีย์ก่อโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli*, *B. subtillis*, *S. aureus*, *C. hypolytica* และ *A. niger* พบว่า ไคโตซานที่ผลิตจาก *Mucor* sp. สามารถยับยั้งเชื้อจุลิทรีย์ก่อโรคได้ 4 สายพันธุ์ ประสิทธิภาพในการยับยั้งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค และไม่สามารถยับยั้ง *A. niger* ได้

7.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการผลิตไคโตซานจากเชื้อราในสายพันธุ์อื่น ๆ นอกเหนือจาก *Mucor* sp. เพื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไคโตซานเพื่อใช้ในทางการค้าต่อไป
2. ควรมีการศึกษาการนำไคโตซานที่สกัดได้ไปประยุกต์ใช้ในสภาพแวดล้อมจริง เช่น การนำไปยับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช
3. ศึกษาสูตรอาหารทดแทน หรือวัตถุดิบราคาถูกอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น กากถั่วเหลือง แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงกรบูรณาการนักศึกษาและอาจารย์เพื่อการพัฒนาท้องถิ่นและความเป็นเลิศทางวิชาการ มหาวิทยาลัยราชภัชนครปฐม ปีงบประมาณ 2557 และขอขอบคุณ บุคลากรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐมที่ช่วยให้งานวิจัยสำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

เกวลี จันทร์พันธุ์ และ ศันสนลักษณ์ รัชฎาวงศ์. (2548). **รายงานการวิจัยเรื่อง ผลของแสงต่อการสร้างและการพัฒนารูปร่างของสปอร์และความสัมพันธ์ต่อการสร้างกรดแกมม่าลิโนเลนิคใน สปอร์ของ *Mucor rouxii* (ระยะที่ 1-2).** กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ฐิติมา สุขมาก, พรชัย ราชตนะพันธุ์ และ จิตศิริ ราชตนะพันธุ์. (2553). ประสิทธิภาพของไคโตซานออลิโกเมอร์และพอลิเมอร์จากแหล่งต่าง ๆ ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหาร. **ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48:** สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. 3-5 กุมภาพันธ์ 2553. หน้า 27-33.

วิสิฐ จะวะสิต และ ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. (2533). ไคโตแซนโพลิเมอร์ตัวใหม่จากของเหลือทิ้ง. **อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ.** 1: 4-8.

Abdel-Aziz, M.S., Hamed, H.A., Mouafi, F.E. and Gad, A.S. (2012). Acidic pH-shock induces the production of an exopolysaccharide by the fungus *Mucor rouxii*: Utilization of Beet-molasses. **New York Science Journal**. 5(2), 52–61.

Andrade, S., Neto, B., Fukushima K. and Takaki C. GM. (2003). Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (Mucor javanicus IFO 4570) -- a factorial study. **Rev Iberoam Micol**. 20(4): 149-53.

Arcidiacono, S. and Kaplan, D. L., (1992). Molecular weight distribution of chitosan isolated from *Mucor rouxii* under different culture and processing conditions. **Biotechnology Bioenergy**. 39:281-286.

Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A. K. and Chatterjee, B. P. (2005). Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. **Process Biochem**. 40: 395–400.

Chen, W., Zhao, Z., Chen, S.F. and Li, Y.Q. (2008). Optimization for the production of exopolysaccharide from Fomes fomentarius in submerged culture and its antitumor effect in vitro. **Bioresource Technology.** 99(8), 3187–3194.

Kim, H.O. and Yun, J.W. (2005). A comparative study on the production of exopolysaccharides between two entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* and *Cordyceps sinensis* in submerged mycelial cultures. **Journal Applied Microbiology** 99(4):728–38.

Li, Y., Zhao, Z. and Bai, F. (2007). High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture. **Enzyme and Microbial Technology** 41: 312–317.

Mahapatra, S. and Banerjee, D. (2013). Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiol Insights**. 6: 1–16.

Mario, F.D., Rapana, P., Tomati, U. and Gali, E. (2008). Chitin and chitosan from Basidiomycetes. **Biology. Macromolecules.** 43(1): 8-12.

Sashiwa H. and Aiba S. (2004). Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. **Progress Polymer Science** 29: 887–908.

Sashiwa, H., S., Fujishima, N., Yamano, N., Kawasaki, A., Nadayama, E., Muraki, M., Sukwattanasinitt and R., Pichyangkura. (2003). Enzymatic production of N-acetyl-D-glucosamine from chitin. Degradation study of N-acetylchitooligosaccharide and the effect of mixing of crude enzymes. **Carbohydrate Polymers**, 51: 391-395.

Tayel, A.A., Moussaa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E. and Nickisch-Hartfiel. A. (2010). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. **International Journal Biology Macromolecules**. 47: 10–14.