

ผลของไคโตซานต่อการสร้างสารต้านเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ในลำไยพันธุ์ดอกก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว
Effect of Chitosan on the Antifungal Substance Production of *Lasiodiplodia* sp.
in Pre and Postharvest Longan Fruit cv. Daw

ปิยะวรรณ ขวัญมงคล¹ และ อูราภรณ์ สอาดสุด²
Piyawan Kwanmongkhon¹ and Uraporn Sardsud²

Abstract

The proper inhibitory concentration of chitosan polymer a coating substance against *Lasiodiplodia* sp. was determined on potato dextrose agar (PDA) incorporated with 0.05, 0.25, 0.5 and 1% of the polymer. It was found that 0.5 and 1% chitosan polymer completely inhibited the fungal growth. The effect of this coating polymer at both concentrations on antifungal substance production and preservation of postharvest longan fruit cv. Daw kept at 10°C for 14 days were then investigated. It was found that the chitosan polymer had no effect either on the stimulation or induction of increasing antifungal agent production in the longan peel at various storage intervals.

Detection for the optimum inhibitory concentration of chitosan oligomer to spraying against *Lasiodiplodia* sp. was also tested by inoculating the fungus on PDA incorporated with 0.05, 0.025, 0.5 and 1% of the oligomer. One percent concentration was found to inhibit the growth of fungus completely. The pre-harvest spraying of longan fruit with 0.5 and 1% chitosan oligomer could induce or stimulate the production of inhibiting substance against *Lasiodiplodia* sp. by the longan peel.

บทคัดย่อ

การทดสอบหาความเข้มข้นของสารเคลือบผิวไคโตซานพอลิเมอร์ที่เหมาะสม ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. โดยเฉพาะเชื้อบน potato dextrose agar (PDA) ที่ผสมสารละลายไคโตซานให้มีความเข้มข้น 0.05, 0.25, 0.5 และ 1% พบว่า ไคโตซานพอลิเมอร์ความเข้มข้น 0.5 และ 1% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ จึงได้ศึกษาผลของสารเคลือบผิวชนิดนี้ ที่ความเข้มข้นทั้งสอง ต่อการสร้างสารต้านเชื้อราในลำไย โดยเก็บรักษาลำไยพันธุ์ดอกหลังเก็บเกี่ยวที่ผ่านการเคลือบผิว ด้วยไคโตซานความเข้มข้นดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ไคโตซานพอลิเมอร์ไม่มีผลต่อการกระตุ้นหรือชักนำ การสร้างสารต้านเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ในเปลือกลำไยที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ

การทดสอบหาความเข้มข้นของไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่เหมาะสมในการฉีดพ่นเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. โดยเฉพาะเชื้อบน PDA ที่ผสมสารละลายไคโตซานให้มีความเข้มข้น 0.05, 0.25, 0.5 และ 1% พบว่า ไคโตซานโอลิโกเมอร์ 1% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อนำไคโตซานโอลิโกเมอร์ 0.5 และ 1% ไปฉีดพ่นผลลำไยก่อนการเก็บเกี่ยว พบว่าทั้งสองความเข้มข้น สามารถชักนำหรือกระตุ้นให้เปลือกลำไย สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ได้

คำนำ

ลำไยจัดเป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย ปัจจุบันมีพื้นที่เพาะปลูกในประเทศประมาณ 825,538 ไร่ และเป็นผลไม้ที่มีรสหวาน แต่ไม่สามารถเก็บรักษาได้นาน เนื่องจากลำไยมักเกิดโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น โรคผลเน่า ทำให้เปลือกลำไยมีสีน้ำตาลคล้ำ ขั้วผลเน่าเป็นสีน้ำตาล เนื้อลำไยมีสีขาวขุ่น หรือเชื้ออาจปนเปื้อนอยู่ตามเปลือกผล และเชื้ออาจเข้าทำลายได้ในระหว่างการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลผลิตและการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ

¹ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 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

การผลิตและส่งออกลำไยพันธุ์ดอในลักษณะของผลไม้สดไปยังต่างประเทศ ต้องใช้เวลาในการขนส่งนาน ส่งผลต่อคุณภาพของลำไย ปัจจุบันการควบคุมหรือป้องกันการเน่าเสียของผลลำไยสดหลังการเก็บเกี่ยว มักจะใช้สารป้องกันกำจัดเชื้อราหรือซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ทำให้เกิดปัญหาสารพิษตกค้าง เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค อีกทั้งการเกิดสารตกค้างเกินระดับมาตรฐาน ทำให้ไม่สามารถส่งออกลำไยได้ การใช้ไคโตซานเป็นสารทดแทน ซึ่งเป็นสารที่ปลอดภัยและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคโดยใช้เป็นตัวกระตุ้นระบบการป้องกันตนเองของลำไย โดยการสร้างสารต้านเชื้อรา อาจจะสามารถทำให้ลำไยลดการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยวได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การทดสอบหาความเข้มข้นของไคโตซานพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ในสภาพ *in vitro*

นำไคโตซานความเข้มข้นเริ่มต้น 2% มาเจือจางในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ให้ได้สารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.05, 0.25, 0.5 และ 1% ตามลำดับ วางเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว บันทึกการเจริญและวัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง

2. ศึกษาผลของการเคลือบผิวไคโตซานพอลิเมอร์ต่อการสร้างสารต้านเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ในลำไยพันธุ์ดอหลังการเก็บเกี่ยว

จากผลการทดลองที่ 1 นำลำไยจุ่มสารละลายไคโตซานพอลิเมอร์ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1% เป็นเวลา 5 นาที นำไปผึ่งให้แห้ง แล้วบรรจุผลลำไยทั้งหมดลงกล่องพลาสติก นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 80% นำผลลำไยมาสกัดสารต้านเชื้อราทุก 2 วัน จนถึงวันที่เก็บรักษาวันที่ 14

วิธีการสกัดสารต้านเชื้อราจากเปลือกลำไย

นำผลลำไยแกะเอาเฉพาะส่วนเปลือก ซึ่งเปลือกหนัก 400 กรัม ต่อดัวทำละลาย 1200 มิลลิลิตร ตัวทำละลาย คือเอทานอล 95% แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วกรองเอาสารละลายออกจากกากเปลือก ระเหยเอาตัวทำละลายออกภายใต้ความดันต่ำด้วยเครื่อง rotary evaporator จนแห้งเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ของเปลือกลำไย นำไปทดสอบการต้านเชื้อต่อไป

การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านเชื้อราของสารสกัดจากเปลือกลำไย

เจือจางสารสกัดหยาบ (crude extract) ของเปลือกลำไย ด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80% ตามลำดับ หยดสารสกัดลงบนกระดาษกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร รอจนแห้ง แล้วหยดซ้ำอีกครั้ง นำกระดาษกรองที่หยดสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ มาวางรอบโคโลนีเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ที่อายุ 1 วัน บันทึกการเจริญของเชื้อและบริเวณเกิดการยับยั้ง (clear zone)

3. การทดสอบหาความเข้มข้นของไคโตซานโพลิโกเมอร์ที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ในสภาพ *in vitro*

ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยใช้ไคโตซานโพลิโกเมอร์ วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

4. ศึกษาผลการฉีดพ่นไคโตซานโพลิโกเมอร์ต่อการสร้างสารต้านเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ในลำไยพันธุ์ดอ ก่อนการเก็บเกี่ยว

ทำการฉีดพ่นลำไยก่อนการเก็บเกี่ยว โดยใช้สารละลายไคโตซานโพลิโกเมอร์ ความเข้มข้น 0.5 และ 1% ฉีดพ่นสารละลาย ในช่วงระยะก่อนเก็บเกี่ยว 8 วัน โดยใช้เครื่องพ่น ทำการสุ่มเก็บผลเพื่อไปสกัดสารต้านเชื้อราครั้งละ 3 กิโลกรัม ทุก 2 วัน จนถึงระยะเก็บเกี่ยว (วันที่ 8 หลังการฉีดพ่น) สกัดและทดสอบสารต้านเชื้อรา เช่นเดียวกับการทดลองที่ 2

ผล

1. การทดสอบหาความเข้มข้นของไคโตซานพอลิเมอร์ที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ในสภาพ *in vitro*

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ที่เจริญบนอาหารผสม PDA กับสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.05, 0.25, 0.5 และ 1% เป็นเวลา 3 วัน พบว่า ไคโตซานความเข้มข้น 0.5 และ 1% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ได้ 100% ส่วนความเข้มข้น 0.05 และ 0.25% สามารถยับยั้งเชื้อได้ 65.41 และ 86.52% ตามลำดับ (Figure 1)

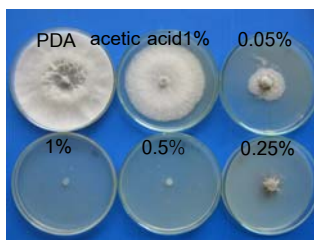


Figure 1 Inhibition effect of chitosan polymer at different concentrations on growth of *Lasiodiplodia* sp. after incubation for 3 days

2. ศึกษาผลของการเคลือบผิวไคโตซานพอลิเมอร์ต่อการสร้างสารต้านเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ในลำไยพันธุ์ดอหลัง การเก็บเกี่ยว

ผลลำไยที่เคลือบผิวด้วยไคโตซานพอลิเมอร์ที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 1% เปรียบเทียบกับการเคลือบผิวด้วย 1% acetic acid และผลลำไยที่ไม่ผ่านการเคลือบผิว (ชุดควบคุม) นำมาทดสอบสารต้านเชื้อราด้วยวิธีการหยดสารสกัดหยาบลงบน paper disc เพื่อตรวจสอบการต้านเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. พบว่าที่ ทุกวิธีการทดลองของสารสกัดหยาบจากเปลือกลำไย ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. โดยไม่พบบริเวณการยับยั้ง (clear zone) รอบกระดาษกรองที่หยดสารสกัด (Figure 2)

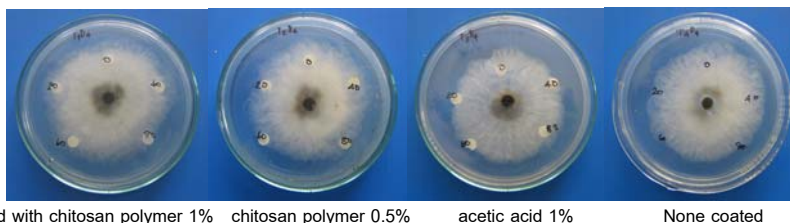


Figure 2 Inhibition effect of antifungal agent production in the longan peel on growth of *Lasiodiplodia* sp.

3. การทดสอบหาความเข้มข้นของไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ในสภาพ in vitro

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ที่เจริญบนอาหารผสม เป็นเวลา 3 วัน พบว่า ไคโตซานโอลิโกเมอร์ พบว่า ไคโตซานความเข้มข้น 1% สามารถยับยั้งเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ได้ 100% รองลงมาความเข้มข้น 0.5% สามารถยับยั้งเชื้อได้ 88.70% ส่วนความเข้มข้น 0.05 และ 0.25% สามารถยับยั้งเชื้อ 45.97 และ 77.82% ตามลำดับ (Figure 3)

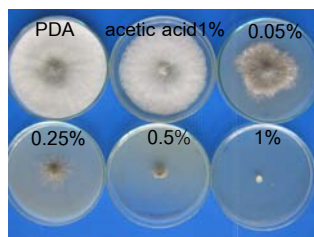


Figure 3 Inhibition effect of chitosan oligomer at different concentrations on growth of *Lasiodiplodia* sp. after incubation for 3 days

4. ศึกษาผลการฉีดพ่นไคโตซานโอลิโกเมอร์ต่อการสร้างสารต้านเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ในลำไยพันธุ์ดอ ก่อนการเก็บเกี่ยว

ฉีดพ่นผลลำไยด้วยสารละลายไคโตซานโอลิโกเมอร์ที่มีความเข้มข้น 1 และ 0.5% นำมาทำสารสกัดหยาบ เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80% แล้วนำมาทดสอบสารต้านเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ด้วยวิธีการ paper disc หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวผลลำไย สารสกัดจากเปลือกลำไยที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยสารละลายไคโตซาน 1 และ 0.5% พบการเกิดบริเวณยับยั้งการเจริญของเชื้อ (clear zone) ทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัด เช่นเดียวกับสารสกัดจากเปลือกลำไยที่ผ่านฉีดพ่นด้วยกรดอะซิติก 1% และไม่ฉีดพ่น พบบริเวณยับยั้งเชื้อในทุกระดับความเข้มข้น วันที่ 4 หลังการฉีดพ่น พบว่า สารสกัด

จากเปลือกลำไยที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยสารละลายไคโตซาน 1% ในทุกระดับความเข้มข้น สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ส่วนสารสกัดจากเปลือกลำไยที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยสารละลายไคโตซาน 0.5% พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 40, 60 และ 80% สามารถยับยั้งเชื้อได้ และในวันที่ 8 หลังการฉีดพ่น ซึ่งเป็นระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต พบว่า สารสกัดจากเปลือกลำไยที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยสารละลายไคโตซาน 1% ทุกระดับความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ เช่นเดียวกับสารสกัดจากเปลือกลำไยที่ผ่านการฉีดพ่นด้วยสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.5% (Figure 4)

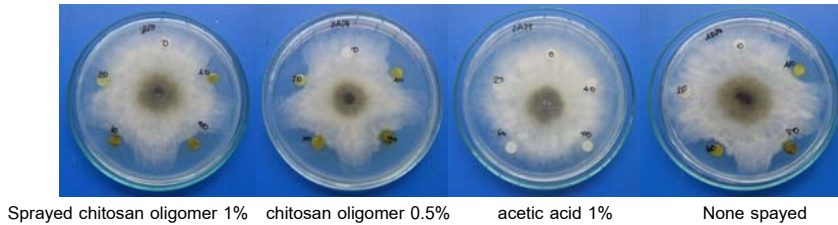


Figure 4 Inhibition effect of antifungal agent production in the longan peel on growth of *Lasiodiplodia* sp.

วิจารณ์และสรุป

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไคโตซานทั้งในรูปแบบพอลิเมอร์และโอลิโกเมอร์ ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. ได้ อาจจะเป็นเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างประจุบวกบนโมเลกุลของไคโตซานที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 ของ glucosamine monomer กับประจุลบบน cell membrane ของจุลินทรีย์ ซึ่งนำไปสู่การแตกของผนังเซลล์ จึงทำให้จุลินทรีย์ตาย การเคลือบผิวผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยวด้วยไคโตซานพอลิเมอร์ ทุกวิธีการทดลอง ไม่พบการเกิดสารต้านเชื้อรา อาจจะเป็นเนื่องจากความสามารถต้านเชื้อราในพืชนั้น ขึ้นอยู่กับความบริบูรณ์ของพืช ถ้าผลผลิตที่ยังไม่บริบูรณ์ จะมีความสามารถในการสร้างสารต้านเชื้อราสูงกว่าผลที่บริบูรณ์แล้ว อีกทั้งพืชที่เก็บเกี่ยวมาแล้วเริ่มมีความอ่อนแอ เกิดการเสื่อมสภาพ และการสร้างสารต้านเชื้อราต่างๆ เริ่มลดน้อยลง การฉีดพ่นไคโตซานโอลิโกเมอร์ก่อนการเก็บเกี่ยว พบว่า ไคโตซาน 0.5 และ 1% มีความสามารถในการรักษาระดับการสร้างสารต้านเชื้อราได้ โดยไคโตซานโอลิโกเมอร์อาจจะเป็นตัวชักนำหรือเป็น elicitor ให้เซลล์เจ้าบ้านสร้างสารพวก phenolic compounds หรือสาร phytoalexin ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว

ไคโตซาน สามารถกำจัดเชื้อ *Lasiodiplodia* sp. เมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ การเคลือบผิวผลลำไยพันธุ์ดอ หลังการเก็บเกี่ยว ด้วยไคโตซานพอลิเมอร์ความเข้มข้น 0.5 และ 1% ไม่มีผลต่อการสร้างสารต้านเชื้อรา *Lasiodiplodia* sp. ของผลลำไยหลังการเก็บเกี่ยว การฉีดพ่นไคโตซานโอลิโกเมอร์ 0.5 และ 1% ในระยะก่อนเก็บเกี่ยว สามารถกระตุ้นให้ผลลำไยก่อนเก็บเกี่ยวสร้างสารต้านเชื้อราดังกล่าวได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- จริงแท้ ศิริพานิช. 2544. สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 396 หน้า.
- สุภักดิ์ มหัทธนนพรค. 2542. ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดในผลลำไยต่อการต้านเชื้อโรคหลังการเก็บเกี่ยว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว), มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 82 หน้า.
- Shahidi F., J.K.V. Arachchi and Y-J Jean. 1999. Food application of chitin and chitosan. *Trends in Food Science & Technology*. 10: 37-51.