บทที่ 2

ทฤษฎีและเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ส้ม (*Citrus* spp.)

ส้มเป็นผลไม้เศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่นิยมปลูกในประเทศไทย ซึ่งสายพันธุ์ของส้มที่ปลูกได้แก่ ส้มเกลี้ยง ส้มจุก ส้มตรา ส้มโอ และส้มเขียวหวาน โดยส้มเขียวหวานเป็นส้มที่ได้รับความนิยมในการบริโภค สามารถซื้อได้ตลอดทั้งปี และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเป็นผลไม้ที่เกษตรกรนิยมปลูกเป็นอาชีพหลัก โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคเหนือและใต้ และในปัจจุบันส้มเขียวหวานซึ่งได้รับความนิยมในการปลูกและบริโภคกันมากคือ ส้มสายน้ำผึ้งหรือส้มโชกุน

ส้มโชกุน

ส้มโชกุนมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Citrus reticulata* blanco cv. Shogun จัดอยู่ในกลุ่มส้มแมนดาริน (Mandarins หรือ Tangerines) (อิสริยาภรณ์, 2550) ซึ่งเป็นส้มเขียวหวานที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างส้มเขียวหวานธรรมดากับส้มจีนพันธุ์บิกกา ส้มโชกุนมีลักษณะพิเศษคือ มีรสหวานเข้ม ไม่มีกาก กลิ่นหอมคล้ายส้มจีน ผลส้มมีทรงกลมแป้นเล็กน้อย ส่วนสูงจะสั้นกว่าส่วนกว้าง ผลส้มขนาดกลางสูงประมาณ 5.9 เซนติเมตร และกว้าง 6.8 เซนติเมตร ส่วนผลที่มีขนาดโตจะสูงประมาณ 6.5 เซนติเมตร กว้าง 7.5 เซนติเมตร ด้านปลายผลราบเป็นแอ่งตื้นๆ ฐานผลส่วนใหญ่มน ผิวผลเรียบ มีตุ่มน้ำมันเกิดถี่เต็มผิวผล ผิวผลแก่จัดมีสีเขียวอมเหลือง เปลือกบางล่อน ปอกง่าย กลีบแยกจากกันได้ง่าย มีกลีบประมาณ 11 กลีบต่อผล ผนังกลีบบางมีรกน้อย ฉ่ำน้ำ เนื้อผลสีส้มแดง เมล็ดมีน้อยไม่เกิน 12 เมล็ดต่อผล (สำนักงานเกษตรยะลา, 2550) ดังรูปที่ 2.1 ส้มโชกุนเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีชื่อเสียงของจังหวัดยะลาและสามารถทำรายได้ให้กับเกษตรกรเจ้าของสวนมากกว่าไม้ผลชนิดอื่นๆ โดยจากบทความวิทยุที่ได้จากการสัมภาษณ์เจ้าของสวนส้มศรีเจริญโดยดวงจันทร์ (2543) กล่าวว่า สวนส้มโชกุนที่ให้ผลผลิตเต็มที่สามารถทำรายได้ต่อไร่ต่อปีเมื่อหักค่าใช้จ่ายแล้วไม่ต่ำกว่า 100,000 บาทต่อไร่ และราคาเฉลี่ยจากสวนของส้มโชกุนราคากิโลกรัมละ 50-60 บาท ดังนั้นในปัจจุบันจึงทำให้เกษตรกรในพื้นที่จังหวัดใกล้เคียงมีการขยายพื้นที่ปลูกส้มโชกุนกันมากขึ้น จากรายงานของอิสริยาภรณ์ (2550) ส้มเขียวหวานและส้มโชกุนมีพื้นที่ปลูกรวมกันทั่วประเทศในปี พ.ศ. 2544 ประมาณ 376,000 ไร่ และในปี พ.ศ. 2548 จังหวัดยะลามีพื้นที่ปลูกส้มโชกุนประมาณ 7,097 ไร่ พื้นที่ให้ผลผลิต 4,088 ไร่ ให้ผลผลิตรวม 10,532.9 ตัน ในปี พ.ศ. 2547 ให้ผลผลิตรวม 9,074 ตัน คิดเป็นมูลค่า 401,276,248 บาท เดิมส้มโชกุนเป็นพันธุ์ที่มาจากประเทศจีน โดยคนจีนนำมาให้เจ้าของสวนส้มในอำเภอเบตง จังหวัดยะลา ทดลองปลูกและตั้งชื่อส้มนี้ว่า “โชกุน” เมื่อผลผลิตออกมาแล้ววางจำหน่าย จึงเป็นที่ต้องการของตลาดมาก ต่อมาจึงได้มีการปลูกกันแพร่หลายในภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออก การเรียกชื่อและลักษณะของส้มโชกุน

ในแต่ละพื้นที่แตกต่างกัน ได้แก่ ภาคเหนือ เรียกว่า ส้มสายน้ำผึ้ง เพราะลักษณะผิวของส้มมีสีเหลือง เนื่องจากมีอากาศเย็น และปริมาณฝนน้อย ส่วนในภาคใต้ เรียกว่า ส้มโชกุน หรือบางพื้นที่ เช่น จังหวัดสงขลา เรียกว่า ส้มเพชรยะลา โดยลักษณะของส้มมีผิวสีเขียว เพราะฝนตกชุก (เอกชัย และส่งสุข, 2547)

รูปที่ 2.1 ลักษณะผลส้มโชกุน

ส้มโชกุนเป็นพืชที่มีรากอ่อนแอ ไม่ทนต่อน้ำท่วม การแตกรากใหม่จะช้า รากส่วนมากอยู่ต้นๆ ใกล้ผิวดิน จึงส่งผลให้ได้รับอันตรายจากการพรวนดิน ดายหญ้า และสารเคมีได้ง่าย และเป็นพืชที่ไม่ทนแล้ง ถ้าหากขาดน้ำเกิน 1 เดือน ต้นส้มจะโทรมและตาย นอกจากนี้ยังมีโรคอีกมากมายที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ต้นส้ม ได้แก่ โรครากเน่าและโคนเน่า โรคเมลาโนส โรคราสีชมพู โรคสแค็บ (โรคสะเก็ด) ราสีดำ ราสีน้ำตาล ราสีแดง โรคแคงเกอร์ โรคทริสเตซ่า โรคกรีนนิ่ง โรคสาหร่าย เป็นต้น และยังมีสาเหตุจากศัตรูพืชที่เข้าทำลายอีก เช่น หนอนชอนใบ เพลี้ย แมลง เป็นต้น (เอกชัย และส่งสุข, 2547)

2.2 โรครากเน่าและโคนเน่า

โรครากเน่าและโคนเน่าของต้นส้มเกิดจากเชื้อ *Phytophthora* ได้แก่ *P. parasitica* พบระบาดทั่วไป *P. citrophthora* พบระบาดในที่เย็น และ *P. palmivora* พบระบาดในเขตร้อน (วิโรจน์ และคณะ, 2553) และโรครากเน่าและโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *P. parasitica* นอกจากพบได้ทั่วไปในประเทศไทยแล้ว โรคนี้ยังก่อให้เกิดความเสียแก่ส้มเขียวหวานมากที่สุดโรคหนึ่ง โดยเชื้อราจะเข้าทำลายได้ทางรากฝอย รากแขนง โคนต้น และบริเวณกิ่งใหญ่ๆใกล้โคนต้น (อำไพวรรณ และคณะ, 2527) และแพร่ระบาดได้ดีในดินที่มีน้ำขัง (วิโรจน์ และคณะ, 2553) ลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้นเมื่อถูกเชื้อเข้าทำลายดังรูปที่ 2.2 คือ ลำต้นระดับโคนมีลักษณะเป็นจุดฉ่ำน้ำ มียางไหลซึมสีครีมหรือน้ำตาล เนื้อไม้บริเวณที่เป็นโรคเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ส่วนรากถูกทำลายมากๆ รากจะเน่าเป็นสีน้ำตาลแดง หรืออมส้ม เหนียว ไม่ยุ่ย ระยะนี้ต้นส้มแสดงอาการใบเหลืองลู่ลง ใบร่วงมาก กิ่งตาย และเมื่อโคนเน่ารอบต้นก็จะยืนแห้งตาย ต้องโค่นทิ้ง ในสภาพที่มีฝนตกชุก ลมฝนแรง หรือเขตมรสุม เชื้อราจะถูกพัดพาไปทำลายดอก ใบ และผลส้ม ทำให้ดอกส้มเน่าสีน้ำตาลเหี่ยวแห้งตาย ใบส้มจะเป็นจุดกลมสีน้ำตาลเนื้อเยื่อเน่าลุกลามทำให้ใบ

ร่วง และผลส้มจะเน่าเป็นจุดสีน้ำตาล แผลลุกลามขยายวงกว้าง ผลร่วงหล่นมาก และพบเชื้อราสร้างสปอร์เป็นคราบขาวที่ผลส้มบนพื้นดิน และส่งผลให้ผลส้มเป็นโรคเน่าหลังเก็บเกี่ยวเนื่องจากโรคนี้ด้วย (วิโรจน์ และคณะ, 2553)

รูปที่ 2.2 ลักษณะโคน กิ่ง ราก และต้นส้มเขียวหวานที่เป็นโรครากเน่าและโคนเน่าจากการที่ถูกเชื้อ *Phytophthora parasitica* เข้าทำลาย (วิโรจน์ และคณะ, 2553)

2.3 เชื้อ *Phytophthora parasitica*

เชื้อ *Phytophthora parasitica* เป็นเชื้อในกลุ่ม Oomycetes อาศัยอยู่ได้ทั้งในดินและน้ำ สามารถแพร่ระบาดได้อย่างกว้างขวางโดยติดไปกับดินปลูกและน้ำที่ใช้รดต้นส้ม

การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อมีดังนี้

Kingdom : Chromalveolata

Phylum : Heterokontophyta

Class : Oomycetes

Order : Peronosporales

Family : Pythiaceae

Genus : *Phytophthora*

Species : *parasitica*

ลักษณะรูปร่างของเชื้อรา *P. parasitica* เจริญบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เป็นลักษณะโคโลนีแบบ stoloniferous ซึ่งคล้ายกับการชักใยแมงมุม เส้นใย (mycelium) โป่งพอง รูปร่าง chlamydospore เป็นแบบทรงกลม ผนังหนามีขนาดเฉลี่ย 33 ไมโครเมตร sporangium มี papilla เห็นชัดเจน รูปร่าง sporangium เป็นแบบลูกมะนาว ลูกแพร์ หรือทรงกลม ซึ่งมีขนาดความยาว 14-17 ไมโครเมตร และความกว้าง 12-60 ไมโครเมตร สัดส่วนความยาวต่อความกว้างเท่ากับ 1:3 ก้านชู sporangium (sporangiophore) ไม่แตกแขนง (unbranched) sporangium ไม่หลุดจาก sporangiophore

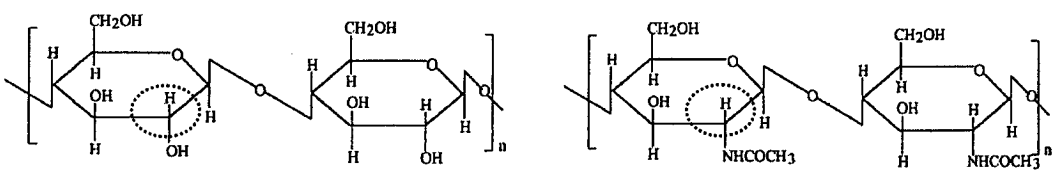
ได้ง่าย รอยต่อของ sporangium กับ sporangiophore เรียกว่า pedicel สั้นมาก และไม่สามารถสร้าง oospore ใน thallus ของตัวเองได้ ซึ่งเรียกว่า aplerotic oospore (รังสี, 2553)

การควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าของส้มเขียวหวานที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Phytophthora parasitica* ในปัจจุบันนิยมใช้สารเคมีชนิดดูดซึม เช่น metalaxyl และ fosetyl-A ฉีดพ่นให้ทั่วทั้งต้นหรือรดดินบริเวณใต้ทรงพุ่ม หรือขูดแผลแล้วทาสารเคมี หรือราดด้วยสาร metalaxyl fosethyl เบทาแล็คซิล 5 จี ออกซ่าไดซิล aluminum และสารประกอบที่มีทองแดง (copper oxychloride) เป็นส่วนผสม (นพรัตน์, 2525) นอกจากนี้เกษตรกรยังใช้สารอื่น เช่น นิวโปร-ฟีซีน คาร์บาริล ไดเมทโธเอท ฟลูเฟนนอกซูรอน และอีมิคาโคนปลิด วิธีการนี้เป็นการแก้ปัญหาเฉพาะหน้า ถึงแม้จะช่วยลดความเสียหายได้ในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ยังพบเห็นการระบาดของโรคนี้อยู่ และมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมีการประยุกต์ใช้สิ่งมีชีวิตมายับยั้งเชื้อก่อโรคนี้ และอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจคือการใช้สารชีวภาพที่ได้จากเศษเหลือทิ้งของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมอาหาร และมีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อราและชักนำให้เกิดกระบวนการป้องกันตนเองของพืชมาประยุกต์ใช้เพื่อยับยั้งเชื้อราดังกล่าว นั่นคือ การใช้ไคตินและไคโตซาน

2.4 ไคตินและไคโตซาน

1) โครงสร้างและสมบัติทางเคมี

ไคติน มีชื่อทางเคมีว่า Poly [β-(1➔ 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose] เป็นสารชีวภาพที่มีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลสแต่จะต่างกันที่ตำแหน่ง C-2 โดยเซลลูโลสจะประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล ส่วนไคตินจะประกอบด้วยหมู่อะซิทามิโด (acetamido group) ดังรูปที่ 2.3 ไคตินไม่สามารถละลายในตัวทำละลายทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้ว ไคตินพบได้ทั่วไปในผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เห็ด รา รวมทั้งเปลือกของแมลงและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังประเภทมีข้อและปล้อง อาทิ กุ้ง ปู และแกนปลาหมึก ไคตินถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคติเนส (Majeti and Kumar, 2000)

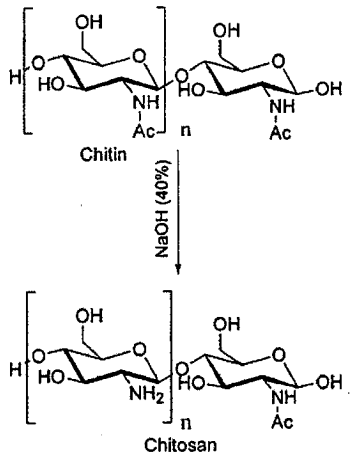


ก. ข.

รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส (ก.) และไคติน (ข.)

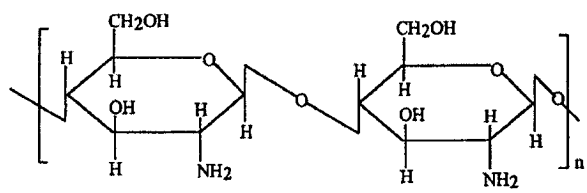
ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่เกิดจากการแยกหมู่อะซิติลออกจากไคติน มีชื่อทางเคมีว่า poly [β-(1➔4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] ที่พบในธรรมชาติของเปลือกสัตว์พวกครัสตาเซียน เกิดเป็นสารที่มีโครงสร้างซึ่งสามารถรับประจุบวกบนหมู่อะมิโนอิสระดังรูปที่ 2.5 และสามารถละลายได้ในสารละลายที่มีพีเอชน้อยกว่า 5.5 (ไพรัตน์ และคณะ, 2536) ไคโตซานประกอบด้วยกลูโคซามีน

มากกว่า 5,000 หน่วยย่อย เตรียมได้จากไคตินโดยผ่านกระบวนการกำจัดหมู่อะซิติลด้วยด่าง (NaOH 40-50%) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การเตรียมไคโตซานจากไคติน (Rabea *et al.*, 2003)

ไคโตซานเป็นสารที่ไม่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายทุกชนิด แต่ละลายได้ในกรดอินทรีย์เจือจาง เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดซัคซินิค กรดแลกติค และกรดมาลิค ดังนั้นการใช้ไคโตซานจึงมีข้อจำกัด เพราะว่าไม่สามารถละลายในน้ำได้ มีความหนืดสูง และจับกับโปรตีนได้ที่พีเอชสูง (Rabea *et al.*, 2003)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซาน ((Majeti and Kumar, 2000)

ไคโตซานมีการนำไปใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (โลชั่น ผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม ครีมบำรุงผิวหน้าและร่างกาย) อุตสาหกรรมอาหาร (สารเคลือบผิว สารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านจุลินทรีย์) เทคโนโลยีชีวภาพ (ตัวดักจับโลหะหนัก อิมัลซิไฟเออร์) อุสาหกรรมด้านเภสัชกรรมและทางการแพทย์ (เส้นใย ตัวขนส่งยา เมมเบรน และอวัยวะเทียม) และด้านเกษตรกรรม (สารปรับปรุงดิน ฟิล์ม สารฆ่าเชื้อรา และอิลิซิเตอร์) เป็นต้น (Bautista-Banos *et al.*, 2006)

2) การประยุกต์ใช้ไคตินและไคโตซานในด้านเกษตรกรรม

2.1) การประยุกต์ใช้ไคติน

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ของ N-acetyloglucosamine ซึ่งต่อกันด้วยพันธะ glycoside β-1, 4 ไคตินเป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกของสิ่งมีชีวิตกลุ่มอาร์โทพอด ผนังเซลล์ของเชื้อ

ราและยีสต์ (Donderski and Brzezinska, 2003) ด้วยองค์ประกอบของไคตินจึงทำให้เป็นแหล่งของไนโตรเจนและคาร์บอนแก่สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นได้เป็นอย่างดี เช่น แพลงก์ตอนและแบคทีเรียในทะเล (Donderski and Brzezinska, 2003) แอคทิโนไมซิส และไคติโนไลติกแบคทีเรียในดิน (Abd-El-Kareem *et al.*, 2006) ด้วยโครงสร้างของไคตินทำให้ไคตินไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้โดยตรงสอดคล้องกับงานวิจัยของ El-Kareem *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของไคตินต่อการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* และ *Sclerotium rolfsii* บนอาหาร PDA ที่มีไคติน 0, 2, 4 และ 6 g/L ที่อุณหภูมิ 25±2 °C เป็นเวลา 10 วัน พบว่า ไคตินทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิด

จากผลงานวิจัยในห้องปฏิบัติการข้างต้นแสดงให้เห็นว่าไคตินไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้โดยตรง แต่เมื่อนำไคตินมาผสมกับดินปลูกพืช ส่งผลให้ไคตินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดังรายงานวิจัยของ El-Kareem *et al.* (2006) และ El-Mougy *et al.* (2006) ดังนี้

ในปี 2006 El-Kareem *et al.* ได้ทำการศึกษาโดยผสมไคตินหรือไคโตซานปริมาณ 0, 2, 4 และ 6 g ต่อ ดิน 1 kg และไคตินร่วมกับไคโตซานปริมาณอย่างละ 6 g ต่อ ดิน 1 kg แล้ววิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การลดลงของจำนวนเชื้อรา การเพิ่มขึ้นของจำนวน actinomycetes และ chitinolytic bacteria ในดิน และการเพิ่มขึ้นของแอคติวิตี้ของเอนไซไซม์ไคติเนสในต้นมะเขือเทศ พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 45 วัน ชุดทดสอบที่มีทั้งไคตินและไคโตซานสามารถลดจำนวนของเชื้อรา *R. solani*, *F. solani* และ *S. rolfsii* ได้สูงที่สุดเท่ากับ 80, 80 และ 70% และชุดทดสอบที่มีเฉพาะไคติน 6 g ต่อ ดิน 1 kg สามารถลดจำนวนของเชื้อทั้งสามชนิดเท่ากับ 63, 63 และ 55% ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ไม่ค่อยแตกต่างกันกับชุดทดสอบที่มีเฉพาะไคโตซาน 6 g ต่อ ดิน 1 kg มาก ยกเว้นการลดลงของเชื้อ *S. rolfsii* เท่ากับ 65, 68 และ 63% ตามลำดับ สำหรับผลของไคตินและไคโตซานต่อการเพิ่มขึ้น ของจำนวน actinomycetes โดยเพิ่มขึ้นสูงสุดเพียง 2% ในชุดที่มีไคติน 4 และ 6 g ต่อ ดิน 1 kg ไคโตซาน 2 g ต่อดิน 1 kg และชุดที่มีทั้งไคตินและไคโตซาน แต่พบว่าชุดที่มีไคติน 2, 4 และ 6 g ต่อ ดิน 1 kg มีผลให้จำนวน chitinolytic bacteria เพิ่มขึ้น 43, 62 และ 66% และ ตามลำดับ และชุดที่มีทั้งไคตินและไคโตซานเพิ่มขึ้น 60% ขณะที่ชุดที่มีไคโตซานจำนวนของ chitinolytic bacteria เพิ่มขึ้นเพียง 12, 20 และ 19% เท่านั้น ขณะเดียวกันไคตินก็สามารถชักนำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไคติเนสเพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกับไคโตซาน และชุดที่มีทั้งไคตินและไคโตซาน โดยไคตินและไคโตซาน 6 g ต่อ ดิน 1 kg แอคติวิตี้เพิ่มขึ้น 100 และ 120% ส่วนชุดที่มีทั้งไคตินและไคโตซานเพิ่มขึ้น 152%

จากผลการศึกษาเห็นได้ว่าไคตินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคได้ โดยสิ่งมีชีวิตกลุ่มที่สามารถสลายไคตินเพื่อใช้คาร์บอนและไนโตรเจนเป็นอาหารคือ Chitinolytic bacteria (El-Kareem *et al.*, 2006) หรือเอนไซม์ที่พืชผลิตขึ้นมีคุณสมบัติสลายไคตินได้คือ เอนไซม์ไคติเนส (EC 3.2.1.114) และ β-N-acetylohexaminidases (EC 3.2.1.52) (Donderski and Brzezinska, 2003) เมื่อไคตินถูกสลายเกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ได้แก่ กลูโคซามีน กรดอะซีติก และแอมโมเนียขึ้น (Donderski and Brzezinska,

2003) โดยแอมโมเนียที่เกิดขึ้นเป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อราส่งผลให้ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ขณะเดียวกันจำนวนของ Chitinolytic bacteria ก็เพิ่มขึ้น (El-Kareem *et al.*, 2006) นอกจากไคตินยังมีผลทางอ้อมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคแล้ว จากรายงานของ El-Mougy *et al.* (2006) ไคตินยังช่วยส่งเสริมให้ผลผลิตของต้นมะเขือเทศเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับสารใดและต้นที่ได้รับสารฆ่าเชื้อรา Rhizolex-T อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกลไกของไคตินในการยับยั้งเชื้อราก่อโรคยังมีอยู่น้อย แต่ถึงอย่างไรจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาก็ทำให้เห็นว่าสามารถนำไคตินมาประยุกต์ใช้ในทางเกษตรได้ อีกทั้งไคตินก็เป็นเศษวัตถุดิบในอุสาหกรรมอาหารทะเลสามารถนำมาใช้ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการทางเคมีจึงทำให้ต้นทุนไม่สูง จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำไคตินมาประยุกต์ใช้ในทางเกษตรกรรมต่อไป

2.2) การประยุกต์ใช้ไคโตซาน

การประยุกต์ใช้ไคโตซานในด้านการเกษตรมีมากมาย แต่ในรายงานวิจัยนี้ขอนำเสนอเฉพาะส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย ได้แก่

1) การยับยั้งเชื้อรา

ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้โดยตรง โดยไคโตซานมีผลให้โครงสร้างของเชื้อเปลี่ยนแปลงไป (Bautista-Banos *et al.*, 2006) เนื่องด้วยตำแหน่งคาร์บอน-2 ของมอนอเมอร์กลูโคซานมีนที่เป็นองค์ประกอบของไคโตซานมีความเป็นประจุบวกเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอชน้อยกว่า 5.5 ส่งผลให้ไคโตซานมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ โดยประจุบวกนี้จะเข้าจับกับประจุลบของสารที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อดังกล่าว ทำให้โครงสร้างของเซลล์เปลี่ยนแปลงส่งผลให้โปรตีนและสารอื่นๆ ภายในเซลล์หลั่งออกมานอกเซลล์ นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติที่สามารถจับกับโลหะได้ (chelating agent) ไคโตซานจึงสามารถจับธาตุที่จำเป็นที่มีในอาหาร ส่งผลให้เชื้อขาดสารที่ใช้ในการเจริญเติบโต และเมื่อไคโตซานเข้าสู่เซลล์ยังสามารถทำปฏิกิริยากับน้ำ จับกับเอนไซม์ต่างๆ และจับกับดีเอ็นเอ ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ และโปรตีน ในที่สุดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์นั้นหยุดลง (Rabea *et al.*, 2003)

ปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อรา

- ชนิด/สายพันธุ์ของเชื้อรา

ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราโดยไคโตซานนั้นขึ้นอยู่กับความแตกต่างของชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อรานั้น บางสายพันธุ์ใช้ไคโตซานความเข้มข้นต่ำๆ ก็สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนั้นได้ ขณะที่บางสายพันธุ์ต้องใช้ความเข้มข้นสูงๆ ดังเช่นจากบทความของ Rabea *et al.* (2003) ได้กล่าวไว้ว่าสายพันธุ์ของเชื้อราที่ความแตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของไคโตซาน ดังตัวอย่างในตารางที่ 2.1 แสดงค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ (The minimum inhibitory concentrations; MIC

ตารางที่ 2.1 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของไคโตซานในการยับยั้งเชื้อรา (Rabea *et al.*, 2003)

Fungi	MIC[a] (ppm)
Botryris cinerea	10
Fusarium oxysporum	100
Drechstera sorokiana	10
Micronectriella nivalis	10
Piricularia oryzae	5,000
Rhizoctonia solani	1,000
Trichophyton equinum	2,500

MIC[a] = minimum growth inhibitory concentration

จากตารางเห็นได้ว่าความแตกต่างของชนิดของเชื้อรามีผลต่อการยับยั้งด้วยไคโตซาน นอกจากนี้ระยะการเจริญของเชื้อรา (ระยะสปอร์ หรือระยะเส้นใย) ก็มีผลต่อการยับยั้งด้วยไคโตซานเช่นกัน ดังรายงานวิจัยของ Lui *et al.* (2007) ที่จะกล่าวถึงต่อไป

- คุณสมบัติทางเคมีของไคโตซาน

ไคโตซานที่มีมวลโมเลกุล เปอร์เซ็นต์การกำจัดหมู่อะซิติล (% deacetylation) และความเข้มข้นที่ต่างกันย่อมมีผลต่อการยับยั้งเชื้อชนิดเดียวกันแตกต่างกันด้วย ดังรายงานการวิจัยที่ผ่านมาได้ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะเหล่านี้ต่อการยับยั้งเชื้อที่สนใจ เพื่อทราบชนิดและความเข้มข้นของไคโตซานที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไปหรือนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป ดังรายงานวิจัยดังต่อไปนี้

Lui *et al.* (2007) ศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Penicillium expansum* เพื่อนำผลไปประยุกต์ใช้ควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของผลมะเขือเทศ โดยใช้ไคโตซานที่มี % deacetylation เท่ากับ 90 และความหนืดเท่ากับ 15 cP และความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 และ 1% (w/v) ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อราดังกล่าวบนอาหาร PDA โดยใช้สปอร์และเส้นใยของเชื้อราดังกล่าวที่มีอายุ 2 สัปดาห์หลังการเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 3 วัน พบว่า ไคโตซานทุกความเข้มข้นมีผลยับยั้งการเจริญของสปอร์เชื้อรา *B. cinerea* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ตามความเข้มข้นของไคโตซานที่สูงขึ้น ขณะที่สปอร์ของเชื้อรา *P. expansum* ถูกยับยั้งได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่ความเข้มข้น 0.05% เป็นต้นไป ส่วนการทดสอบในระยะเส้นใยพบว่าเส้นใยของเชื้อรา *B. cinerea* มีความว่องไวในการถูกยับยั้งด้วยไคโตซานดีกว่าเส้นใยของ *P. expansum*

โดยที่ไคโตซานความเข้มข้น 0.5% สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cinerea* ได้ 100% ขณะที่ความเข้มข้นดังกล่าวยับยั้ง *P. expansum* ได้เพียง 21.8% เท่านั้น

จากผลงานวิจัยของ Lui *et al.* ทำให้เห็นได้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรานั้นขึ้นอยู่ความเข้มข้น โดยความเข้มข้นยิ่งสูงขึ้นการยับยั้งเชื้อรานั้นก็สูงขึ้นด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ชนิดและระยะการเจริญของเชื้อราก็ให้ผลที่แตกต่างกัน

นอกจากที่กล่าวข้างต้นแล้วประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราด้วยไคโตซานนั้นยังขึ้นอยู่กับมวลโมเลกุล และ % deacetylation ด้วย ดังรายงานผลการวิจัยต่อไปนี้

Chien, *et al.* (2007) ศึกษาเปรียบเทียบไคโตซานที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน 2 ชนิดคือ High molecular weight (HMWC, Mw = 357 kDa) Low molecular weight (LMWC, Mw = 15 kDa) ความเข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2% pH 5.0 ส่วนชุดควบคุมใช้ 0.1% thiabendazole (TBZ) และน้ำกลั่นที่มี 5% glacial acetic acid ในการยับยั้งเชื้อรา *Penicillium digitatum, Penicillium italicum, Botrydiplodia lecanidion* และ *Botryris cinerea* ที่ใส่ลงบนผลส้มเขียวหวาน (Murcott tangor) ของประเทศไต้หวันที่ผ่านการจุ่มลงในสารที่ต้องการทดสอบ พบว่า สารที่ทดสอบสามารถควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. digitatum, P. italicum, B. lecanidion* และ *B. cinerea* ดีที่สุดคือ 0.1% TBZ และเมื่อเทียบระหว่าง HMWC และ LMWC พบว่า 0.05% LMWC สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราทั้ง 4 ชนิดได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่น และ HMWC ทุกความเข้มข้น รองมาจาก 0.1% TBZ และ LMWC ยังมีผลในการชะลอการสุก และการสูญเสียน้ำหนักของผลส้มได้ดีที่สุดด้วย

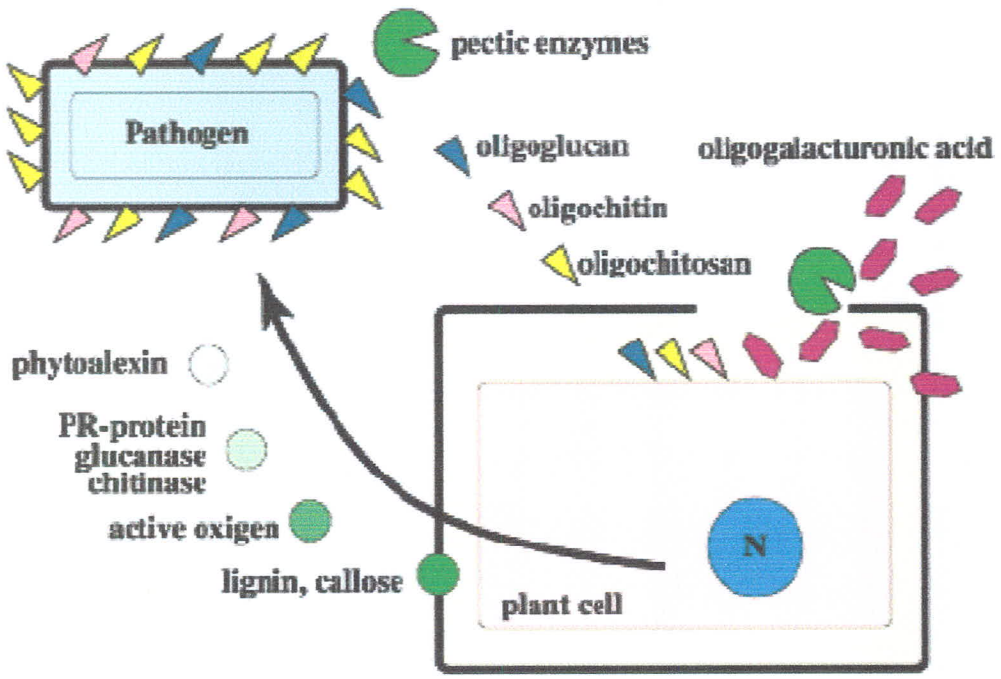
Gua *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของไคโตซานและไคโตซานที่ดัดแปรด้วย carboxymethyl ได้ carboxymethyl chitosan (CMCNTS) และอนุพันธุ์ของ CMCNTS อีกสามสาร ได้แก่ HNCMCTS, HCCMCTS และ HCMCTS ที่ระดับความเข้มข้น 5, 50 และ 100 ppm ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Alternaria solani, Fusarium oxysporium f. sp. vasinfectum* และ *Valsa mali* พบว่า เชื้อราถูกยับยั้งได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารทดสอบสูงขึ้น ไคโตซานในรูปของ HCCMCTS สามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporium* และ *A. solani* ขณะที่เชื้อรา *V. mali* ถูกยับยั้งด้วย HNCMCTS ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไคโตซานที่ไม่ผ่านการดัดแปรและไคโตซานในรูป CMCTS นอกจากนี้ทุกอนุพันธุ์ที่ผ่านการดัดแปรด้วย carboxymethyl สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น

นอกจากที่กล่าวมาแล้วสภาพแวดล้อม (น้ำ และความชื้น) สารเคมีและธาตุอาหารที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อราก็มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของไคโตซานด้วยเช่นกัน (Rabea *et al.*, 2003)

2) การชักนำให้พืชเกิดกลไกป้องกันตนเอง

ไคโตซานมีคุณสมบัติเป็นอิลิซิเตอร์ (elicitor) ชักนำให้พืชเกิดกลไกการป้องกันตนเองได้ โดยจากการรายงานในบทความของ Rabea *et al.* (2003) กล่าวว่า oligosaccharide elicitors ต่าง ๆ ได้แก่ oligoglucan oligochitin oligochitosan และ oligogalacturonic acid สามารถชักนำกลไกดังกล่าวได้ โดย

ปกติเมื่อพืชถูกเชื้อเข้ารุกราน พืชจะเกิดกลไกป้องกันตนเองอย่างรวดเร็วคือ การที่เซลล์พืชบริเวณนั้นเกิดการตาย หรือเรียกว่า hypersensitive cell death นอกจากนี้พืชยังมีการผลิตสารกลุ่ม reactive oxygen species เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ กระตุ้นการหลั่งของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบการป้องกันตนเอง (defense-related proteins) ไฟโตอเล็กซิน (phytoalexin) และเมื่อพืชได้รับไคโตซาน กระบวนการป้องกันตนเองที่เกิดขึ้นในพืช มีดังนี้ เมื่อพืชได้รับไคโตซานขั้นแรกที่สังเกตได้คือ ลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงคือ รูปากใบจะปิดหรือแคบลงเพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อภายในใบได้ โดยเซลล์คุมของใบจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นจากไคโตซานที่ได้รับ โดยสารนี้มีผลให้รูปากใบแคบลง จากนั้นไคโตซานจับกับ oligosaccharin receptors ที่เยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการส่งสัญญาณเข้าไปภายในเซลล์กระตุ้นให้ยีนที่มีหน้าที่จำเพาะทำงาน ส่งผลให้พืชเกิดกระบวนการผลิตสารกลุ่ม ฟีนอลิก (phenolic acid) เช่น ferulic acid และลิกนินขึ้นที่ใบ นอกจากนี้ยังกระตุ้นการสร้างเซลลูโลส ไฟโตอเล็กซิน protease inhibitor และไคโตซานจับกับยีนที่มีความจำเพาะต่อการป้องกันตนเองของพืชเรียกว่า *PR (pathogenesis related)* genes ทำให้ยีนดังกล่าวเกิดกระบวนการ DNA transcription ได้ RNA และเกิดกระบวนการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเอง ได้แก่ เอนไซม์ไคติเนสและกลูคาเนสให้หลั่งออกมาเพื่อทำลายผนังเซลล์ของเชื้อราที่เข้าทำลายพืช ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 กลไกการผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองในพืชโดยการกระตุ้นด้วยสารกลุ่ม oligosaccharide elicitor (Rabea *et al.*, 2003)

ไคโตซานสามารถชักนำหรือกระตุ้นให้พืชเกิดกระบวนการป้องกันตนเองจากการเข้าทำลายหรือการรุกรากจากเชื้อก่อโรค โดยทำให้พืชเกิดการสร้างสารกลุ่ม PR (pathogenesis-related) protein ที่สามารถทำลายผนังเซลล์ และสร้างสารที่ช่วยให้โครงสร้างผนังเซลล์ของพืชแข็งแรง เช่น ลิกนิน และเซลลูโลส เป็นต้น

2.5 เอนไซม์ไคติเนสและเบต้า-1, 3-กลูคาเนส

เอนไซม์ไคติเนสและเบต้า-1, 3-กลูคาเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม PR (pathogenesis-related) protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญมากในระบบป้องกันตนเองของพืช จากบทความของ Mohammadi and Karr (2002) ได้รายงานไว้ว่า เอนไซม์สองชนิดนี้เป็นโปรตีนกลุ่มละลายได้ในกรดและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ พืชจะสร้าง PR-protein นี้ขึ้น เมื่อไวรัส แบคทีเรีย หรือเชื้อราเข้าทำลายจากการศึกษาของ Kauffmann *et al.* 1987; Linthorst, 1991; Cutt and Klessig, 1992 อ้างถึงใน Mohammadi and Karr (2002) เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการกระตุ้นการสร้าง PR protein กับการแสดงออกของพืชเมื่อถูกทำลายพบว่า การสร้าง PR protein เกิดขึ้นเมื่อพืชได้รับ elicitor หรือเกิดบาดแผลหรือเนื้อเยื่อถูกทำลาย ส่งผลให้ยีนที่เกี่ยวข้องมีการแสดงออก เกิดกระบวนการสร้างสารกลุ่ม PR protein ลิกนิน เซลลูโลส phytoalexin และ hydroxyproline ที่มี glycoprotein จำนวนมากเกิดขึ้นที่ผนังเซลล์พืช

ไคโตซานเป็นสารในกลุ่ม oligosaccharide มีคุณสมบัติเป็น elicitor เมื่อพืชได้รับไคโตซานพืชจะผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูคาเนส (β-glucanase) ขึ้นมาเพื่อทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยมันจะย่อยเบต้า-กลูเคน (β-glucans) ที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อรา และผลิตไคติเนสขึ้นมาย่อยไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อราเช่นกัน (Rabea *et al.*, 2003)

1) เอนไซม์ไคติเนส (Mohammadi and Karr, 2002)

เอนไซม์ไคติเนส (chitinase; EC 3.2.1.14) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม PR-2 (PR-2 family) มีชื่อเรียกอื่นได้แก่ poly-β-1,4-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucoside) หรือ glycanohydrolase และเอนไซม์นี้สามารถจำแนกได้มากกว่า 6 กลุ่ม มีทั้งแบบชนิด exochitinase และ endochitinase microorganisms เอนไซม์ไคติเนสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยากระบวนการไฮโดรไลซีส (hydrolysis) β-1,4 linkages ของ N-acetyl-D-glucosamine polymers ของไคติน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งในพืชไม่มีสารนี้ ดังนั้นพืชจะสร้างไคติเนสขึ้นมาเพื่อป้องกันตนเอง โดยย่อยไคตินของเชื้อรา

2) เอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส (Mohammadi and Karr, 2002)

เอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนส (β-1, 3-glucanase; EC 3.2.1.6) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม PR-2 (PR-2 family) มีชื่อเรียกอื่นได้แก่ endo-1,3-glucan หรือ 3-glucanohydrolase หรือ laminarinase โดยเอนไซม์นี้มีหน้าที่ทำลายพันธะ β-1,3-glycosidic ระหว่างน้ำตาลกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบของไคตินและ β-1, 3-glucans ซึ่งสารนี้พบได้ในพืชทั่วไป และผนังเซลล์ของเชื้อรา

เอนไซม์เบต้า-1, 3-กลูคาเนสถูกหลั่งออกมาเมื่อถูกกระตุ้นด้วย elicitor เพื่อทำลาย glucan oligomers ในผนังเซลล์ของเชื้อราก่อโรค ควบคู่ไปกับการสังเคราะห์เอนไซม์ตัวอื่นที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันโรค และการสร้าง plytoalexins และองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช

2.6 ไคติโนไลติกแบคทีเรีย (Chitinolytic bacteria)

Chitinolytic bacteria เป็นสิ่งมีชีวิตที่พบในทะเล มีบทบาทสำคัญในการกระบวนการสลายไคติน อาจพบสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้อาศัยอยู่อย่างอิสระ หรืออาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตที่มีเปลือกด้านนอกประกอบด้วยไคติน และเศษของไคตินในระบบนิเวศน์ทางทะเล (Kamil *et al.*, 2007)

Chitinolytic bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีสมบัติเป็น Antagonistic microorganism ซึ่งสามารถควบคุมหรือทำลายเชื้อก่อโรค โดยเฉพาะกลุ่ม Soil-born plant pathogens จึงสามารถใช้แบคทีเรียกลุ่มนี้มาควบคุมและป้องกันการเกิดโรคในพืชด้วยวิธีชีวภาพได้ (Suryanto *et al.*, 2011)

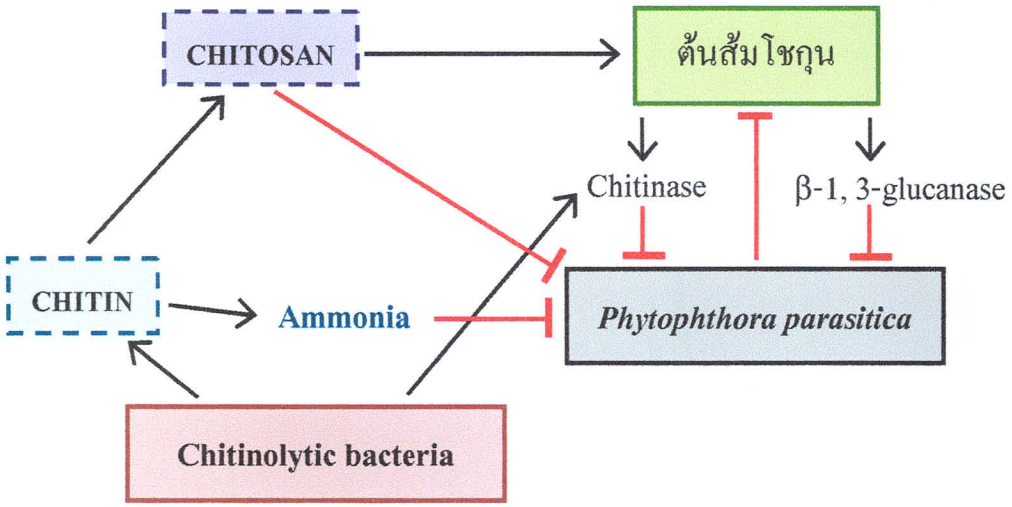
ปัจจุบันนักวิจัยได้ให้ความสนใจศึกษาบทบาทของสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ในการควบคุมและยับยั้งเชื้อก่อโรคต่างๆ ในพืช ซึ่ง Chitinolytic bacteria มีหลายชิดได้แก่ *Pseudomonas* spp. *Bacillus* spp. *Streptomyces* spp. *Trichoderma* spp. *Serrania marcescens Aeromonas caviae Enterobacter agglomerans* เป็นต้น (Suryanto *et al.*, 2011; Frankowski *et al.*, 2001)

Chitinolytic bacteria สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อชนิดอื่นได้โดยการผลิตเอนไซม์ไคติเนส (Extracellular chitinase) ออกมาย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราซึ่งมีไคตินเป็นองค์ประกอบ โดยเชื้อนี้ใช้ไคตินเป็นอาหาร ขณะเดียวกันก็ได้ทำลายเชื้อราก่อโรคด้วย (Suryanto *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 1999)

2.7 ความสัมพันธ์ของไคติน ไคโตซาน ไคติโนไลติกแบคทีเรีย และเชื้อก่อโรค *P. parasitica*

ไคตินเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไคโตซานโดยกระบวนการกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation) และไคตินเป็นอาหารของแบคทีเรียในดินกลุ่มไคติโนไลติกแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพื่อย่อยสลายไคติน เพื่อใช้คาร์บอนและไนโตรเจนเป็นอาหาร นอกจากนี้ในกระบวนการสลายไคตินยังเกิดสารตัวอื่น เช่น แอมโมเนีย ซึ่งเป็นพิษต่อเชื้อรา *P. parasitica* ดังนั้นดินที่มีไคตินส่งผลให้จำนวนของไคติโนไลติกแบคทีเรียเพิ่มขึ้น โดยกลไกการสลายไคตินเพื่อใช้เป็นอาหารทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้สลายไคตินที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อราด้วย จึงเกิดการยับยั้งเชื้อรานี้ทางอ้อม โดยเอนไซม์ที่ผลิตออกมาเพื่อสลายไคตินส่งผลทำลายเชื้อรานี้ด้วย สำหรับไคโตซานมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อราสองกลไกคือ กลไกที่หนึ่ง การยับยั้งโดยตรง โดยอาศัยความมีประจุบวกในโครงสร้างเมื่ออยู่ในสารละลายกรดอ่อนไปจับกับประจุบลบของสารที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อรา หรือสารในอาหาร หรือสารที่อยู่ภายในเซลล์ของเชื้อ ทำให้เชื้อสูญเสียสมดุลทางโครงสร้างและกระบวนการเมทาบอลิซึม ส่วนกลไกที่สองคือ ไคโตซานเป็นตัวกระตุ้นให้พืชเกิดการสร้างสารกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตนเอง เช่น กระตุ้นการสร้างสารกลุ่ม PR-proteins เช่น เอนไซม์

ไคติเนส และ เบต้า-1, 3-กลูคาเนส ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองมีหน้าที่ย่อยองค์ประกอบภายในผนังเซลล์ของเชื้อรา ได้แก่ ไคติน และเบต้า-กลูเคน ตามลำดับ ทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อ *P. parasitica* ได้ ดังความสัมพันธ์ในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 ความสัมพันธ์ระหว่างไคติน ไคโตซาน Chitinolytic bacteria *P. parasitica* และต้นส้มโชกุน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึงกับงานที่ทำ

เกศนรี (2544) ได้ศึกษาผลของไคโตซานต่อเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่ก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสและการชักนำการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสในองุ่น 5 สายพันธุ์ได้แก่ พันธุ์ไวน์ขาว องุ่นต้นพันธุ์ พันธุ์ Amberlia พันธุ์ Ruby Seedless และพันธุ์ Loose Perlette พบว่า ระดับความเข้มข้นของไคโตซานที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราดังกล่าวได้คือ 3,200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พีเอช 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยลดขนาดโคโลนีของเชื้อราได้มากกว่า 85% และสายพันธุ์องุ่นที่แตกต่างกันมีความสามารถในการต้านทานต่อโรคได้แตกต่างกัน เอนไซม์ไคติเนสและเบต้า-1,3-กลูคาเนสถูกกระตุ้นด้วยสารละลายไคโตซานและทำงานร่วมกันแบบ synergistic เพื่อป้องกันตนเองต่อเชื้อราก่อโรคแอนแทรคโนส เอนไซม์ทั้งสองชนิดที่สกัดได้จากองุ่นทั้งสามสายพันธุ์หลังทำการฉีดพ่นไคโตซานบนต้นองุ่นเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนการฉีดพ่นด้วย 3.58×10^{6} cell/mL ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ผลที่ได้พบว่า เอนไซม์ทั้งสองชนิดและการสะสมของ Phytoalexin (Stilbene) เพิ่มขึ้นเพื่อต่อต้านการบุกรุกของเชื้อราก่อให้เกิดโรคแอนแทรคโนสในองุ่น

จินตนาและคณะ (2548) ได้ศึกษาผลของไคโตซานต่อการงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 4 ชนิด ได้แก่ *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsi* และ *Pythium aphanidermatum* (soilborne pathogen) และ *Macrophomena phaseolina* (seedborne pathogen) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar) pH 5.6 ที่มีไคโตซานความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 % (w/v) พบว่าไคโตซานสามารถชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราทั้ง 4 ชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดที่มีกรดอะซิติก 0.5% (pH 5.6) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไคโตซานความเข้มข้น 0.8% สามารถชะลอการงอกของสปอร์เชื้อราได้ดีที่สุด นอกจากนี้การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *F. solani* และ *M. phaseolina* ที่เลี้ยงบนอาหารที่มีไคโตซานในทุกความเข้มข้นมีการเจริญเติบโตช้ากว่าชุดควบคุมและชุดที่มีกรดอะซิติกอย่างมีนัยสำคัญ

จิระเดชและคณะ (2539) ได้ศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และสารเคมีเมทาแล็คซิลในการควบคุมโรครากเน่าของกิ่งต้นส้มเขียวหวานที่เกิดจากเชื้อรา *phytophthora parasirica* โดยศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ *Trichoderma* spp. เมื่อใช้เดี่ยวหรือใช้ร่วมกับสารเคมีควบคุมเชื้อรา metalaxyl เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 ชนิด คือเชื้อ *Bacillus* sp. และแบคทีเรียแกรมลบในการควบคุมโรครากเน่าของกิ่งต้นส้มเขียวหวานซึ่งเกิดจากเชื้อรา *P. parasitica* โดยการเตรียมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในรูปผงผสมกับสารเสริม (รำข้าว ปุ๋ยอินทรีย์ และทราย) และเตรียมเชื้อแบคทีเรียในรูปผงผสมน้ำ โดยนำผงเชื้อ *Trichoderma* spp. ผสมสารเสริมโรยบริเวณโคนต้นส้มเขียวหวานในอัตรา 20 g/ต้น เปรียบเทียบกับการใช้ผงเชื้อแบคทีเรียผสมน้ำในอัตรา 5 กรัมต่อ 200 mL/ต้น เทราด

บริเวณโคนต้น พบว่า กรรมวิธีที่ใช้ส่วนผสมของผงเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลท CB-PIN-01 ร่วมกับสารเคมี metalaxyl เข้มข้น 2,500 ppm (200 mL/ต้น) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรค โดยพบการเกิดโรครากเน่าของกิ่งส้มเขียวหวานเพียง 5.5% ขณะที่กรรมวิธีควบคุม ซึ่งใส่แต่เพียงเชื้อรา *P. parasitica* อย่างเดียว เกิดโรค 63.9% และพบว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักสดของรากไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ *P. parasitica* กรณีของเชื้อแบคทีเรียพบว่า *Bacillus sp.* ไอโซเลท B-03 มีประสิทธิภาพการควบคุมโรคได้ดีไม่แตกต่างจากการใช้เชื้อรา *T.harzianum* (CB-PIN-01) หรือสารเคมี metalaxyl ที่ความเข้มข้น 5,000 ppm

ธวัชและคณะ (2546) ได้ศึกษาผลของไคโตซานต่อโรคแอนแทรคโนสของผลมะม่วงหลังการเก็บเกี่ยว โดยทดสอบประสิทธิภาพของไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 mg/mL ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.8 และ 1.6 mg/mL ที่ pH 4.0 และ 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 100% เมื่อทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.8 mg/mL pH 4.5 สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 100% ผลมะม่วงที่มีการปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้านเดียวของผลแล้วบ่มไว้ในสภาพชื้นเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจุ่มผลมะม่วงด้านที่ปลูกเชื้อในสารละลาย ไคโตซานความเข้มข้น 0.8 mg/mL pH 4.5 พบว่า สามารถยับยั้งการเกิดโรคได้ 56.9% และเมื่อจุ่มผลมะม่วงด้านที่ไม่ได้ปลูกเชื้อในสารละลายไคโตซานพบว่า ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคของผลด้านที่ปลูกเชื้อดังกล่าว เมื่อปลูกเชื้อทั้งสองด้านของผลมะม่วงหลังจากที่จุ่มด้านหนึ่งของผลในสารละลายไคโตซานแล้วเก็บรักษาไว้ที่ 15 °C เป็นระยะ เวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน พบว่า ผลมะม่วงด้านที่มีการจุ่มในสารละลายไคโตซานความเข้มข้น 0.8 mg/mL สามารถลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสได้ 55.9, 22.7, 12.3, 6.7 และ 6.6% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการเกิดโรคของผลมะม่วงด้านที่ไม่ได้จุ่มในสารละลายไคโตซาน

พรทิพย์และคณะ (2548) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคของไคโตซานต่อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศในการทดสอบกิจกรรมของไคโตซานในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ที่เป็นสาเหตุโรคเหี่ยวเขียวของมะเขือเทศ โดยใช้ไคโตซานที่มีค่า degree of deacetylation (DD) ต่างกัน 4 ระดับคือ 80, 85, 90, และ 95% DD พบว่า ไคโตซานทั้ง 4 ชนิดมีผลต้านเชื้อดังกล่าวได้และอัตราความเข้มข้นต่ำสุด (minimal inhibitory concentration) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *R. solanacearum* ได้ คือที่อัตราความเข้มข้น 2.5 mg/mL ส่วนการศึกษาความไวในการตอบสนองของปฏิกิริยาต่อต้านเชื้อ โดยไคโตซานแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 30.0 mg/mL ที่วัดได้จากการปรากฏบริเวณใสของการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบบริเวณใสขนาดกว้างขึ้นตามอัตราความเข้มข้นของไคโตซานที่เพิ่มขึ้น และเริ่มปรากฏขึ้นตั้งแต่อัตราความเข้มข้น

2.5 mg/mL โดยขนาดความกว้างต่ำสุดมีขนาด 7.6 mm จากการใช้ไคโตซาน 80% DD ความเข้มข้น 2.5 mg/mL และขนาดความกว้างมากที่สุดมีขนาด 25.6 mm จากการใช้ไคโตซาน 90% DD ความเข้มข้น 30.0 mg/mL ซึ่งผลของไคโตซานในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *R.solanacearu* ที่พบมีความใกล้เคียงกับผลการใช้ยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล และให้ผลดีกว่ายาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน และเตตร้า-ซัยคลิน รวมทั้งดีกว่าคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ และคอปเปอร์ออกซีคลอไรด์เป็นอย่างมาก ส่วนสารเคมีจำพวกเบนเลท แมนโคเซบ และริโดมิล ตลอดจนกรดอะซีติก 1% ที่ใช้เป็นตัวทำละลายไคโตซานและปรับ pH เป็น 5.7 นั้น ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนี้แต่อย่างใด

Abd-El-Kareem *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของการใช้ไคตินและไคโตซานในการต่อต้านโรครากเน่าของต้นมะเขือเทศซึ่งถูกชักนำให้เกิดขึ้นโดยเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Rhizoctonia solani, Fusarium solani* และ *Sclerotium rolfsii* ภายใต้สภาวะเรือนกระจกที่มีแสงส่องถึง จากการศึกษาการยับยั้งเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า ไคโตซานสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ไคตินไม่มีผลต่อการยับยั้งดังกล่าว เมื่อทำการศึกษาโดยปลูกต้นมะเขือเทศในดินที่มีการผสมของไคตินหรือไคโตซานปริมาณ 2, 4 และ 6 g ต่อดิน 1 kg และไคตินร่วมกับไคโตซานปริมาณอย่างละ 6 g ต่อดิน 1 kg พบว่า ทุกชุดทดสอบมีผลลดจำนวนเชื้อราก่อโรคทั้ง 3 ชนิดในดินให้ลดลงได้ และจำนวนเชื้อราลดลงมากที่สุดในชุดทดสอบที่ผสมทั้งไคตินและไคโตซานอย่างละ 6 g ต่อดิน 1 kg นอกจากนี้พบว่าไคตินสามารถชักนำให้จำนวน chitinolytic bacteria ในดินเพิ่มจำนวนมากขึ้น ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์เชื้อราได้ จึงสามารถช่วยลดจำนวนของเชื้อราก่อโรคในต้นมะเขือเทศได้อีกทางหนึ่ง และจากการศึกษาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไคติเนสในรากมะเขือเทศพบว่า ไคโตซานสามารถชักนำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 100% แสดงให้เห็นว่า ไคโตซานสามารถชักนำให้พืชเกิดกลไกการป้องกันตนเองของพืชได้ ดังนั้นกลุ่มผู้วิจัยจึงแนะนำให้มีการใช้ไคตินร่วมกับไคโตซานในการลดการเกิดโรคในรากมะเขือเทศที่ถูกชักนำโดยเชื้อราก่อโรค อีกทั้งไคตินและไคโตซานก็ไม่เป็นพิษทั้งต่อคนและสิ่งแวดล้อม รวมทั้งราคาของสารดังกล่าวไม่แพงเมื่อเทียบกับสารเคมี

Ben-Shalom *et al.* (2003) ได้ศึกษาผลของไคโตซานต่อการควบคุมราสีเทาชนิด *Botrytis cinerea* ในต้นแตงกวา โดยฉีดพ่นไคโตซานความเข้มข้น 0.1% บนต้นแตงกวาสายพันธุ์ *Cucumis sativus* L.พบว่า ไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคได้ 100% เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง หลังจากฉีดพ่นไคโตซาน และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบโอลิโกเมอร์ไคตินและไคโตซานต่อการชักนำการเพิ่มแอคติวิตี้ของเอนไซม์ไคโตซาเนสและเปอร์ออกซิเดสในต้นแตงกวาพบว่า แอคติวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองที่ชักนำโดยโอลิโกเมอร์ไคตินเพิ่มขึ้นเป็น 2.4 และ 2.0 เท่า ตามลำดับ ขณะที่ไคโตซานชักนำให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ไคโตซาเนสเพิ่มขึ้น 1.9 เท่า แต่ไคโตซานไม่มีผลให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าโอลิโกเมอร์ไคตินและไคโตซานมีสมบัติควบคุมเชื้อรา และสามารถชักนำให้พืชเกิดกระบวนการป้องกันตนเองต่อการเกิดโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา

El-Mougy *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของการนำไคตินและไคโตซานไปใช้ในการควบคุมโรครากเน่าและโคนเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* และ *Sclerotium rolfsii* ในต้นมะเขือเทศทั้งในสภาวะเรือนทดลองและแปลงปลูก โดยผสมเชื้อราที่มีอายุ 20 วันที่เจริญในอาหาร Sandy-barley (1:1) มีน้ำอยู่ 40% ในอัตราส่วนเชื้อรา 3% ของดินที่ใช้ทดสอบ ซึ่งการศึกษาในเรือนทดลองนั้นมี 2 ขั้นตอนคือ 1) เปรียบเทียบวิธีการผสมไคตินและไคโตซานและลักษณะการปลูกต้นมะเขือเทศลงดิน 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1; ผสมไคตินและไคโตซานลงในดิน แล้วปลูกด้วยต้นมะเขือเทศ วิธีที่ 2; ผสมไคตินและไคโตซานลงในดิน แล้วปลูกด้วยเมล็ดมะเขือเทศ (ผสมไคตินและไคโตซานความเข้มข้น 2, 4 และ 6 g/ดิน 1 kg และไคติน+ไคโตซานอย่างละ 6 g/ดิน 1 kg) และวิธีที่ 3; จุ่มรากของต้นมะเขือเทศในสารละลายไคตินและไคโตซานความเข้มข้น 2, 4 และ6 g/L และไคติน+ไคโตซานอย่างละ 6 g/L นาน 5 นาที แล้วปลูกลงดินพบว่า วิธีที่ 3 การจุ่มรากของต้นมะเขือเทศก่อนปลูกนั้นให้ผลลดการเกิดโรคได้น้อยที่สุด ขณะที่วิธีที่ 1 และ 2 การใช้ไคตินร่วมกับไคโตซานให้ผลดีที่สุด โดยสามารถลดการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อ *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* และ *Sclerotium rolfsii* ได้ 77, 80, 66% และ 66, 64, 55% ตามลำดับ ส่วนขั้นตอนที่ 2 ศึกษาเวลาที่ใช้ในการเติมไคโตซานลงผสมในดินที่เติมไคตินไว้ มี 4 ชุดทดสอบ คือ เติมไคโตซานในดินที่มีไคตินในวันที่ 0, 10, 20 และ 30 วัน และใช้วิธีการปลูกต้นมะเขือเทศด้วยเมล็ด พบว่า ทุกชุดทดสอบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเปอร์เซ็นต์การลดลงของโรคที่เกิดจากเชื้อ *R. solani*, *F. solani* และ *S. rolfsii* ในชุดที่เติมไคโตซานหลังเติมไคติน 30 วันได้เท่ากับ 98, 95 และ 93% ตามลำดับ และการศึกษาในแปลงปลูกทำโดยปลูกเมล็ดมะเขือเทศลงในดินที่มีไคติน 0, 2, 4 และ 6 g/L และไคติน+ไคโตซาน (6 g : 6g) ในดิน 1 kg และใช้สารฆ่าเชื้อรา Rhizolex-T 3 g/ ดิน 1 kg เป็นชุดเปรียบเทียบ เมื่อต้นมะเขือเทศมีอายุได้ 30 วันย้ายลงปลูกในแปลง 12 แถวๆ ละ 50 ต้น (ออกแบบการทดลองแบบ Completely block design; RCBD) ตรวจสอบการเกิดโรครากเน่าและโคนเน่าเป็นเวลา 90 วันพบว่า ชุดทดสอบที่มีทั้งไคตินและไคโตซานสามารถลดการเกิดโรคได้ดีที่สุดมากกว่า 91% ขณะที่ชุดทดสอบที่มีไคตินหรือไคโตซานเพียงอย่างเดียวสามารถลดการเกิดโรคได้ประมาณ 81% ซึ่งให้ผลเท่ากับการใช้สารฆ่าเชื้อรา Rhizolex-T ส่วนชุดทดสอบที่มีไคตินหรือไคโตซานปริมาณ 4 g/ดิน 1 kg สามารถลดการเกิดโรคได้เพียง 70% และไคตินหรือไคโตซานปริมาณ 2 g/ดิน 1 kg มีผลลดการเกิดโรคได้น้อยมาก นอกจากประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแล้ว ชุดทดสอบที่มีทั้งไคตินและไคโตซานยังส่งผลกระตุ้นให้ผลผลิตของต้นมะเขือเทศเพิ่มขึ้นถึง 67% ชุดทดสอบที่มีไคตินหรือไคโตซานปริมาณ 4 g/ดิน 1 kg และ 2 g/ดิน 1 kg สามารถกระตุ้นให้ผลผลิตของต้นมะเขือเทศเพิ่มขึ้นประมาณ 40 และ 32% ตามลำดับ ขณะที่สารฆ่าเชื้อรา Rhizolex-T มีผลกระตุ้นให้ผลผลิตของต้นมะเขือเทศเพิ่มขึ้นเพียง 20% เท่านั้น

Kamil *et al.* (2007) ได้ทำการคัดแยกและระบุชนิดของ Chitinolytic bacteria ที่แยกได้จากราก ของต้นข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าวจ้าว และได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียเหล่านี้มายับยั้งเชื้อก่อโรคในพืช จากผลการคัดแยกเชื้อ Chitinolytic bacteria ที่สามารถใช้ไคตินได้ดีที่สุดมี 4 ชนิด (MS1, MS2, MS3 และ MS4) และเมื่อทดสอบทางกายภาพและชีวเคมีจึงสามารถระบุเชื้อทั้ง 4 ชนิดได้เป็น MS1 คือ *Bacillus licheniformis* MS2 คือ *Stenotrophomonas maltophilia* MS3 คือ *Bacillus licheniformis* และ MS4 คือ *Bacillus thuringiensis* จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราก่อโรค *Rhizoctonia solani*, *Fusarium culmorum*, *Macrophomina phosiolina*, *Sclerotium rolfsii* *Alternaria alternate* และ *Pythium* sp. พบว่า MS1 และ MS3 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 6 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ MS2 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. rolfsii* และ *Pythium* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ และยับยั้งเชื้อ *F. culmorum* และ *A. alternate* ได้ปานกลาง และเชื้อ *M. phosiolina* เล็กน้อย แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solani* ได้ ส่วน MS4 สามารถยับยั้งเชื้อเชื้อ *S. rolfsii* ได้อย่างสมบูรณ์ และยับยั้งเชื้อ *Pythium* sp. และ *A. alternate* ได้ปานกลาง และเชื้อ *M. phosiolina* เล็กน้อย แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *R. solani* และ *F. culmorum* ได้ และจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส โดยเลี้ยงเชื้อไคติโนไลติกทั้ง 4 ชนิดในอาหารเหลวที่มีไคตินบน shaker ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °C แล้วเก็บของเหลวหลังการปั่นเหวี่ยงที่แบคทีเรียหลั่งออกมาทุกวันไปวิเคราะห์แอคติวิตี้ด้วยเทคนิคสเปก-โตรโฟโตมิทรีพบว่า เชื้อ MS3 ให้แอคติวิตี้สูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 1.27 U/mL จากนั้นผู้วิจัยได้นำผลที่ได้ไปศึกษาในเรือนทดลองที่มีอุณหภูมิ 30±1 °C โดยใช้เมล็ดทานตะวันที่เคลือบด้วยเชื้อ *R. solani* และใส่เชื้อ Chitinolytic bacteria MS3 แล้วดูการเกิดโรคของต้นอ่อนเทียบกับต้นที่ไม่ได้ใส่ MS3 พบว่า ต้นที่ไม่ได้ใส่ MS3 ต้นพืชตายหมด ขณะที่ชุดที่มีการใส่ MS3 นั้นลดการเกิดโรคได้ และต้นพืชสามารถเจริญได้ดี

Prapagdee *et al.* (2007) ได้ศึกษาบทบาทของไคโตซานในการป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อ *Fusaruim solani* f. sp. *Glycines* สาเหตุการตายของต้นถั่วเหลือง โดยใช้ไคโตซานที่เตรียมได้จากเปลือกหอย (% deacylation = 85 และ Mw = 2×10^5 Da) ซึ่งมี 2 การศึกษาคือ ในห้องปฏิบัติการและในต้นถั่วเหลือง สำหรับการศึกษาในห้องปฏิบัติการทำได้โดยเตรียมอาหารแข็ง PDA และอาหารเหลว PBD ที่มีไคโตซานความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 mg/mL เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา โดยเลี้ยงเชื้อราในที่มืด อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 7 และ 10 วัน ตามลำดับ พบว่าไคโตซานความเข้มข้น 5 mg/mL สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ดีที่สุด รองลงมาคือ 3 mg/mL เท่ากับ 55 และ 38% ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้น 1 mg/mL ให้ผลการยับยั้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม สำหรับการทดสอบกับสปอร์เชื้อราพบว่า ไคโตซานทุกความเข้มข้นมีผลยับยั้งการเจริญของสปอร์ในอาหาร PBD ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม สำหรับการทดสอบกับต้นถั่วเหลืองสายพันธุ์ SJ5 ที่มีอายุ 14 วัน (V1 growth stage) ออกแบบการทดลองแบบ Completely

randomized design (CRD) มี 6 ชุดการทดสอบๆ ละ 5 ซ้ำ (T1 = Negative control ไม่มีเชื้อรา; T2 = Negative control มีเชื้อรา T3 = มี 1 mg/mL benomyl และเชื้อรา T4 = มี 1 mg/mL chitosan และเชื้อรา T5 = มี 3 mg/mL chitosan และเชื้อรา T6 = มี 5 mg/mL chitosan และเชื้อรา) แล้ววิเคราะห์ลักษณะการเจริญของต้นถั่วเหลือง (ความยาวราก ความสูงของต้น และน้ำหนักของต้น) พบว่า ความยาวรากและความสูงของต้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในทุกชุดทดสอบ แต่ชุดทดสอบ T6 มีผลให้น้ำหนักของต้นถั่วเหลืองสูงกว่า T2-T5 สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสทำโดยเก็บใบของต้นถั่วเหลืองในชุดทดสอบ T2 และ T5 มาสกัดเอนไซม์และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ในวันที่ 0-14 พบว่า ไคโตซานมีผลชักนำการสร้างกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในวันที่ 1 เพิ่มขึ้นเป็น 12.4 U/mg protein แล้วเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3 เป็น 17.9 U/mg protein แล้วค่อยๆ ลดลง ขณะที่ใบต้นถั่วเหลืองที่ได้รับเชื้อเพียงอย่างเดียวเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 1 เท่ากับ 6.5 U/mg protein แล้วลดลงเล็กน้อย โดยในวันที่ 14 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชุดทดสอบมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงประมาณ 2-4 U/mg protein

Falcón-Rodriguez *et al.* (2007) ได้ศึกษาสมบัติของไคโตซานต่อการเป็นสารยับยั้งเชื้อราก่อโรคในดินและเป็นตัวชักนำให้ต้นยาสูบเกิดกระบวนการต้านทานต่อโรค โดยศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากต้นยาสูบ 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Phytophthora parasitica* Dastur var. *nicotianae*, *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp, *Rhizoctonia solani* Kuhn และ *Sclerotium rolfsii* Sacc. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า *P. aphanidermatum* และ *S. rolfsii* ตอบสนองต่อการยับยั้งด้วยไคโตซานได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 1.5 g/L ส่วนสายพันธุ์อื่นยับยั้งได้ดีที่ระดับความเข้มข้น 2.0 g/L จากการทดสอบบนต้นยาสูบสายพันธุ์ *Nicotiana tabacum* L. โดยฉีดพ่นไคโตซานความเข้มข้น 0.1 0.5 และ 1.0 g/L เป็นเวลา 5 วัน ก่อนมีการใส่เชื้อ *P. parasitica* Dastur var. *nicotianae* ลงไปพบว่าไคโตซานสามารถป้องกันการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราดังกล่าวได้โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 17.2 18.9 และ 19.8% ตามลำดับ ไคโตซานสามารถชักนำให้พืชเกิดกระบวนต่อต้านต่อเชื้อราได้โดยวิเคราะห์ แอคติวิตี้ของเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ กลูคาเนส ไคโตซาเนส ฟีนิลอลานีน แอมโมเนียไลเอส และเปอร์ออกซิเดสพบว่า แอคติวิตี้ของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

Gua *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของไคโตซานและไคโตซานที่ดัดแปรด้วย carboxymethyl ได้ carboxymethyl chitosan (CMCNTS) และอนุพันธุ์ของ CMCNTS อีกสามสา ได้แก่ HNCMCTS, HCCMCTS และ HCMCTS ที่ระดับความเข้มข้น 5, 50 และ 100 ppm ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporium f. sp. vasinfectum* และ *Valsa mali* พบว่าเชื้อราถูกยับยั้งได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารทดสอบสูงขึ้ ไคโตซานในรูปของ HCCMCTS สามารถยับยั้งเชื้อรา *F. oxysporium* และ *A. solani* ขณะที่เชื้อรา *V. mali* ถูกยับยั้งด้วย HNCMCTS ได้ดี

ที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไคโตซานที่ไม่ผ่านการดัดแปรและไคโตซานในรูป CMCTS นอกจากนี้ทุกอนุพันธุ์ที่ผ่านการดัดแปรด้วย carboxymethyl สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น

Hernández-Lauzardo *et al.* (2008) ได้ศึกษาผลของไคโตซานที่มวลโมเลกุลต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ Low molecular weight (1.74×10^4 Da) medium molecular weight (2.38×10^4 Da) และ high molecular weight (3.07×10^4 Da) ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Rhizopus stolonifer* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในพืชและผลไม้หลายชนิด จากผลการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) พบว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุดมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีที่สุด ขณะที่ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสุดมีผลต่อรูปร่างของเชื้อราและรบกวนกระบวนการงอกของสปอร์เชื้อราเท่านั้น

Munõz *et al.* (2009) ได้ศึกษาผลของไคโตซานต่อการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum* sp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสบนอาหารเลี้ยงเชื้อและผลของมะเขือเทศและองุ่น โดยผลการทดสอบการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีไคโตซาน (85% deacetylation, pH 5.6) ความเข้มข้น 0, 1, 1.5, 2 และ 2.5% ที่อุณหภูมิ 24 °C เป็นเวลา 7 วัน ในที่มืดพบว่า ไคโตซานความเข้มข้น 2 และ 2.5% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 63 และ 39% ตามลำดับ

No *et al.* (2002) ได้ศึกษาผลของความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานและโอลิโกเมอร์ไคโตซานที่ได้จากเปลือกกุ้งพบว่า ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1671, 1106, 746, 470 , 224 และ 28 kDa สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าโอลิโกเมอร์ไคโตซานซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 22, 10, 7, 4 และ 1 kDa โดยไปมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยเฉพาะ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescences* และ *Bacillus cereus* ไคโตซานโดยทั่วไปจะให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบที่ความเข้มข้น 0.1% (w/v) และความเข้มข้นต่ำสุดของไคโตซาน (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อยู่ในช่วง 0.05% - >0.1% (w/v) ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและน้ำหนักของไคโตซาน นอกจากนี้นักวิจัยกลุ่มนี้ได้ศึกษาตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานคือ 1% acetic acid และค่าพีเอชที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซานได้ดีอยู่ที่ 4.5 โดยศึกษาผลของพีเอชในช่วง 4.5, 5.0, 5.5 และ 5.9 ต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย 6 ชนิด (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimuruim*, *Listeria monocytogenes*, *Stapphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus brevis*) ของไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 3 ระดับ (1671, 746 และ 470 kDa สำหรับเชื้อ 4 สายพันธุ์แรก และ 1106, 224 และ 28 kDa สำหรับเชื้อกลุ่มสายพันธุ์ *Lactobacillus*) พบว่าการยับยั้งแบคทีเรียโดยไคโตซานเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่มีค่าพีเอชต่ำ โดยที่พีเอช 4.5 ให้ผลการยับยั้งได้ดีที่สุด