บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการทดลอง

Aspergillus niger 5-82 และ *Setosphaeria monoceras* 10-85 เป็นราที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งซึ่งคัดแยกได้จากวัสดุเหลือทิ้งประเภทกากมันและแป้งมันสำปะหลัง ราดังกล่าวมีการเจริญรวดเร็วและ/หรือมีปริมาณกลูโคซามีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ *Aspergillus oryzae* TISTR3018 เมื่อนำราทั้งสามสายพันธุ์มาศึกษาปริมาณแป้งและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch medium พบว่า *A. oryzae* TISTR3018, *A. niger* 5-82 และ *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีในอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ 8, 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานของ *A. oryzae* TISTR3018 และ *A. niger* 5-82 ได้แก่ยูเรียความเข้มข้น 0.5 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานสำหรับ *S. monoceras* 10-85 ได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่า *A. oryzae* TISTR3018 มีความสามารถในการผลิตไคตินได้สูงสุด (7.62±0.23 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ *S. monoceras* 10-85 มีความสามารถในการผลิตไคโตซานได้สูงสุด (390.17±13.43 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งเมื่อนำราทั้งสองสายพันธุ์นี้มาศึกษาถึงผลของการเติมธาตุอาหารรองได้แก่ แมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัสต่อการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานพบว่าราทั้งสองมีการเจริญที่ดีขึ้นและมีผลผลิตไคตินและไคโตซานสูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch medium สูตรปรับปรุงที่ปรับปริมาณแป้งและแหล่งไนโตรเจนให้เหมาะสมสำหรับราแต่ละสายพันธุ์และมีการเติมธาตุอาหารรองดังกล่าวลงไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเติมแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตไคตินและไคโตซานพบว่ามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง โดย *A. oryzae* TISTR3018 ให้ผลผลิตไคตินสูงสุดคือ 7.98±0.15 กรัมต่อลิตร และ *S. monoceras* 10-85 ให้ผลผลิตไคโตซานสูงสุดคือ 557.75±10.18 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงราทั้งสองในอาหาร Starch broth สูตรเดิมซึ่งให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง กล่าวคือ 2.19±0.15 กรัมต่อลิตร และ 194.67±9.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงราทั้งสองสายพันธุ์ในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุงให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานสูงกว่าเดิม 2-4 เท่า และใช้ระยะเวลาน้อยกว่า ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มขึ้น

ของผลผลิตไคตินและไคโตซานนั้นมาจากการเพิ่มขึ้นของทั้งการเจริญและองค์ประกอบของไคตินและไคโตซานที่ผนังเซลล์

อภิปรายผลการวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายแป้งของรา

จากการคัดแยกราบนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทแป้ง เช่น กากมันสำปะหลัง ซึ่งส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ มีองค์ประกอบหลักคือ คาร์โบไฮเดรต และไฟเบอร์ ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่มากนี้ทำให้กากมันสำปะหลังมีศักยภาพที่จะนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เช่น ผงชูรส กรดซิตริก เป็นต้น หรือนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยจุลินทรีย์เปลี่ยนแป้งในกากมันสำปะหลังเป็นสารละลายกลูโคสซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ต่อไป ดังนั้นสามารถนำกากมันสำปะหลังมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลายและมีประสิทธิมากขึ้น

ในการศึกษานี้ได้นำรา 10 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้จากกากมันสำปะหลัง มันเส้นและมันแว่น มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้งบนอาหารแข็ง Starch agar นอกจากนั้นยังได้นำรา *A. oryzae* TISTR3018 ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายแป้งและเป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณไคตินสูงมาเป็นสายพันธุ์อ้างอิง จากการวัดค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดโซนใสและขนาดของโคโลนี พบว่าราไอโซเลท 2-34 และ *A. oryzae* TISTR3018 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแป้งได้ดีที่สุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ส่วนราไอโซเลทอื่น ๆ ได้แก่ 10-85, 5-82, 3-32, 4-83, 6-61, 7-73, 8-32, 9-32 และ 11-74 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแป้งได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งราดังกล่าวสามารถปล่อยเอนไซม์ออกมาสลายแป้ง โดยการย่อยสลายแป้งของรามักจะใช้เอนไซม์อะมัยเลส (Amylase) เนื่องจากแป้งจะมีองค์ประกอบของอะมัยโลส (Amylose) และอะมัยโลเพคติน (Amylopectin) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้ในการเจริญต่อไป (Michael, 1984)

ความสามารถในการเจริญและการย่อยสลายแป้งของราบนอาหาร Starch agar

ความสามารถในการเจริญของรานั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดของสับเสตรท สายพันธุ์ของราและปัจจัยสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Bartncki-Garcia & Nikerson, 1962) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าราไอโซเลท 5-82, 8-32, 9-32 และ 3-32 เจริญได้เร็ว รองลงมาได้แก่ *A. oryzae* TISTR 3018, 10-85, 7-73, 6-61, 4-83 และ 11-74 ส่วนราที่เจริญได้ช้าที่สุดคือ 2-34 ซึ่งราแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อพิจารณาถึงราที่มีการเจริญช้าแต่มีขนาดโซนใสกว้างทำให้อัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีบนอาหารแข็งมีค่ามาก ในขณะที่ราที่มีการเจริญเร็วแต่มีขนาดโซนใสน้อยก็ทำให้ได้อัตราส่วน

ระหว่างขนาดโซนใสต่อขนาดโคโลนีที่น้อยกว่าราที่เจริญช้าทั้งนี้เนื่องจากราแต่ละไอโซเลทมีกิจกรรมและปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายแป้งได้ต่างกันออกไปจึงทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งที่ได้จึงต่างกันด้วย ซึ่งการวิจัยนี้ใช้แป้ง Soluble starch ที่ผ่านการย่อยด้วยกรด (Starch hydrolysate) ซึ่งมีองค์ประกอบของอะมัยโลส (Amylose) และอะมัยโลเพคติน (Amylopectin) ทำให้ราสามารถนำแป้งไปใช้ได้ง่ายขึ้นและรามีเอนไซม์อะมัยเลส (Amylase) เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้ในการเจริญต่อไป

จากที่ทราบกันดีว่าการเจริญของราสายนั้นจะพบการเจริญในบริเวณส่วนปลายเส้นใย (Apex) เท่านั้น ราที่มีการเจริญเร็วมักพบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยมีขนาดใหญ่ ส่วนปลายของเส้นใยมีรูปร่างเป็นรูปโดม บริเวณที่มีการเจริญ (Extension zone) จะมีความยาวค่อนข้างมาก และมีอัตราส่วนระหว่างความยาวของบริเวณที่มีการเจริญกับความยาวของรัศมีของสายรามีค่ามาก ตรงกันข้ามกับราที่มีการเจริญช้า พบว่าส่วนใหญ่เส้นใยมีขนาดเล็ก ปลายเส้นใยมีรูปร่างเป็นรูปครึ่งวงกลม บริเวณที่มีการเจริญจะสั้นและมีอัตราส่วนระหว่างความยาวของบริเวณที่มีการเจริญกับความยาวของรัศมีของสายรามีค่าใกล้เคียง 1 (Michael, 1984) จากลักษณะดังกล่าวทำให้คาดว่าในราที่มีการเจริญเร็วนั้นอาจเนื่องจากการที่บริเวณปลายเส้นใยมีพื้นที่ในบริเวณที่เหมาะสมต่อการสะสมและการจัด เรียงตัวของเวสิเคิลซึ่งเป็นโมเลกุลที่สำคัญต่อการเจริญของราทำให้รามีการเจริญอย่างรวดเร็ว (อนุเทพ ภาสุระ, 2540)

การเจริญและปริมาณกลูโคซามีนของราในอาหาร Starch broth

การเจริญของราสายในอาหารเหลวที่มีการเขย่านั้นมีลักษณะของเพลเลท (Pellet) อย่างไรก็ตามพบว่าในราบางชนิดอาจมีลักษณะเป็นเส้นสาย (Filament)ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสรีรวิทยาของเส้นใย ปริมาณสปอร์ที่เป็นหัวเชื้อ รวมทั้งธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Bartnicki-Garcia & Nikerson, 1962) สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนสามารถนำมาใช้แสดงถึงปริมาณไคตินและไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ราได้เนื่องจากหน่วยย่อยของไคตินและไคโตซานนั้นเป็น *N*-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ซึ่งการวิเคราะห์นั้นอาศัยพื้นฐานของการวิเคราะห์ Acetylated hexosamine ทั้งหมด ดังนั้นจึงนำมาใช้บ่งชี้ปริมาณไคตินและไคโตซานที่มีอยู่ในผนังเซลล์ราได้ (Johnson, 1971)

การวัดการเจริญของราในอาหาร Starch broth นั้นใช้การวิเคราะห์ปริมาณผนังเซลล์ หรือ AIF (Alkaline insoluble fraction) ในการศึกษานี้พบว่าราไอโซเลท 5-82 มีการเจริญสูงสุด (5.71± 0.66 กรัมต่อลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญบนอาหารแข็ง ถึงแม้ราไอโซเลท 5-82 มีปริมาณกลูโคซามีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ไม่สูงมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับราไอโซเลทอื่น ๆ แต่ราไอโซเลทนี้ให้ผลผลิตกลูโคซามีนสูงที่สุด กล่าวคือ 0.81±0.09 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องมา

จากราไอโซเลทนี้มีการเจริญที่สูง มีปริมาณผนังเซลล์มาก ทำให้มีผลผลิตกลูโคซามีนมากด้วย และราไอโซเลท 10-85 ให้ผลผลิตกลูโคซามีนรองลงมา (0.66±0.02 กรัมต่อลิตร) และมีปริมาณกลูโคซามีนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์สูงที่สุด (206.06±5.99 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) ซึ่งราทั้งสองไอโซเลทดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจในการที่จะนำมาศึกษาในขั้นต่อไป ดังนั้นจึงเลือกราไอโซเลท 5-82 และ 10-85 รวมทั้ง *A. oryzae* TISTR3018 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิงมีปริมาณกลูโคซามีนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เป็นอันดับสอง กล่าวคือ 189.17±8.16 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปซึ่งเป็นการศึกษาปัจจัยของธาตุอาหารบางประการที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซาน

การจัดจำแนกรา

เมื่อนำราทั้งสองไอโซเลทคือ 5-82 และ 10-85 ที่คัดแยกได้มาจำแนกเบื้องต้นโดยการตรวจสอบลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง (Macroscopic characteristics) และสัณฐานวิทยาลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characteristics) (Alexopoulos & Mims, 1979) พบว่าราไอโซเลท 5-82 มีลักษณะของโครงสร้างที่สร้างสปอร์เป็นแบบราในสกุล *Aspergillus* สปอร์สีดำ ซึ่งจำแนกได้เป็น *A. niger* (*A. niger* 5-82) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycota ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้ *A. niger* ในการผลิตกรดซิตริก กรดกลูโคนิก และเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น เซลลูเลส และกลูโคสออกซิเดส เป็นต้น (Hu et al., 2004) ส่วนราไอโซเลท 10-85 จัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA พบว่าจำแนกได้เป็น *Setosphaeria monoceras* (*S. monoceras* 10-85) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Ascomycota จากการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของราชนิดนี้ไม่พบว่าเป็นราก่อโรคหรือสร้างทอกซินจึงมีความปลอดภัยที่จะนำมาใช้ในการทดลอง สำหรับ *A. oryzae* TISTR3018 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิงจัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycota และใช้ในการผลิตซีอิ๊วในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งราแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณขององค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกันออกไป จากรายงานการศึกษาพบว่าราในกลุ่ม Ascomycota และ Deuteromycota มีไคตินและกลูแคนเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า *S. monoceras* 10-85 มีปริมาณไคโตซานที่สูง (ดังจะได้กล่าวถึงรายละเอียดต่อไป) ซึ่งในธรรมชาติพบว่ารากลุ่มที่มีไคโตซานเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในปริมาณสูง ๆ นั้นเป็นสมาชิกในกลุ่ม Zygomycota เช่น *Mucor*, *Rhizopus* และ *Absidia* เป็นต้น (Miyoshi et al., 1992)

ธาตุอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานของรา

การเจริญของราสายมีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์ผนังเซลล์ โดยผนังเซลล์ของรามีองค์ประกอบหลักเป็นไคตินและ/หรือไคโตซาน ซึ่งอยู่ร่วมกับสารประกอบชนิดอื่น ๆ เช่น กลูแคน โปรตีนและลิปิด เป็นต้น ในการศึกษานี้พบว่าผนังเซลล์ของราทั้งสามไอโซเลทมีทั้งไคตินและ

ไคโตซานเป็นองค์ประกอบซึ่งมีอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกันไป โดย *A. oryzae* TISTR3018 มีปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของรามากที่สุด (98 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาได้แก่ *A. niger* 5-82 (97 เปอร์เซ็นต์) และ *S. monoceras* 10-85 (94 เปอร์เซ็นต์) ในทางตรงกันข้าม *S. monoceras* 10-85 มีการสะสมไคโตซานในผนังเซลล์ปริมาณมากที่สุด (9.8 เปอร์เซ็นต์) รองลงมา ได้แก่ *A. oryzae* TISTR3018 (3.9 เปอร์เซ็นต์) ส่วน *A. niger* 5-82 มีไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์น้อยที่สุด (1.6 เปอร์เซ็นต์)

การสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานเป็นขบวนการที่มีความสัมพันธ์ต่อเนื่องกัน โดยไคตินจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาก่อน จากนั้นโมเลกุลของไคตินดังกล่าวจะถูกดัดแปลงเปลี่ยนเป็นไคโตซาน เอนไซม์สำคัญสำหรับขบวนการสังเคราะห์ไคตินคือ Chitin synthase ทำหน้าที่สังเคราะห์ไคตินจากโมเลกุลสารตั้งต้นคือ UDP-*N*-acetylglucosamine จนในที่สุดได้ไคตินที่เพิ่งสังเคราะห์มาใหม่ที่เรียกว่าเนสเซนต์ ไคติน (Nasent chitin) และถูกนำมาต่อกันยึดด้วย β-1,4 เป็นสายพอลิแซคคาไรด์จะได้เส้นใยของราที่มีความยาวเพิ่มขึ้น สำหรับราที่สังเคราะห์ไคโตซานได้นั้นจำเป็นต้องมีการสร้างเอนไซม์ Chitin deacetylase ซึ่งทำหน้าที่ไฮโดรไลส์หมู่อะซิติลจาก *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) บนโมเลกุลไคตินเปลี่ยนเป็น Glucosamine (GlcN) และในที่สุดได้เป็นโมเลกุลไคโตซาน กิจกรรมของเอนไซม์ Chitin synthase มีผลต่อความยาวสายโซ่ไคติน (น้ำหนักโมเลกุล) และกิจกรรมของเอนไซม์ Chitin deacetylase มีผลต่อปริมาณหมู่อะซิล (Degree of acetylation) ในโมเลกุลของไคโตซาน ดังนั้นคุณสมบัติของไคโตซานเกี่ยวกับน้ำหนักโมเลกุลและ Degree of acetylation จึงขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์สองชนิดนี้ (Jaworska & Konieczna, 2001)

ในการศึกษานี้มุ่งเน้นไปถึงการปรับปรุงธาตุอาหารต่าง ๆ ที่อยู่ในอาหาร Starch medium ได้แก่ ปริมาณแป้ง แหล่งไนโตรเจน ชนิดและปริมาณของธาตุอาหารรอง ให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานของราที่คัดเลือกมาศึกษา

ความเข้มข้นแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ

แหล่งคาร์บอนมีความสำคัญต่อการทำงานในระบบสรีรวิทยาของเซลล์รา 2 ประการคือ (1) ใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบคาร์บอนภายในเซลล์ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น (2) เป็นแหล่งพลังงานเพื่อใช้เป็นตัวขับเคลื่อนการทำงานระบบต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Michael, 1984) รามีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด การเลือกใช้สารใดเป็นแหล่งคาร์บอนต้องคำนึงถึงความเหมาะสมในการผลิต ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ราที่ใช้ และควรเป็นสารที่มีราคาถูก หาได้ง่าย สามารถนำมาใช้ได้ตลอดเวลา องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนสำคัญต่อการผลิตไคตินและไคโตซานของรา พบว่าแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้คือ

น้ำตาลกลูโคสเนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นไคตินและไคโตซานได้โดยตรง แหล่งของน้ำตาลกลูโคสที่นิยมใช้ ได้แก่ แป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้ว แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว เนื่องจากในโครงสร้างของแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันด้วยพันธะ (α1,4) และ (α1,6) เมื่อย่อยด้วยแอลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

ในการศึกษาได้เลือกรา 3 ไอโซเลทคือ *A. niger* 5-82, *S. monoceras* 10-85 และ *A. oryzae* TISTR3018 มาศึกษาการเจริญในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณแป้ง (Soluble starch) เป็นแป้งมันฝรั่งที่ผ่านการย่อยด้วยกรด (Potato starch hydrolysate) จึงใช้ Soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนแทนแป้งมันสำปะหลังเนื่องจากแป้งที่ผ่านการย่อยแล้วราสามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่าและมีความหนืดของแป้งลดลง โดยได้แปรผันความเข้มข้นเป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อลดข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้แป้งเป็นสับเสตรทเนื่องจากการแปรผันปริมาณความเข้มข้นของแป้งที่สูงทำให้ความข้นเหนียวของแป้งเกาะตรึงเซลล์รา อาจเกิดความผิดพลาดเมื่อวิเคราะห์น้ำหนักเส้นใยแห้งได้ โดยการเจริญของราที่ย่อยสลายแป้งจะใช้ค่า AIF (Alkali-insoluble fraction) แทนค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใย ซึ่งค่า AIF เป็นองค์ประกอบที่เป็นผนังเซลล์เท่านั้นไม่รวมองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ถูกกำจัดออกไปโดยการย่อยด้วย NaOH และ HCl ซึ่งมีค่าสัมพันธ์กันกับค่าน้ำหนักแห้งของราและค่านี้ถูกใช้ในการรายงานหลายงานวิจัย (Tan et al., 1996)

ความสามารถในการเจริญและผลผลิตไคตินและไคโตซานของรานั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของราที่นำมาศึกษา ชนิดของสับเสตรทและสภาวะของการเพาะเลี้ยง เป็นต้น (Crestini et al., 1996; Pochanavanich & Suntornsuk, 2002) จากผลการทดลองพบว่าราแต่ละสายพันธุ์จะให้ปริมาณ AIF และผลผลิตไคตินและไคโตซานภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ราแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญได้ดีในอาหารที่มีปริมาณแป้งแตกต่างกันไป โดยการเจริญและผลผลิตไคตินและไคโตซานของ *A. oryzae* TISTR3018 และ *A. niger* 5-82 จะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลา 6 วันของการเพาะเลี้ยง และมีแนวโน้มสัมพันธ์กับปริมาณ AIF ของราทั้งสองชนิดนี้ด้วย โดย *A. oryzae* TISTR3018 มีการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบในความเข้มข้น 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าที่ได้จากการใช้แป้งความเข้มข้นดังกล่าวมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) จึงเลือกใช้แป้งความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *A. niger* 5-82 ได้เลือกใช้แป้งความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีการเจริญและให้ปริมาณไคตินและไคโตซานได้ดีในอาหาร Starch broth โดยให้ค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) กับความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกใช้แป้งที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าเพื่อลดต้นทุนการผลิตได้ สำหรับค่าของ AIF รวมทั้งปริมาณไคตินและไคโตซานที่ผลิตจาก *S. monoceras* 10-85

จะให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นการเจริญจะค่อนข้างคงที่และดูเหมือนจะเข้าสู่ระยะ Stationary phase ด้วยเหตุนี้ระยะเวลาช่วงนี้จะไม่ส่งผลทำให้ปริมาณไคตินและไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์เพิ่มขึ้น โดยราชนิดนี้สามารถใช้แป้งเป็นองค์ประกอบในความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเจริญและให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานได้ดี

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของราทั้งสามไอโซเลทโดยวิเคราะห์ปริมาณ AIF ของเส้นใยรา พบว่าในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ 10 เปอร์เซ็นต์นั้น *A. niger* 5-82 มีการเจริญสูงสุด (8.57±0.63 กรัมต่อลิตร) รองลงมาได้แก่ *A. oryzae* TISTR3018 (7.53±0.19 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญน้อยที่สุด (4.61±0.16 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ในอาหาร Starch broth ที่มีความเข้มข้นของแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์

และเมื่อพิจารณาองค์ประกอบไคตินและไคโตซานในผนังเซลล์ราทั้งสามไอโซเลท พบว่ามีการสะสมไคตินในผนังเซลล์สูงสุดได้แก่ *A. niger* 5-82 (1.12±0.19 กรัมต่อกรัม AIF) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ในอาหารที่มีแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *A. oryzae* TISTR3018 (0.98±0.00 กรัมต่อกรัม AIF) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 วัน ส่วน *S. monoceras* 10-85 มีการสะสมไคตินในผนังเซลล์ในอาหารที่มีแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์ น้อยที่สุด (0.95±0.01 กรัมต่อกรัม AIF) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ในทางตรงกันข้าม *S. monoceras* 10-85 มีปริมาณการสะสมไคโตซานในผนังเซลล์สูงที่สุด (84.56±2.49 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ในอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ 6 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ *A. oryzae* TISTR3018 (36.32±1.06 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 วัน ส่วน *A. niger* 5-82 มีองค์ประกอบที่เป็นไคโตซานน้อยที่สุด (18.17±1.43 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) ในอาหารที่มีแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน

ในขณะเดียวกันผลผลิตไคตินและไคโตซานของราทั้งสามไอโซเลทพบว่า *A. niger* 5-82 สามารถผลิตไคตินได้ดีที่สุด (7.54±0.31 กรัมต่อลิตร) รองลงมาได้แก่ *A. oryzae* TISTR3018 (7.12±0.19 กรัมต่อลิตร) ซึ่งทั้งสองไอโซเลทเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 วัน และผลผลิตไคตินที่สกัดได้จำนวนมากมาจากปริมาณ AIF และองค์ประกอบของไคตินที่สูงของราทั้งสองไอโซเลท ส่วน *S. monoceras* 10-85 ให้ผลผลิตไคตินน้อยที่สุด (4.36±0.08 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ 6 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 วัน ในทางตรงกันข้าม *S. monoceras* 10-85 มีการสะสมไคโตซานในปริมาณมากที่ผนังเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วันในอาหารที่มี 6 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ผลผลิตไคโตซานสูงที่สุด (389.83±1.89 มิลลิกรัมต่อลิตร) ถึงแม้ว่าจะผลิตชีวมวลได้ต่ำ รองลงมาได้แก่ *A. oryzae* TISTR3018 (220.67±19.76 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วันในอาหารที่มีแป้ง 8

เปอร์เซ็นต์ ส่วน *A. niger* 5-82 ให้ผลผลิตไคโตซานน้อยที่สุด (79.67±11.12 มิลลิกรัมต่อลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 วัน

ความแตกต่างในการใช้สับเสตรทที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานของราเหล่านี้เนื่องจากความสามารถในการย่อยสลายและศักยภาพการนำไปใช้ของราแต่ละชนิดที่จะเปลี่ยนรูปสับเสตรทเข้าไปใช้ในองค์ประกอบภายในเซลล์ จากรายงานการทดลองของ Xu et al. (1989) พบว่าเปอร์เซ็นต์ของแป้งมันสำปะหลังยิ่งมากย่อมให้ปริมาณน้ำตาลที่จะใช้ในการสร้างเซลล์และแหล่งคาร์บอนสูงไปด้วยซึ่งได้ทดลองเลี้ยงรา *A. niger* B 60 ในอาหารที่เปอร์เซ็นต์แป้งของมันสำปะหลังเป็น 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง พบว่าปริมาณแป้งที่ 5 เปอร์เซ็นต์ให้น้ำหนักแห้งของเส้นใยสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ารา *A. oryzae* TISTR3018, *A. niger* 5-82 และ *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีเมื่อใช้สับเสตรทเป็นแป้งความเข้มข้น 8, 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงเกินไปมีผลทำให้ค่าแรงดันออสโมติกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูง ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีพของราจึงทำให้กิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ลดลง มีผลทำให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานต่ำ

เมื่อรามีอายุมากขึ้น ผลการศึกษาพบว่าปริมาณไคตินและไคโตซานในผนังเซลล์ลดลง เหตุผลสำคัญที่นำมาอธิบายมี 2 ประการคือ (1) การเจริญของราในระยะแรกนั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการสังเคราะห์ไคตินหรือไคโตซานเป็นหลักเพื่อเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ดังนั้นสัดส่วนขององค์ประกอบที่เป็นไคตินหรือไคโตซานในผนังเซลล์จึงมีอยู่มาก แต่เมื่อรามีอายุมากขึ้นผนังเซลล์มีความซับซ้อนมากขึ้น เนื่องจากมีการสังเคราะห์องค์ประกอบอื่น ๆ เข้ามาเป็นส่วนประกอบร่วมกับไคตินหรือไคโตซานในผนังเซลล์ เช่น กลูแคน แมนแนน เซลลูโลส หรือเม็ดสี เมลานิน เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของรา และ (2) ในช่วงที่รามีอายุมากขึ้นและมีการเจริญเพิ่มขึ้นอยู่อย่างต่อเนื่องแต่มีปริมาณไคตินและไคโตซานที่ผนังเซลล์ลดลง อาจเนื่องจากสารอาหารและแหล่งพลังงานในอาหารที่มีอยู่ในปริมาณจำกัด ดังนั้นราจึงอาจมีการย่อยสลาย (Autolysis) ผนังเซลล์ของเซลล์ที่มีอายุมากเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งของสารอาหารและพลังงานที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเส้นใยใหม่ ต่อไป จึงเป็นผลให้ปริมาณไคตินและไคโตซานในส่วนผนังเซลล์ลดลง (Davoust & Hansson, 1992)

การเจริญและผลผลิตไคตินและไคโตซานของราชนิดต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ซึ่งนอกจากสายพันธุ์ของราแล้ว ปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งคือ ชนิดของสับเสตรทในการเจริญ สารอาหารที่ราต้องการประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน เกลือแร่ และวิตามิน โดยจำเป็นต้องมีอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม จากรายงานการทดลองของ Suwannachart and Pichyangkura

(1996) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินของ *A. niger* ที่เจริญในอาหารเหลวโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส (Cassava starch hydrolysate) เป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถให้ผลผลิตไคตินถึง 60-90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเส้นใยแห้ง ซึ่งการเจริญและผลผลิตไคตินและไคโตซานที่ดีของราทั้งสามไอโซเลทในการศึกษานี้มีความต้องการแป้งในปริมาณที่เหมาะสมแตกต่างกันไป กล่าวคือ 8, 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *A. oryzae* TISTR 3018, *A. niger* 5-82 และ *S. monoceras* 10-85 ตามลำดับ จึงเลือกใช้แป้งในความเข้มข้นดังกล่าวสำหรับราแต่ละไอโซเลทในการศึกษาขั้นต่อไป

ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและผลผลิตไคตินและไคโตซานของรา

แหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อ ราต้องการแหล่งไนโตรเจนในการสังเคราะห์สารประกอบที่สำคัญภายในเซลล์เพื่อการเจริญ ได้แก่ กรดอะมิโน โปรตีน กรดนิวคลีอิก กลูโคซามีนและไคติน เป็นต้น สำหรับการผลิตไคตินและไคโตซานนั้น แหล่งไนโตรเจนที่ใช้สามารถใช้ทั้งรูปสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ สารอินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยม ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ เปปโตน ส่วนสารอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรทและยูเรีย เป็นต้น (Michael, 1984) นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนแล้ว ปริมาณที่ใช้ก็มีผลต่อการผลิตไคตินและไคโตซานเช่นเดียวกัน ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงจำเป็นที่จะต้องมีการควบคุมสัดส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจน (C/N ratio) ให้เหมาะสม โดยทั่วไปแล้วจะมีสัดส่วนเป็น 10:1 แต่ในสับเสตรทบางชนิดอาจมีสัดส่วนที่ต่ำกว่านี้ หากไนโตรเจนน้อยเกินไปไม่ได้สัดส่วนกับคาร์บอนที่มีอยู่ จะทำให้ไม่เพียงพอต่อการเจริญของราส่งผลให้ได้ผลผลิตไคตินและไคโตซานต่ำ (อนุเทพ ภาสุระ, 2540)

จากการศึกษาการเจริญของ *A. oryzae* TISTR3018 และ *A. niger* 5-82 ใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้แปรผันความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *A. oryzae* TISTR3018 มีการเจริญจะเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงนานขึ้น และผลผลิตไคตินและไคโตซานจะสอดคล้องกับการเจริญกล่าวคือการผลิตไคตินและไคโตซานได้มากในช่วง Log phase และมีการสะสมของสารทั้งสองได้สูงสุดในช่วงปลาย Log phase หรือช่วงต้น Stationary phase หลังจากนั้นการผลิตไคตินและไคโตซานอาจลดลงได้เนื่องจากมีการย่อยสลายตัวเองของเส้นใยที่มีอายุมากขึ้น (Davoust & Persson, 1992) โดยราชนิดนี้เจริญและให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีในอาหารที่มีแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ และยูเรียที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ในขณะที่ *A. niger* 5-82 เจริญและให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีในอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้งที่เหมาะสมคือ 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่ายูเรียที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.2

เปอร์เซ็นต์นั้น ทำให้ราชนิดนี้มีการเจริญและปริมาณผลผลิตไคตินและไคโตซานได้ไม่ดี โดยยูเรียที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม 2 มีการเจริญสูงที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญแล้วความเข้มข้นทั้งสองระดับนี้มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

อย่างไรก็ตามพบว่ายูเรียไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเพาะเลี้ยง *S. monoceras* 10-85 เนื่องจากมีการเจริญในลักษณะเพลเลท (Pellet) ขนาดใหญ่มากมีสีดำขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1-2 เซนติเมตร ประมาณ 3-4 ก้อน เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-6 วัน ก็ยังไม่เพิ่มจำนวนและมีปริมาณลดลง สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากยูเรียที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้อาหารมีความเป็นด่าง (pH =7.2-8) และราไอโซเลทนี้ไม่ทนต่อสภาวะด่าง ดังนั้นในการศึกษาจึงเลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหาร Starch broth สูตรเดิมอยู่แล้ว (0.5%) โดยนำมาแปรผันความเข้มข้น 0.25, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าราชนิดนี้มีการเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.25 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณ AIF สูงสุดไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นการลดปริมาณของ $(NH_4)_2SO_4$ จากสูตรอาหาร ซึ่งจะทำให้ลดต้นทุนของการผลิตได้ และพบว่าถ้าใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของเกลือแอมโมเนียมมีผลทำให้เกิดสภาวะเป็นกรดในอาหารจึงมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง และถ้าใช้ยูเรียจะมีผลทำให้เกิดสภาวะเป็นด่างในอาหาร ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซาน ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yoghitohlu and Mcneil (1992) โดยเลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยง *A. niger* ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสร้างกรดซิตริกและให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงเมื่อทำการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณที่เหมาะสมในช่วง 0.25-0.5 เปอร์เซ็นต์ และ Kublicek (1986) รายงานว่าปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *A. niger* เมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 19.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 100 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของไคตินและไคโตซานในผนังเซลล์และความสามารถในการผลิตไคตินและไคโตซานของราทั้งสามไอโซเลทภายใต้สภาวะที่มีแป้งและแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสม โดยพบว่ารา *A. oryzae* TISTR3018, *A. niger* 5-82 และ *S. monoceras* 10-85 มีการสะสมไคตินในผนังเซลล์ในปริมาณใกล้เคียงกัน (คิดเป็น 9.3-9.8 เปอร์เซ็นต์) ผลผลิตไคตินสูงสุดได้จาก *A. oryzae* TISTR3018 (7.62±0.23 กรัมต่อลิตร) รองลงมาได้แก่ *A. niger* 5-82 (6.57±0.66 กรัมต่อลิตร) สำหรับ *S. monoceras* 10-85 ให้ผลผลิตไคตินน้อยที่สุด (3.81±0.14 กรัมต่อลิตร) ในขณะเดียวกันพบว่า *S. monoceras* 10-85 ให้ผลผลิตไคโตซานสูงที่สุด (390.17±13.43 มิลลิกรัม

ต่อลิตร) รองลงมาได้แก่ *A. oryzae* TISTR3018 (283.17±15.61 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วน *A. niger* 5-82 ให้ผลผลิตไคโตซานน้อยที่สุด (71.67±6.83 มิลลิกรัมต่อลิตร) ดังนั้นจึงเลือก *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 ซึ่งมีปริมาณผลผลิตไคตินและไคโตซานสูงที่สุดตามลำดับมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปซึ่งเป็นการศึกษาถึงผลของธาตุอาหารรอง ได้แก่ ธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัสต่อการผลิตไคตินและไคโตซาน

ผลของแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัสต่อการเจริญและผลผลิตไคตินและไคโตซาน

ราต้องการธาตุอาหารรองในปริมาณที่พอเหมาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม เป็นแร่ธาตุรองที่ต้องการในปริมาณมาก (Macronutrient) โดยต้องการประมาณ 10^{-3} โมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ ส่วนแมงกานีสและเฟอร์รัสเป็นแร่ธาตุรองที่ต้องการในปริมาณน้อย (Micronutrient) ในการดำรงชีวิต โดยต้องการประมาณ 10^{-6} โมลาร์ หรือต่ำกว่า หากได้รับมากเกินไปจะเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ธาตุเหล่านี้มักเกิดการตกตะกอนได้ง่าย ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ได้ จึงจำเป็นต้องใช้สารคีเลต(Chelating agent) เช่น ซิเตรท เติมลงไปเพื่อเข้าจับกับอิออนอิสระของแร่ธาตุนั้นและนำไปใช้ในการเจริญต่อไป (อนุเทพ ภาสุระ, 2540) หรือราบางชนิดสร้าง Siderophore เช่น สาร Ferrichrome และ Coprogen เป็นต้น ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารคีเลตช่วยในการนำแร่ธาตุเหล่านี้เข้าสู่เซลล์ได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น แมกนีเซียมช่วยส่งเสริมการเจริญและการสังเคราะห์ไคติน โดยช่วยเร่งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Chitin synthase แมงกานีสเป็นโคแฟกเตอร์ (Cofacter) ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และยังมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Chitin synthase (Davis & Bartnicki-Garcia, 1984) และถ้าได้รับแมงกานีสความเข้มข้นสูงบางครั้งจะทำให้เกิดผลที่คาดไม่ถึง ตัวอย่างเช่น $MnSO_4$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งขบวนการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) ในไมโตรคอนเดรียของเซลล์ยีสต์ได้และที่ความเข้มข้นระดับนี้สามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสซึมและไมโตคอนเดรีย เป็นต้น ส่วนเฟอร์รัสเป็นองค์ประกอบของ Cytochrome รวมทั้งเป็นโคแฟกเตอร์ (Cofacter) ของเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการขนส่งออกซิเจน (Electron transport) (Landecker, 1996)

จากรายงานของ Barnicki-Garcia (1968) กล่าวว่าในขบวนการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานของราต้องการอิออน (2+) (Divalent cation) เช่น แมกนีเซียม (Mg^{2+}) แมงกานีส (Mn^{2+}) สังกะสี (Zn^{2+}) โคบอลต์ (Co^{2+}) และแคลเซียม (Ca^{2+}) เป็นต้น ซึ่งชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของแร่ธาตุเหล่านี้จะแตกต่างกันไปสำหรับราแต่ละชนิด โดยบทบาทสำคัญของแร่ธาตุเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Chitin synthase และ/หรือเอนไซม์ Chitin deacetylase ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานตามลำดับ และ Jaworska and Konieczna (2001)

ศึกษาผลของแร่ธาตุต่าง ๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตชีวมวล และไคโตซานของรา *Absidia orchidis* พบว่าแมงกานีสและเฟอร์รัสมีผลต่อช่วยเพิ่มผลผลิตชีวมวล ปริมาณ AIF และปริมาณไคโตซาน อย่างไรก็ตามพบว่าแมงกานีสและเฟอร์รัสมีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์ Chitin deacetylase ซึ่งมีผลทำให้ไคโตซานจากราที่เลี้ยงในอาหารที่เติมแร่ธาตุดังกล่าวนี้มีค่า Acetylation degree สูงกว่าไคโตซานที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมแร่ธาตุนี้ลงไป นอกจากนี้เฟอร์รัสยังมีผลในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ Chitin synthase ด้วย ในขณะที่แมงกานีสกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Chitin synthase เนื่องจากไคโตซานที่จากการเพาะเลี้ยงที่เติมแมงกานีสมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าไคโตซานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมแมงกานีส นอกจากนี้ Tokuyasu et al. (1996) ศึกษาผลของ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+} และ Zn^{2+} ต่อการทำงานของเอนไซม์ Chitin deacetylase พบว่า Ca^{2+} และ Mg^{2+} ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Chitin deacetylase ซึ่ง Co^{2+} ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Chitin deacetylase เพียงเล็กน้อย แต่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Chitin deacetylase ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สำหรับ Ni^{2+} และ Zn^{2+} ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Chitin deacetylase

การเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ แมงกานีสซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอร์รัสซัลเฟต 0.05-0.15 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร Starch broth มีผลในการช่วยให้การเจริญและผลผลิตไคตินและไคโตซานเพิ่มขึ้นได้ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม 2 แต่มีการเจริญที่ดีกว่าและผลิตไคตินและไคโตซานได้สูงขึ้นเมื่อเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 เปอร์เซ็นต์ จากการสังเกตอาหาร Starch broth ที่มีการเติมแมงกานีสและเฟอร์รัสจะมีการจับกลุ่มกันเป็นตะกอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ราไม่สามารถนำแร่ธาตุดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งหมดจึงมีการเจริญและให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานน้อยกว่าธาตุแมกนีเซียมที่ไม่เกิดตะกอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับบทบาทของ Mg^{2+} และ Mn^{2+} จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Chitin synthase ทำให้เกิดการรวมตัวเป็น *N*-acetylglucosamine ได้เป็นสายไคติน นอกจากนี้ Mg^{2+} และ Mn^{2+} มีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Chitin deacetylase เช่นกัน และพบว่าในอาหารที่มีการเติมเฟอร์รัสจะมีการเจริญและผลผลิตไคตินและไคโตซานน้อยที่สุดน่าจะเป็นเพราะราบางชนิดสามารถนำ Fe^{3+} ไปใช้ได้ดีกว่า Fe^{2+} หรือเป็นเพราะเฟอร์รัสมีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์ Chitin deacetylase ทำให้การสังเคราะห์ไคโตซานของรามีค่าต่ำกว่าในอาหารที่เติมแมกนีเซียมและแมงกานีส

หน้าที่ของแมกนีเซียมภายในเซลล์มีความสำคัญในการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ เช่น ATP และ ADP (มีฟอสเฟตที่มีประจุลบ) จะรวมตัวกับประจุ 2+ ได้ดี นอกจากนี้ขบวนการเมแทบอลิซึมส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายกลุ่มฟอสเฟต

ซึ่งปกติต้องการ Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ เมื่อมีการจับกับกลุ่มฟอสเฟต Mg^{2+} กับ Mn^{2+} จะส่งเสริมการเคลื่อนย้ายกลุ่มฟอสเฟตโดยกระจายประจุไปยังโมเลกุลเป้าหมายซึ่งทำให้โมเลกุลเหล่านั้นง่ายต่อการทำปฏิกิริยาต่อสารรีแอคแตนท์ (Reactant) อื่น ๆ นอกจากนี้เอนไซม์ที่เกาะกับ Mg^{2+} มักจะใช้ในการควบคุมการสร้างสารเมแทบอไลต์ได้มากกว่า แต่เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ Mn^{2+} จะช่วยให้เอนไซม์จับกับสับเสตรทได้ดีขึ้น ดังนั้นความเข้มข้นของ Mg^{2+} กับ Mn^{2+} จะเป็นตัวตัดสินว่าเอนไซม์จะทำงานในรูปแบบใดในวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle) นอกจากนี้ในรามีเอนไซม์ที่ต้องการใช้ Mg^{2+} ในการทำปฏิกิริยา เช่น Phosphofructokinase, DNA polymerase, Glutamine synthase, Chitin synthase และ Cellulase เป็นต้น แมกนีเซียมมีผลต่อหน้าที่และโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน เช่น *Neurospora crassa* ต้องการ Mg^{2+} ในการสังเคราะห์เยื่อหุ้มที่มี Glycoprotein เป็นองค์ประกอบและยังช่วยให้การสร้างเยื่อหุ้มเซลล์มีความคงที่มากขึ้นทำให้โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบยึดติดกันได้ดีขึ้น รวมถึงแมกนีเซียมยังเกี่ยวข้องในส่วนการแบ่งเซลล์เป็นขบวนการที่สำคัญในวงจรของรา (Michael, 1984) และบางทีแมงกานีสส่งผลทางอ้อมกับปฏิกิริยาของเอนไซม์บางชนิด เช่น *Aspergillus nidulans* ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมแมงกานีสลงไป ซึ่งพบว่าเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายผนังเซลล์มีคุณสมบัติการทำงานได้ต่ำลง (Michael, 1984)

การเจริญของราเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานที่มีอยู่ในผนังเซลล์พบว่าในช่วงวันที่ 3-4 ของการเพาะเลี้ยง โดย *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 มีการสะสมไคตินสูงสุดประมาณใกล้เคียงกัน (93-97 และ 95-97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม 2 (92-94 และ 92-95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และองค์ประกอบไคโตซานในผนังเซลล์ของราทั้งสองไอโซเลทมีค่าสูงสุดประมาณใกล้เคียงกัน (3.0-3.8 และ 9-10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม 2 (3.5-3.6 และ 9.3-9.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.01-0.05 เปอร์เซ็นต์ มีผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับที่พบในอาหารที่เติมแมงกานีสซัลเฟต 0.05-0.25 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอร์รัสซัลเฟต 0.05-0.25 เปอร์เซ็นต์

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญที่ดีกว่าและผลิตไคตินและไคโตซานได้สูงขึ้นเมื่อมีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร Starch broth ที่มีการปรับปรุงปริมาณแป้งโดยใช้ความเข้มข้น 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปรับปรุงปริมาณยูเรียและ $(NH_4)_2SO_4$ เป็น 0.5 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุงและสูตรเดิม

A. oryzae TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญและผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุง โดยราทั้งสองไอโซเลทนี้เจริญและให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ซึ่งอยู่ในระยะท้ายของ Exponential phase ถึงช่วงต้นของ Stationary phase) กล่าวคือ *A. oryzae* TISTR3018 ในอาหารสูตรปรับปรุงให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานที่สูง (7.98±0.15 กรัมต่อลิตร และ 313.01±12.77 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าอาหารสูตรเดิม (2.19±0.15 กรัมต่อลิตร และ 94.33±10.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน และ *S. monoceras* 10-85 ให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานที่สูงในสูตรปรับปรุง (5.08±0.07 กรัมต่อลิตร และ 557.75±10.18 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) สูงกว่าอาหารสูตรเดิม (2.02±0.01 กรัมต่อลิตร และ 194.67±9.75 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ซึ่งราทั้งสองไอโซเลทให้ผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุงสูงกว่าสูตรเดิมประมาณ 2-4 เท่า และใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่า โดยการเพิ่มขึ้นของผลผลิตไคตินและไคโตซานนั้นมาจากการเพิ่มขึ้นของการเจริญและองค์ประกอบของไคตินและไคโตซานที่ผนังเซลล์

ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อผลผลิตของไคตินและไคโตซานคือระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (Crestini et al., 1996) สอดคล้องกับรายงานของ Tan et al. (1996) ซึ่งศึกษาระยะเวลาการเก็บเกี่ยวราในแต่ละสายพันธุ์ได้แก่ *Absidia glauca*, *Cunninghamella echinulata*, *Grongonella* sp., *Mucor* sp. และ *Zygorhynchus moelleri* เป็นต้น และพบว่าให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานสูงในช่วง Exponential phase หลังจากนั้นผลผลิตไคโตซานที่ได้ลดลง ซึ่งการสกัดไคโตซานจากรามักทำการสกัดในช่วง Exponential phase เป็นระยะที่มีอัตราการสังเคราะห์โมเลกุลไคโตซานดีที่สุดเนื่องจากในช่วง Exponential phase การเจริญของราอยู่ในช่วงแอคทีฟมีปริมาณไคโตซานอิสระค่อนข้างสูง และเมื่อเข้าสู่ระยะ Stationary phase ไคโตซานจะไปจับกับไคตินและพอลิแซคคาไรด์อื่น ๆ ทำให้สกัดไคโตซานออกมาได้ยากขึ้น ซึ่งรามีอัตราการเจริญแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสรีรวิทยาของรา และเวลาที่เข้าสู่ระยะ Late exponential phase ก็แตกต่างกันด้วย และเมื่อมีการเพาะเลี้ยงรานานเกินไปจะมีผลทำให้ผลผลิตของไคโตซานลดลงอย่างช้า ๆ เนื่องจากรามีอายุมากขึ้น ปริมาณไคตินและไคโตซานที่เคยสะสมอยู่ตามผนังเซลล์จะถูกย่อยสลายเพื่อนำพลังงานและสารอาหารที่ได้ไปสังเคราะห์เป็นเส้นใยต่อไป (Davoust & Persson, 1992)

ไคโตซานได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากไคโตซานมีประโยชน์อย่างมากมายและเปรียบเทียบการผลิตไคตินและไคโตซานของราในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุง พบว่า

A. oryzae TISTR3018 มีปริมาณไคตินที่สูงซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไคโตซานโดยมีปริมาณผลผลิตไคโตซาน (313.01±12.77 มิลลิกรัมต่อลิตร) และ *S. monoceras* 10-85 ให้ผลิตผลไคโตซานได้สูง 557.75±10.18 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่า *S. monoceras* 10-85 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Ascomycota กลับพบปริมาณไคโตซานสูงซึ่งในธรรมชาติจะพบปริมาณไคโตซานสูงในผนังเซลล์ของราในกลุ่ม Zygomycota น่าจะเป็นเพราะ *S. monoceras* 10-85 มีการสร้าง Macroconidia เป็นแบบหลายเซลล์ (Multi-cellular) ซึ่งมีปริมาณไคตินหรือไคโตซานที่สูงในโครงสร้างนี้ โดยพบว่าราแต่ละสายพันธุ์นั้นมีการสะสมไคตินหรือไคโตซานได้ในโครงสร้างที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไคตินและไคโตซานที่ได้จากราทั้งสองไอโซเลทนี้มีปริมาณใกล้เคียงกับหลายงานวิจัย ตัวอย่างเช่น ราในกลุ่ม Zygomycetes ที่เจริญในอาหารเหลวสามารถผลิตไคโตซานได้ในช่วง 100-465 มิลลิกรัมต่อลิตร (Tan et al., 1996) และรากลุ่ม Mucorales มีไคโตซานเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ รากลุ่มนี้สามารถเจริญในแหล่งอาหารราคาถูกและสามารถแยกไคโตซานจากผนังเซลล์ได้ง่ายโดยวิธีทางเคมี รายงานการวิจัยของ Shimahara et al. (1989) ซึ่งศึกษาปริมาณไคโตซานในรา Mucoraceae จำนวน 125 สายพันธุ์ พบว่ามีปริมาณไคโตซานเท่ากับ 95-900 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนไคโตซานในราจำพวก *Rhizopus* จำนวน 32 สายพันธุ์ มีปริมาณไคโตซาน 330-645 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Chatterjee et al. (2004) รายงานว่า *Mucor rouxii* เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ Molasses salt medium, Potato dextrose broth และ Yeast extract peptone glucose สามารถผลิตไคโตซานได้ 610, 510 และ 560 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และรา *Absidia glauca*(+) มีปริมาณไคโตซาน 646 มิลลิกรัมต่อลิตร (Hu et al., 2004) จากรายงานของ Suwannachart and Pichyangkura (1996) นำ *A. niger* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการผลิตกรดซิตริกในระดับอุตสาหกรรม เลี้ยงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส (Cassava starch hydrolysate) ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ปริมาณไคติน 13.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (75.34 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเส้นใยแห้ง) ในการศึกษาของ Jawarska and Konieczna (2001) ซึ่งเพาะเลี้ยง *Absidia orchidis* บนอาหาร Yeast peptone glucose (YPG) ที่เติมแมงกานีส 1.13 กรัมต่อลิตร หรือเฟอร์รัส 1 กรัมต่อลิตร พบว่าราชนิดนี้ให้ ผลผลิตไคโตซาน 1.05 และ 1.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และการศึกษาของ Pochanavanich and Suntornsuk (2002) ซึ่งเพาะเลี้ยง *A. niger* TISTR3245, *Rhizopus oryzae* TISTR3189, *Zygosaccharomyces rouxii*TISTR5058 และ *Candida albican* TISTR5239 บนกากถั่วเหลืองและกากถั่วเขียวพบว่า *R. oryzae* TISTR3189 ให้ผลผลิตไคโตซานสูงสุดคือ 4.3 กรัมต่อกิโลกรัมของสับเสตรทเมื่อเพาะเลี้ยงบนกากถั่วเหลือง และ 1.6 กรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเพาะเลี้ยงบนกากถั่วเขียว นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Yokoi et al. (1998) นำรา *Absidia atrospora* IFO9471, *Gongronella butleri* IFO8080 และ *G. butleri* IFO8081 มาเลี้ยงใน Barley-buckwheat-

shochu distillery wastewater (BBS medium) และ Sweet potato-*shochu* (SPS medium) ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมพบว่า *G. butleri* IFO8081 ให้ผลผลิตไคโตซานสูงสุดเมื่อเลี้ยงใน SPS medium คือ 730 มิลลิกรัมต่อลิตร

จะเห็นได้ว่าการผลิตไคโตซานจากราได้ให้ผลผลิตที่แตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ราที่นำมาศึกษา ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะในการเลี้ยงเชื้อ (pH อุณหภูมิ การเขย่าและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น) และวิธีในการเพาะเลี้ยง (Shaking culture, Batch culture, Continuous culture และ Solid-state culture เป็นต้น) (Pochanavanich & Suntornsuk, 2002) ซึ่ง *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 สามารถผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีที่สุดตามลำดับ ซึ่งราทั้งสองไอโซเลทให้ปริมาณไคติน 97 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักผนังเซลล์แห้ง และให้ปริมาณไคโตซาน 3.8 และ 10.7 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักผนังเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไคตินและไคโตซานที่ได้จากเปลือกกุ้งซึ่งให้ผลผลิตไคติน 15-20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Lertsutthiwong et al., 2002) และปริมาณไคโตซาน 1.12-1.63 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง (Bhuwaphthpun, 1996) และไคโตซานที่ได้จากราและเปลือกกุ้งและเปลือกปูมีข้อได้เปรียบแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 5-1 อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาศักยภาพของราทั้งสองไอโซเลทนี้ในรายละเอียดให้มากกว่านี้สำหรับการเพิ่มผลผลิตของไคตินและไคโตซาน ของราควรมีการกระตุ้นให้มีการผลิตชีวมวลหรือทำให้เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซาน เช่น Chitin synthase และ Chitin deacetylase

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 5-1 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของไคโตซานที่ได้จากราและจากเปลือกกุ้งเปลือกปู

แหล่งไคโตซาน	ข้อดี	ข้อเสีย
รา	1) มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วและสูง สามารถให้ผลผลิตได้ปริมาณมากในเวลาอันสั้น 2) สามารถเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมได้ 3) สามารถควบคุมคุณภาพและคุณสมบัติของไคโตซานให้มีความสม่ำเสมอ 4) ราบางชนิดมีไคโตซานสามารถผลิตได้โดยตรง 5) หากเพาะเลี้ยงในธาตุอาหารราคาถูกเหมาะต่อการเลี้ยงรา คาดว่าต้นทุนในการผลิตไคโตซานเชิงการค้าน่าจะลดลง	1) การเพาะเลี้ยงอาจมีการปนเปื้อนได้ 2) อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
เปลือกกุ้งและเปลือกปู	ช่วยลดปริมาณของเหลือทิ้งเป็นแนวทางหนึ่งที่ช่วยรักษาสิ่งแวดล้อมได้	1) ผลผลิตขึ้นอยู่กับฤดูกาลอาจเกิดการขาดแคลนได้ในอนาคตและมีราคาสูง 2) ไม่สามารถควบคุมคุณสมบัติของผลผลิตไคตินและไคโตซานได้ 3) ต้องใช้สภาวะที่รุนแรงในการเปลี่ยนไคตินให้เป็นไคโตซานก่อปัญหาด่างเหลือทิ้งที่เป็นอันตรายและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม 4) การใช้สารละลายด่างเข้มข้นจะเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ทำให้คุณสมบัติของไคโตซานลดลง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แนวทางในการนำผลการศึกษาไปประยุกต์ใช้

1. จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ารา *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีตามลำดับ สามารถนำไปขยายขนาดการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตไคตินและไคโตซานได้ อย่างไรก็ตามสิ่งที่ควรคำนึงถึงคือต้นทุนการผลิต

2. หากต้องการผลิตไคตินควรใช้ *A. oryzae* TISTR3018 ซึ่งผลิตไคตินได้สูง โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch medium ที่มีองค์ประกอบดังนี้

แป้ง (Soluble starch)	8	เปอร์เซ็นต์
ยูเรีย	0.5	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.025	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์	0.4	เปอร์เซ็นต์

3. หากต้องการผลิตไคโตซานควรใช้ *S. monoceras* 10-85 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตไคโตซานได้สูง โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch medium ที่มีองค์ประกอบดังนี้

แป้ง (Soluble starch)	6	เปอร์เซ็นต์
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.25	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.025	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	เปอร์เซ็นต์
สารสกัดจากยีสต์	0.4	เปอร์เซ็นต์

4. เนื่องจาก *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 เป็นราที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะเพาะเลี้ยงโดยใช้สับเสตรทเป็นวัสดุเหลือทิ้งประเภทแป้งชนิดต่าง ๆ (Solid state fermentation) ซึ่งหากทำในลักษณะนี้จะช่วยลดต้นทุนการผลิตทั้งในด้านวัตถุดิบและขบวนการเพาะเลี้ยง การนำวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ช่วยลดปริมาณวัสดุเหลือทิ้งดังกล่าวซึ่งในประเทศไทยมีอยู่ในปริมาณมาก รามีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุดังกล่าวเพื่อนำมาใช้ในการเจริญได้เป็นชีวมวลซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวและนำไปสกัดไคตินและไคโตซานซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาชนิดขององค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไคตินและไคโตซานในราเพิ่มเติม เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตเจน ธาตุอาหารชนิดต่าง ๆ ผลของอุณหภูมิ ผลของความเร็วรอบของการเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต้น

2. ควรมีการนำวัสดุเหลือทิ้งอื่น ๆ เช่น กากมันสำปะหลังมาใช้เป็นสับเสตรทในการเลี้ยงรา เพื่อเป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิตไคตินและไคโตซานจากราต่อไปในอนาคต

3. ควรมีการศึกษาศักยภาพของราสำหรับการเพิ่มผลผลิตของไคตินและไคโตซานและให้มีการผลิตชีวมวลหรือทำให้เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซาน เช่น Chitin synthase และ Chitin deacetylase

4. ควรศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของไคตินและไคโตซานที่ผลิตจากรา เช่น % AD, %DD และน้ำหนักโมเลกุล เป็นต้น

5. ควรศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสลายแป้งของรา *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 ซึ่งจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้นและใช้สับเสตรทให้เกิดประโยชน์สูงสุด กล่าวคือในการเพาะเลี้ยงราได้ทั้งผลผลิตของเอนไซม์และสามารถนำชีวมวลมาใช้ในการผลิตไคตินและไคโตซานได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University