Agricultural Sci. J. 39 : 3 (Suppl.) : 245-248 (2008) ว. วิทย. กษ. 39 : 3 (พิเศษ) : 245-248 (2551)

ผลของไคโตซานต่อการสร้างสารต้านเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ในผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์
Effect of Chitosan on Antifungal Agents Production Against *Colletotrichum gloeosporioides* in Mango Fruit cv. Choke Anan

ปัญชลี เขียวขจี[1] และอุราภรณ์ สอาดสุด[2]
Panchalee Khieokachee[1] and Uraporn Sardsud[2]

Abstract

The effect of chitosan, *lentinula edodes* mixed with a commercial chitosan on the production of antifungal agent against *Colletotrichum gloeosporioedes* in mango cv. Choke Anan at 4 stage : 90, 100, 110 and 120 days was investigated. The peels of mango on the tree were coated with 0.10% fungal chitosan mixed with 0.50, 0.75 and 1.00% commercial chitosan and left for 3 days. The fruits were then harvested and the peels were extract and analysed on TLC plate. It was found that the extract from mango peel coated with 0.10% fungal chitosan plus 1.00% commercial chitosan was able to inhibit the fungal growth better than other combinations. Comparison of the amount of inhibitory compound at 4 stages of mango revealed the highest amount of the compound per fresh peel weight in all the stages. Spectroscopic and chromatographic determination of the extract indicated that it was di - 2 - ethylhexyl phthalate

Keyword : antifungal agent, chitosan, mango cv. Coke Anan

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของไคโตซานจากเห็ดหอมผสมกับไคโตซานทางการค้าต่อการสร้างสารต้านเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioedes* ในผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ 4 ช่วงอายุคือ 90, 100, 110, และ 120 วัน โดยการเคลือบผิวมะม่วงบนต้นด้วยไคโคซานจากเห็ดหอม 0.10% ร่วมกับไคโตซาน 0.50, 0.75 และ 1.00% ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 วัน แล้วเก็บมาวิเคราะห์ในห้องทดลอง นำเปลือกมะม่วงมาสกัดสารและนำสารสกัดไปทดลองบนแผ่น TLC พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่ผ่านการเคลือบผิวด้วยไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10% ร่วมกับไคโตซาน 1.00% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีกว่าชุดทดลองอื่นๆ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารยับยั้งการเจริญในมะม่วง 4 ช่วงอายุ พบว่าชุดทดลองดังกล่าวมีปริมาณสารยับยั้งการเจริญต่อน้ำหนักเปลือกสดมากที่สุดในทุกช่วงอายุ และเมื่อนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ทางสเปกโตรสโคปีและโครมาโตรกราฟีพบว่าสารสกัดที่ได้คือ di - 2 - ethylhexyl phthalate

คำสำคัญ : สารต้านเชื้อรา ไคโตซาน มะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

คำนำ

มะม่วงเป็นไม้ผลเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สำคัญของประเทศไทย แต่ปัญหาที่สำคัญของการส่งออกผลมะม่วงได้แก่ ความเสียหายที่เกิดจากการเข้าทำลายของโรคแอนแทรคโนส การป้องกันโดยใช้ความร้อนหรือการใช้สารเคลือบผิวต่างๆ ถึงแม้ว่าจะสามารถชะลอการสุก ยืดอายุการวางจำหน่ายและสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ แต่กรรมวิธีต่างๆเหล่านั้นยังไม่มีประสิทธิภาพดีพอ เนื่องจากเป็นการป้องกันในระยะที่ได้ผลผลิตออกมาแล้วในขณะที่โรคนี้เข้าทำลายได้ทุกระยะของการเจริญ ส่วนการใช้สารเคมีนั้นอาจเกิดสารเคมีตกค้างเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของไคโตซานต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราในผลมะม่วงก่อนการเก็บเกี่ยว จากข้อสันนิษฐานที่ว่าในผลไม้ดิบมีสารต้านการเจริญของเชื้อราอยู่ทำให้เชื้อไม่สามารถเข้าทำลายผลไม้ได้ (Baker and Smith, 1977) ดังนั้นการใช้สารเคลือบผิวที่บริโภคได้หรือสารเคลือบผิวจากธรรมชาติมากระตุ้นให้มะม่วงสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก่อนการเก็บเกี่ยวน่าจะเป็นทางออกที่ดีที่สุดในการแก้ปัญหาโรคแอนแทรคโนสในปัจจุบัน

[1] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
[1] Postharvest Technology Research Institute / Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University, Chiang Mai
[2] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200
[2] Department of biology, Faculty of Science / Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University, Chiang Mai

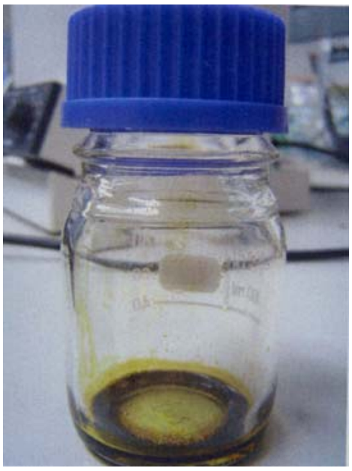
อุปกรณ์และวิธีการ

เคลือบผิวมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์อายุ 90, 100, 110 และ 120 วัน ด้วยไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10% ร่วมกับไคโตซาน 0.50, 0.75 และ 1.00% ทิ้งไว้บนต้นเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บกลับมาวิเคราะห์ในห้องทดลอง โดยนำเปลือกมะม่วงมาสกัดสารและนำสารสกัดไปทดสอบบนแผ่น TLC จากนั้นเตรียม spore suspension ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยจนได้สปอร์เข้มข้น 1×10^{6} สเปรย์เชื้อราลงบนแผ่น TLC ที่ใส่สารสกัดแล้วในตู้ดูดควันนำมาใส่ในกล่องบ่มเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 คืน บันทึก R_f ของแต่ละแถบที่เกิด inhibition area (โดยแถบที่สนใจคือ แถบที่มี R_f อยู่ในช่วง 0.10 – 0.30) นำสารต้านเชื้อราที่สกัดได้จากเปลือกมะม่วงมาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำ PTLC bioassay อีก 1 ครั้ง ขูดแถบสารที่มี R_f อยู่ในช่วง 0.10 – 0.30 นำมาสกัดออกด้วยตัวทำละลาย เมธานอล : ไดคลอโรมีเธน อัตราส่วน 1 : 1 กรองซิลิกาเจลและสปอร์ออกด้วยกระดาษ Whatman No.1 เก็บส่วนละลายที่ใส นำมากำจัดน้ำด้วยโซเดียมซัลเฟต ระเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่อง rotary evaporator นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องมือทาง spectroscopy และ chromatography ซึ่งได้แก่ Infrared spectrophotometer (IR), Proton Nuclear Magnetic Resonance spectrometer (^{1}H – NMR), Gas Chromatrography (GC) และ Gas Chromatrograph – Mass Spectrometer (GC – MS) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาสูตรโครงสร้างของสาร

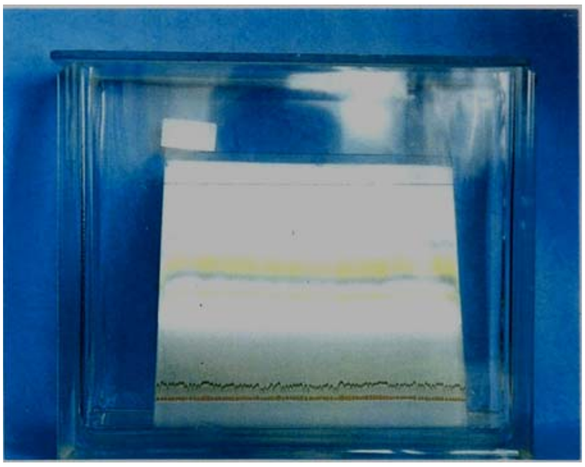
ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบสารสกัดโดยวิธี Preparative Thin Layer Chromatography (PTLC)

จากการสกัดสารสกัดหยาบของผิวเปลือกมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ที่ผ่านการเคลือบผิวด้วยไคโตซานพบว่า สารสกัดหยาบที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม เหนียวหนืด (ภาพ 1 a) เมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้มา spot บนแผ่น TLC ลักษณะโครมาโตรแกรมที่ได้บนแผ่น TLC แสดงลักษณะของสีน้ำตาลอ่อน สีเขียวเข้ม สีเหลืองเข้ม สีเขียวอมเหลือง และสีเหลืองอ่อน (ภาพ 1 b)



a



b

Figure 1 Crude extract (a) and characteristic of crude extract on TLC plate (b)

2 การตรวจหาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยวิธี PTLC bioassay

หลังจากสเปรย์ spore suspension ลงบนแผ่น TLC ที่ spot สารสกัด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 คืน พบว่าบนแผ่น TLC เกิดแถบสารที่ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา 2 แถบคือ ที่ R_f 0.68 และ ที่ R_f 0.10 – 0.30 ซึ่งแถบสารที่สนใจและเห็นได้ชัดที่สุดมีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.10 – 0.30 (ภาพ 2)

Figure 2 The band at R_f 0.68 and R_f 0.10 – 0.30 after assay with *Colletotrichum gloeosporioides*

3 ศึกษาผลของสารเคลือบผิวไคโตซานในการกระตุ้นการสร้างสารต้านเชื้อราของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์

หลังจากการสเปรย์เชื้อราบนแผ่น TLC ที่ spot สารสกัดจากเปลือกมะม่วง พบว่ามะม่วงชุดที่เคลือบผิวด้วย ไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10% ร่วมกับไคโตซาน 1.00% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราในมะม่วงทั้ง 4 ช่วงอายุ พบว่าชุดทดลองดังกล่าวมีปริมาณสารยับยั้งการเจริญต่อน้ำหนักเปลือกสดมากที่สุด

4 ศึกษาโครงสร้างของสารต้านเชื้อราโดยใช้เครื่องมือทาง spectroscopy และ chromatography

การวิเคราะห์โครงสร้างของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่มี R_f อยู่ในช่วง 0.10 – 0.30 พบว่าสารสกัดมีโครมาโตรแกรมจาก GC อินฟราเรดสเปกตรัมและแมสสเปกตรัมใกล้เคียงกับ GC อินฟราเรดสเปกตรัมและแมสสเปกตรัมของสาร di – 2 – ethylhexyl phthalate ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารดังกล่าวคือ di – 2 – ethylhexyl phthalate (ภาพ 3)

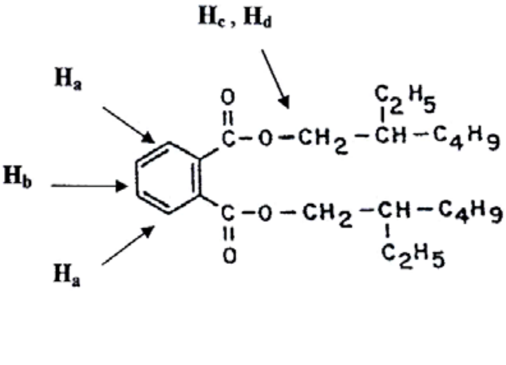


Figure 3 Structure of di – 2 – ethylhexyl phthalate

สรุปและวิจารณ์ผล

สารสกัดของผิวเปลือกมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ทุกช่วงอายุที่ผ่านการเคลือบผิวด้วยไคโตซาน มีแถบสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยพบว่าบนแผ่น TLC เกิดแถบสารที่ต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา 2 แถบคือ ที่ R_f 0.68 และ ที่ R_f 0.10 – 0.30 ซึ่งแถบสารที่สนใจและเห็นได้ชัดที่สุดมีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.10 – 0.30 สอดคล้องกับการทดลองของนีรนุช (2539) ซึ่งทำการสกัดสารที่ไม่เป็นเรซอร์ซินอลที่ต้านเชื้อราในผลมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์ แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Cladosporium cladosporioides* พบว่าโครมาโตรแกรมของส่วนสกัดหยาบแสดงแถบสารที่ต้านการเจริญของเชื้อราที่ R_f 0.10 – 0.23 ได้ชัดเจนที่สุด การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในผลมะม่วง พบว่ามะม่วงชุดที่เคลือบผิวด้วยไคโตซานจากเห็ดหอม 0.10% ร่วมกับไคโตซาน 1.00% สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีที่สุดในทุกช่วงอายุและชุดทดลองดังกล่าวมีปริมาณสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราต่อน้ำหนักเปลือกสดมากที่สุด เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารต้านเชื้อราที่มี R_f อยู่ในช่วง 0.10 – 0.30 พบว่าสารดังกล่าวคือ di – 2 – ethylhexyl phthalate

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนและอุปกรณ์ในการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

นีรนุช ไชยรังสี. 2539. สารไม่เป็นเรซอร์ซินอลที่ต้านเชื้อราในผิวมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิชาชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 97 หน้า.

Baker, E. A. and I. M. Smith. 1997. Antifungal compound in winter wheat eesistance and susceptible to *Septoria nodorum.* Annual Applied of Biological. 87 : 67 – 73.