

การผลิตปุ๋ยชีวภาพนาโนจากกรด 5-อะมิโนสิวูลินิกที่จับกับโคโตซานเพื่อนำไปเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ
ข้าวหอมนิล (*Oryza sativa* L.) ในพื้นที่จำกัด
อังคณา ไส้เกื้อ¹ ชุติมา แกมกิจ¹ ธนากรณ์ คำสุด¹ และอรพิน รัตนสุภา²

บทคัดย่อ

เตรียมกรด 5-อะมิโนสิวูลินิกจากน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodospseudomonas palustris* JP255 นำไปจับกับโคโตซานชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำภายใต้สภาวะคลื่นความถี่สูง จากนั้นนำมาทำให้เป็นผงด้วยวิธีฟริชดรายน์ เมื่อวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope พบว่าได้สารอนุภาคขนาด 50 นาโนเมตร จึงนำไปใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของข้าวพันธุ์หอมนิล (*Oryza sativa* L.) ที่ปลูกในกระถางพลาสติก โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCBD) ประกอบด้วย 10 ชุดการทดลอง คือ ALA ผง (ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์) ALA-nano (ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์) และโคโตซาน (ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับที่ใช้ใน ALA-nano) ฉีดพ่นต้นข้าวที่ 15 และ 30 วัน หลังย้ายต้นกล้าลงกระถาง จากผลการทดลอง พบว่าการใช้ ALA-nano (ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์) มีแนวโน้มในการเพิ่มการเจริญเติบโตด้านความสูงของต้นข้าวจากโคนถึงปลายใบ และจำนวนการแตกกอ (แขนง) ต่อต้นของต้นข้าวดีที่สุด เพิ่มผลผลิตด้านจำนวนรวงต่อกอ ความยาวรวงหลัก จำนวนเมล็ดต่อรวง จำนวนเมล็ดดีต่อรวง และจำนวนเมล็ดลีบต่อรวงน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือก 100 เมล็ด สูงกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการใช้สารชีวภัณฑ์ ALA-nano จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับเกษตรกรที่จะนำมาใช้เพิ่มเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิต ทั้งยังมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมด้วย

คำสำคัญ : กรด 5-อะมิโนสิวูลินิก ซิวมวล Plackette-Burman design และ Box-Behnken design

.....
¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช
ต.ถ้ำใหญ่ อ.ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช

² คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช
ต.ถ้ำใหญ่ อ.ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช

The Bio-Organic Nano Fertilizer 5-Aminolevulinic Acid Incorporated Chitosan to Increase Yield and Quality of Hom Nin Rice (*Oryza sativa* L.) in Limited Space

ANGKANA SAIKEUR¹, CHUTIMA KAMKIT¹, THANAKORN DAMSUD¹ and ORAPIN RATTANASUPA²

Abstract

Preparation of 5-Aminolevulinic acid (ALA) contained in photosynthetic bacterial cell culture *Rhodopseudomonas palustris* JP255. ALA was captured with low molecular weight chitosan under high frequency conditions. Then, the powder is made by freeze drying process, also known as lyophilisation or cryodesiccation, is a low temperature dehydration process which involves freezing the product. The 50 nm particle size was measured by Scanning Electron Microscope, it is used for enhance plant growth and productivity of Hom Nin rice (*Oryza sativa* L.) in pots. The experimental design Complete Randomize Block Design: RCBD composed of 10 experimental set and 3 levels of ALA powder, ALA nano and chitosan at 1, 5 and 10 μ M. Spray rice at 15 and 30 days after planting seedlings. The results showed that, the use of ALA nano (1 μ M) has the potential to enhance growth, the high of the rice from the base to the end, number of shoot (branches) per plant, the yield of bracts per clump, main length, seed number, number of good seed per clump, bad seed per clump, and 100 seed of paddy. Therefore, the use of ALA nano is alternative for farmer to be used to increase growth and productivity. It is also safe for environment.

Key words: 5-Aminolevulinic acid, Biomass, Plackett-Burman design, and Box-Behnken design

.....
¹ Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thung song, Nakhon Si Thammarat, Thailand

² Faculty of Agriculture, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thung song, Nakhon Si Thammarat, Thailand

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
สารบัญ	4
สารบัญตาราง	5
สารบัญภาพ	5
กิตติกรรมประกาศ	6
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	7
1.2 วัตถุประสงค์	9
1.3 ขอบเขตการศึกษา	9
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ	9
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 กรด 5-อะมิโนสิวาลินิก	11
2.2 Nanofertilizers (ปุ๋ยนาโน)	14
2.3 โครงสร้างทางเคมีและการใช้ประโยชน์ของไคตินไคโตซาน	16
2.4 ข้าวมีสีและคุณค่าทางโภชนาการ	19
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุ	24
3.2 อุปกรณ์	24
3.3 วิธีการทดลอง	25
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 การเตรียมปุ๋ยชีวภาพอนุภาคนาโน ALA-Chitosan	30
4.2 การเตรียมไคโตซานเพื่อจับกับ ALA	30
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและ ข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	52
5.2 ข้อเสนอแนะ	52
บรรณานุกรม	53
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารและสารเคมี	60
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์	61
ภาคผนวก ค ผลการทดสอบทางสถิติ	64

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณองค์ประกอบของสารอาหารในเมล็ดข้าวหอมนิล	16
2.2 คุณค่าทางโภชนาการของข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ	16
4.1 สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโตซานที่จับตัวกับ ALA มาตรฐาน	27
4.2 สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโตซานที่จับตัวกับ ALA ชีวภาพ	28
4.3 การเจริญเติบโตของต้นข้าว ด้านความยาวคอรวง ความยาวรวง ความสูงของต้นข้าวจากโคนถึงปลายใบ ความยาวใบ และจำนวนการแตกกอ (แขนง)	44
4.4 จำนวนเมล็ดต่อรวง จำนวนเมล็ดลีบต่อรวง จำนวนเมล็ดดีต่อรวง และน้ำหนักข้าวเปลือก 100 เมล็ด	45

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การสังเคราะห์เตตระไพโรลรวมถึงคลอโรฟิลล์และฮีโมในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เริ่มจากการรวมตัวของซัคซินิลโคเอ (1) และไกลซีน (2) จนกระทั่งได้เป็นคลอโรฟิลล์	6 7
2.2 โครงสร้างทางเคมีของโคโตซานและการรวมตัวกับ ALA เพื่อเป็นอนุภาคนาโน	10
2.3 โครงสร้างของเซลลูโลส (a) chitin (b) และโคโตซาน (c)	11
4.1 น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง <i>Rhodospseudomonas palustris</i> JP255 (ก) และนำไปพรีซ ทรายาร์ จนได้เป็น ALA ชนิดผง (ข)	24
4.2 ความสามารถในการละลายของโคโตซานที่ระดับ 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น	25 38
4.3 สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ 1.5%โคโตซาน ที่จับตัวกับ ALA ความเข้มข้น 100 (ก) 200 (ข) 300 (ค) 400 (ง) 500 (จ) 600 (ฉ) μM (กำลังขยาย 40X)	26
4.4 การตรวจหาโครงสร้างของผงชีวภัณฑ์ ALA Nano ที่เตรียมขึ้นมาด้วยเครื่อง FTIR	29
4.5 การใช้เครื่อง Sonicate เพื่อเร่งปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนประจุระหว่าง ALA และโคโตซาน	30 41
4.6 การวิเคราะห์ภาพด้วยเครื่อง SEM ของโคโตซาน (ก) แป้งมันฝรั่ง (ข) ALA (ค) และ ALA Nano (ง) ที่กำลังขยาย 100x (EHT 2.00 kV)	31
4.7 การวิเคราะห์ภาพด้วยเครื่อง SEM ของโคโตซาน (ก) แป้งมันฝรั่ง (ข) ALA (ค) และ ALA Nano (ง) ที่กำลังขยาย 10 K (EHT 2.00 kV)	32
4.8 การวิเคราะห์ภาพด้วยเครื่อง SEM ของโคโตซาน (ก) แป้งมันฝรั่ง (ข) ALA (ค) และ ALA Nano (ง) ที่กำลังขยาย 30 K (EHT 2.00 kV)	33
4.9 การวิเคราะห์ภาพด้วยเครื่อง SEM ของ ALA-starch ที่กำลังขยาย 100x (1ก)	34

- 10 K (2ก) 100 K (3ก) และ ALA-Chitosan Starch ที่กำลังขยาย 100x (1ข)
 10 K (2ข) 100 K (3ข)
- 4.10 การวิเคราะห์ภาพด้วยเครื่อง SEM ของ ALA-Chitosan ที่กำลังขยาย 1K (ก) 35
 5K (ข) และ 30 K (ค)
- 4.11 แสดงผลการเก็บรักษา ALA nano ที่อุณหภูมิต่างกัน 36
- 4.12 ย้ายต้นกล้าอายุ 1 เดือนจากสภาพเพาะชำลงในกระถาง (ก) รดน้ำวันละครั้ง 40
 จนครบ 1 เดือนจึงเริ่มสเปรย์สารรอบที่ 1 (ข) และเว้นระยะห่างประมาณ
 2 สัปดาห์จึงเริ่มสเปรย์สารรอบที่ 2 (ค)
- 4.13 การสเปรย์สารจะใช้ขวดสเปรย์ที่บรรจุสารขวดละ 15 มิลลิลิตรสเปรย์จนทั่ว 41
 ต้นข้าว โดยการใช้อุปกรณ์กำบังทิศทางของลม
- 4.14 ต้นข้าวเริ่มแตกรวงอ่อนเมื่ออายุ 3 เดือน (ก) หลังจากนั้นอีก 3 สัปดาห์จึงเริ่ม 42
 แตกเป็นเมล็ดข้าว (ข)
- 4.15 เริ่มเก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อต้นข้าวอายุ 4 เดือนโดยนำมาวัดหาขนาดคอรวงและ 42
 ความยาวรวง (ก) จากนั้นนำไปตากแดดเพื่อไล่ความชื้น (ข) และนับจำนวน
 เมล็ดดีเมล็ดลีบต่อรวง (ค)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติปีงบประมาณ 2560 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร.ธนากร คำสุด ผศ.อรพิน รัตนสุภา และผู้ร่วมวิจัยทุกท่านที่สละเวลาในการดำเนินงานทุกขั้นตอนอย่างเต็มที่ทำให้งานมีประสิทธิภาพเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะนางสาว ชวิญเรื่อน แดงหน้า ที่ช่วยเหลืองานด้านการเตรียมสารและการทดลองในโรงเรือน นอกจากนี้ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย และสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้มาโดยตลอด และขอขอบคุณสุخي พรหมมาศ และ คุณศิริวรรณ ปานเมือง นักวิทยาศาสตร์สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ได้ช่วยเหลือให้ความสะดวกในการทดลองงานวิจัยนี้ได้สำเร็จลง

ทำนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีได้กล่าวนามในที่นี้ที่มีส่วนช่วยสนับสนุนการวิจัยให้สำเร็จด้วยดี

ผศ.ดร.อังคณา ไสเกื้อ และคณะ

กันยายน 2561

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ข้าวเป็นพืชอาหารสำคัญชนิดหนึ่งของโลก ให้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตสูง ประชากรในภูมิภาคเอเชียนิยมบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักมากกว่าภูมิภาคอื่นๆ การผลิต การบริโภค และการค้าข้าวจึงมีศูนย์กลางอยู่ในทวีปเอเชีย สำหรับการผลิตโดยส่วนใหญ่มักเกิดในพื้นที่ที่มีการบริโภคของประชากรในแหล่งผลิต ประเทศที่มีบทบาทในการส่งออกข้าวมากที่สุดคือประเทศไทย รองลงมา คือ อินเดีย เวียดนาม จีน และพม่า ตามลำดับ (กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, 2556) ปัจจุบันการบริโภคข้าวเพื่อสุขภาพกำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก ผู้คนจึงหันมานิยมบริโภคข้าวมีสีเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากข้าวมีสี มีแร่ธาตุและวิตามินที่สำคัญต่อร่างกายมากกว่าข้าวขาว โดยข้าวมีสีในประเทศไทยมีหลายชนิด ทั้งที่เป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสง ได้แก่ ข้าวเก่า ข้าวมันปู ข้าวหอมมะลิแดง และข้าวสังข์หยด เป็นต้น และข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง ได้แก่ ข้าวหอมนิล และข้าวไรซ์เบอร์รี่ เป็นต้น แต่การผลิตข้าวให้มีคุณภาพ มีความปลอดภัย จะต้องใช้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพสูง ซึ่งข้าวพันธุ์หอมนิล เป็นข้าวที่ไม่ไวต่อช่วงแสง มีอายุการเก็บเกี่ยว 90-100 วัน ใน 1 ปี สามารถปลูกได้ถึง 3 ครั้ง และเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวทั่วไปแล้วข้าวหอมนิลมีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าถึง 7 เท่า (กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2555) การทำการเกษตรอินทรีย์เป็นระบบการผลิตหนึ่งที่น่าสนใจถึงสภาพแวดล้อม เน้นการใช้สารอินทรีย์ในการปรับปรุงบำรุงดินให้มีความอุดมสมบูรณ์ ปัจจุบันการแพร่กระจายของพื้นที่ดินเค็ม ดินเปรี้ยว เป็นปัญหาที่สำคัญ ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืชและทำให้ผลผลิตทางการเกษตรลดลง สภาพความกดดันจากดินทำให้พืชเกิดการขาดน้ำชักนำให้เกิด Reactive Oxygen Species (ROS) นำไปสู่กระบวนการ lipid peroxidation ซึ่งเป็นสาเหตุให้เซลล์พืชเสียหายและตายในที่สุด (Balesstrasse *et al.*, 2006; Inze and Montagu, 2002) การปรับปรุงให้พืชสามารถเจริญเติบโตภายใต้สภาวะกดดันจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะการทำนา ซึ่งมีพื้นที่กระจายตัวทุกภูมิภาค มีรายงานว่ากรด 5-อะมิโนลีวูลินิก (ALA) ซึ่งเป็นสารชีวภาพที่สามารถผลิตโดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตสามารถนำมาใช้ทดแทนปุ๋ยได้ และช่วยให้พืชทนต่อสภาวะความเครียดจากกรดและต่าง นอกจากนี้ยังลดผลกระทบจากความเครียดจากความเย็น (chilling stress) และความแห้งแล้ง (drought stress) (Al-thabet, 2006) ALA สังเคราะห์จากกลูตาเมต เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบเตตระไพโรล เช่น คลอโรฟิลล์ ไฟโคบิลิน อิม และยูบิควิโนน มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต ทั้งพืช สัตว์ สาหร่าย และแบคทีเรีย ช่วยเพิ่มรงควัตถุที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง (Sasaki *et al.*, 1995; Hotta *et al.*, 1997) ส่งเสริมให้พืชนำไปใช้ในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ไปเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไนเตรดรีดักเทส (Nitrate reductase) มีผลต่อการนำไนเตรตเข้าสู่รากและยังช่วยตรึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีรายงานการใช้สารดังกล่าวกับพืชหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ผักโขม กระเทียม หัวไชเท้า แตงกวา ข้าวบาเลย์ และข้าวสาลี (Tanaka *et al.*, 1992) พบว่าการใช้ ALA ที่ความเข้มข้น 10-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ฉีดพ่นต้นนุ่นสามารถลดความเป็นพิษที่เกิดกับรากทั้งยังช่วยเพิ่มปริมาณน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้ง (Memon *et al.*, 2009) มีรายงานว่า การนำ ALA มาใช้ฉีดพ่นต้นแปะก๊วยจะช่วยเพิ่มสารฟลาโวนอยด์และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้ (Feng *et al.*, 2011) และยังสามารถนำไปฉีดพ่นต้นกล้าของถั่วคัตซุ (kudzu) เพื่อช่วยในการเพิ่มผลผลิตและคุณค่าทางโภชนาการ ALA มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงการเจริญเติบโตของพืช และอัตราผลตอบแทนเช่นเดียวกับ คาร์บอน และไนโตรเจน (Maruyama *et al.*, 2010) ดังนั้นสารชีวภาพ ALA จึงมีบทบาทที่สำคัญที่จะช่วยเกษตรกรและผู้บริโภคให้ได้ข้าวที่ให้ผลผลิตสูง ทั้งยังช่วยลดต้นทุนการผลิตและทำให้

เกษตรกรได้ใช้สารที่มีคุณภาพไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพผู้ใช้และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ALA เป็นกรดอะมิโนคีโตสลายตัวได้ง่าย มีรายงานการนำ 1% สารละลาย ALA มาตรฐาน (60 mM) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 50°C พีเอช 2.35 ALA จะสามารถคงตัวจนถึง 37 วัน เมื่อนำ 1% สารละลาย ALA มาตรฐานที่พีเอช 4.81 จะมีค่าครึ่งชีวิต (half-lives) เท่ากับ 257 ชั่วโมง แต่ถ้าพีเอช 7.53 กลับมีค่าครึ่งชีวิตเพียง 3 ชั่วโมง สำหรับอัตราการสลายตัวจะเพิ่มสูงขึ้น 1.5 เท่า ทุกๆ อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น 10°C (Elffson *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงความคงตัวและคุณสมบัติทางเคมีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีของ ALA อีกด้วย (Chang *et al.*, 1996) ในโลกแห่งเทคโนโลยีมีการนำความก้าวหน้ามาสู่วงการอุตสาหกรรมมากขึ้นโดยมีการทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ดีขึ้นและมีความแตกต่าง สามารถทำให้สารที่อยู่ในรูปของเหลวมีความคงตัวมากขึ้น โดยกลายมาอยู่ในรูปของแข็ง ไม่เว้นแม้แต่อุตสาหกรรมยาซึ่งไม่ได้ต้องการข้อมูลการตลาดจากผู้บริโภคแต่มีจุดมุ่งหมายที่ การออกฤทธิ์ทางยา ทำอย่างไรให้ตัวยาค่อยๆ ปล่อยออกมา ทำอย่างไรไม่ให้องค์ประกอบของยาทำปฏิกิริยากันเอง ทั้งหมดนี้เราสามารถแก้ปัญหาได้ด้วยนาโนเทคโนโลยี มีการนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ประโยชน์ทั้ง อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมเกษตร ซึ่งประโยชน์หลักๆ ได้แก่ลดการทำปฏิกิริยาของ สารสำคัญต่อสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อากาศ น้ำ หรือสารเคมี ลดอัตราการระเหยหรือการปลดปล่อยสารสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก ช่วยให้ง่ายต่อการนำไปใช้ สามารถควบคุมการปลดปล่อยสารให้ได้ตรงตามวัตถุประสงค์ และช่วยเพิ่มปริมาณสาร กรณีที่ใช้ในปริมาณน้อยๆ ในส่วนผสมจำนวนมากเพื่อให้เกิดการผสมที่ทั่วถึงกัน ลดค่าใช้จ่าย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (Wilson and Shah, 2007) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค encapsulation ซึ่งเป็นกระบวนการที่สารหรือส่วนผสมของสารถูกเคลือบด้วยสารชนิดอื่น สารที่ถูกเคลือบ (coated) หรือถูกยึดจับไว้ (entrapped) ส่วนใหญ่จะเป็นของเหลว สารที่นำมาเคลือบจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสาร มีความหนืดต่ำที่ระดับความเข้มข้นสูง มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดอิมัลชันที่มีความเสถียรและสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารภายใต้สภาวะและช่วงเวลาที่ต้องการ สารที่นำมาใช้เคลือบนั้นจะต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือย่อยสลายได้ เพื่อนำไปใช้สำหรับการเกษตรแบบยั่งยืน (Trubiano and Lacourse, 1988; Shahidi and Han, 1993) ไคโตซานเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไคตินที่ผ่านกระบวนการ deacetylation สามารถย่อยสลายได้และไม่เป็นพิษ มีการนำมาใช้ควบคุมการปลดปล่อยปุ๋ย (CRF/ Controlled release fertilizer) (Wu and Liu, 2008) สามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้มากเพราะโครงสร้าง ประกอบด้วยกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl) และอะมิโน (amino group) กลุ่มอะมิโนในไคโตซานมีค่า pKa เท่ากับ 6.2-7.0 ฉะนั้นไคโตซานจึงมีประจุเป็นบวกการละลายน้ำจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่ตัวทำละลายเป็นกรด (pKa < 6.2) (Cho *et al.*, 1998) จากที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นแล้วว่า ALA จะสลายตัวได้ง่ายเมื่ออยู่ในสภาวะที่พีเอชเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นการนำไคโตซานมาใช้เคลือบ ALA จึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งในการทำปฏิกิริยากันเพื่อช่วยรักษาความคงตัวของ ALA เอาไว้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำไคโตซานมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเคมีสิ่งทอ การบำบัดน้ำเสีย เครื่องสำอาง ทางการแพทย์ และทางการเกษตร (Muzzarelli, 1996) เมื่อ ALA จับกับไคโตซานดีแล้วจะถูกนำไปอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพื่อให้กลายเป็นผง จากนั้นจึงมาใช้เพิ่มคุณภาพและผลผลิตข้าวพันธุ์หอมนิลที่ปลูกในกระถางซึ่งเป็นพื้นที่จำกัด โดยวิธีการปลูกข้าวแบบนี้จะช่วยให้ประหยัดพื้นที่ สามารถปลูกได้ในพื้นที่จำกัด ให้ผลผลิตดีและมีคุณภาพไม่แพ้กับการปลูกข้าวในนา นอกจากการประหยัดพื้นที่ แล้วยังเป็นการประหยัดน้ำ ปุ๋ย สามารถดูแลรักษา กำจัดวัชพืช ศัตรูพืช ด้วยระบบอินทรีย์ได้ง่าย สามารถปลูกข้าวได้ตามต้องการ ไม่ต้องเพาะปลูกตามฤดูกาล สามารถปลูกข้าวได้หลายรุ่น เหมาะกับการปลูกข้าวในระดับครัวเรือนตามแนวเศรษฐกิจพอเพียง ลดค่าใช้จ่ายภายในครัวเรือนสามารถควบคุมคุณภาพผลผลิตได้เป็นอย่างดี (เจตนิพิฐ, 2555) ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษารวมวิธีการผลิตอนุภาคผงนาโน ALA-chitosan จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่มีสาร ALA โดยวิธีเอนแคปซูลชัน

กับโคโตซานจากธรรมชาติที่มีความจำเพาะสามารถจับกันได้อย่างพอดี เนื่องจากคุณสมบัติของห่ออนุพันธ์ที่เหมาะสมกัน และการทำงานของสารที่จับกันพอดีนี้ที่พีเอชต่ำจะช่วยรักษาความคงตัวของปุ๋ยให้มากยิ่งขึ้น และเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ทางการเกษตรเพื่อเพิ่มผลผลิตของข้าวพันธุ์หอมนิล (ซึ่งเป็นข้าวมีสี ชนิดไม่ไวแสง สามารถปลูกได้หลายครั้งต่อปีในพื้นที่จำกัด) และยังช่วยเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้กับเมล็ดข้าว โดยเป็นการเปลี่ยนอาหารให้เป็นยา ช่วยเสริมสร้างความปลอดภัยให้แก่ผู้ผลิตและผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อเตรียมผงปุ๋ยชีวภาพนาโนจาก ALA (จากน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง) ที่สามารถจับกับโคโตซานโดยกระบวนการ Encapsulation

1.2.2 เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาผงปุ๋ยชีวภาพนาโน ALA-chitosan ที่อุณหภูมิ และเวลาแตกต่างกัน

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของผงปุ๋ยชีวภาพนาโน ALA-chitosan ต่อการเพิ่มคุณภาพและผลผลิตของข้าวมีสี พันธุ์ไม่ไวแสง พันธุ์หอมนิลในโรงเรือน

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 เตรียมหัวเชื้อและเพิ่มปริมาณ ALA จากน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodospseudomonas palustris* JP255 สายพันธุ์ที่ผู้วิจัยคัดแยกได้จากดินนาข้าวในพื้นที่ดินเปรี้ยว

1.3.2 การเตรียมผงปุ๋ยชีวภาพนาโนจาก ALA ที่จับกับโคโตซาน ด้วยวิธี Encapsulation แล้วทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี เช่น รูปร่าง ขนาด การละลายน้ำ (Solubility) ดัชนีการละลายน้ำ (Water solubility index/WSI) ดัชนีการดูดซับน้ำ (Water absorption index/WAI) ความชื้น (Moisture content) ลักษณะทางสัณฐาน ความคงตัว และอัตราการสลายตัวของผง ALA (เมื่อเก็บรักษาที่ -20, 4 และ 30°C) ทุก 15 วัน เป็นเวลา 6 เดือน

1.3.3 นำผงปุ๋ยไปทดสอบกับต้นข้าวมีสี ชนิดไม่ไวแสง (พันธุ์หอมนิล) ในโรงเรือนโดยการแช่เมล็ด สเปรย์ที่ต้นข้าวในระยะแตกกอ และแตกรวง) ต่อการเพิ่มคุณภาพและผลผลิต เช่น ความสูงของต้นข้าว จำนวนการแตกกอ จำนวนรวงต่อกอ จำนวนเมล็ดลีบและเมล็ดดีต่อรวง น้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือกต่อ 100 เมล็ด น้ำหนักเมล็ดข้าวต่อกระถาง คุณค่าทางสารอาหาร ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และสารประกอบฟีนอลิกรวม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ด้านวิชาการ ได้ขยายความรู้เทคนิคนาโนเทคโนโลยีที่นิยมในวงการอุตสาหกรรมไปยังวงการเกษตร เพื่อนำความรู้มาใช้ประโยชน์ได้จริงเป็นผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค

1.4.2 ด้านนโยบาย เศรษฐกิจ/พาณิชย์ อุตสาหกรรม สร้างศักยภาพและความสามารถในการ

พัฒนาทางเศรษฐกิจโดยการวิจัยเพื่อพัฒนา สร้างมูลค่าและนำไปสู่การแข่งขันและการพึ่งพาตนเองของเกษตรกรทุกกลุ่ม

1.4.3 ด้านสังคมและชุมชน นำผลงานไปใช้กับชุมชนเนื่องจากโจทย์ที่เกิดขึ้นนี้ได้จากความต้องการของคนในชุมชน เป็นการเพิ่มมูลค่า นำรายได้มาสู่ครอบครัวชุมชนทั้งยังส่งเสริมคุณภาพชีวิตให้อีกทางด้วยและสามารถนำผลงานไปตีพิมพ์ในวารสารทางด้านยาและการเกษตรระดับชาติและนานาชาติ

1.4.4 การเผยแพร่: สามารถนำไปเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร และนำไปใช้ประโยชน์ในวงกว้างได้

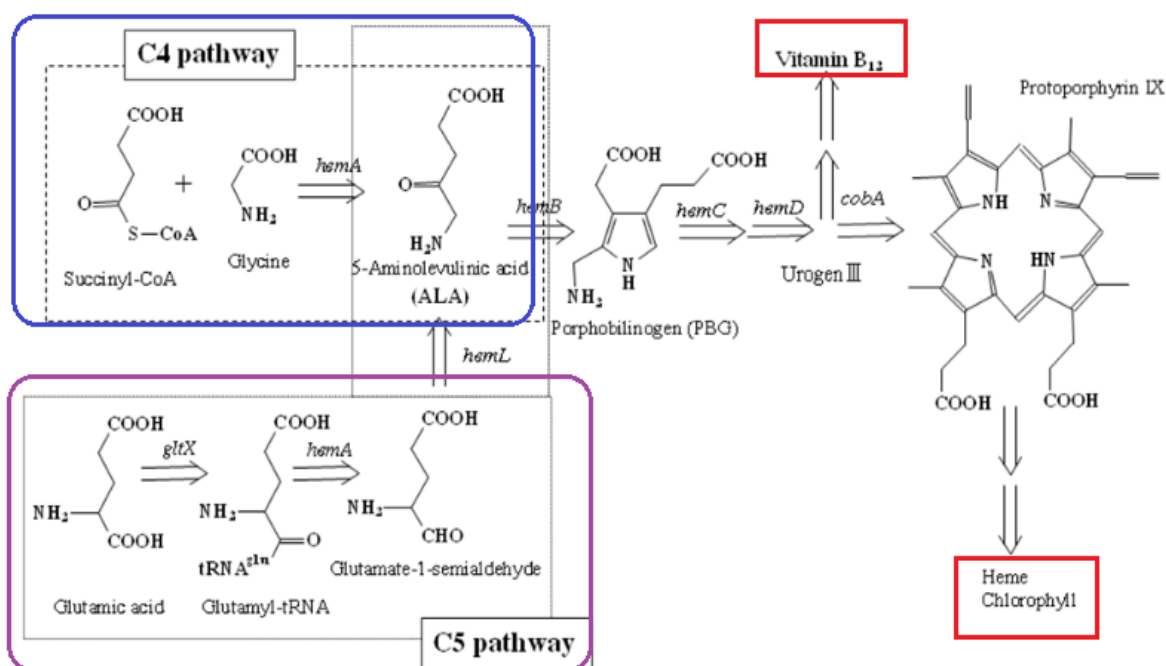
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรด 5-อะมิโนลิวลินิก

กรด 5 อะมิโนลิวลินิก (ALA) หรือกรดเตลต้า-อะมิโนลิวลินิก หรือกรดเตลต้า-อะมิโนลิวลินิกเนต หรือ กรด 5-อะมิโน-4-ออกโซเพนทาโนอิก เป็นกรดอะมิโนคีโต (aminoketo acid) ที่มีจำนวนคาร์บอน 5 อะตอม มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 167.6 g/mole และมีสูตรทางเคมีคือ $H_2NCH_2COCH_2COOH$ มีค่าคงที่ของการแตกตัว pK_{a1} เท่ากับ 3.90 และค่า pK_{a2} เท่ากับ 8.05 (Fukada *et al.*, 2005) ALA มีรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มสังเคราะห์แสง สามารถใช้ทดแทนปุ๋ยเคมีได้ เนื่องจากแบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิต ALA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบเตตระไพโรลหลายชนิดรวมทั้งพอร์ไฟริน (ภาพที่ 1) ที่พืชนำไปใช้ในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และฮีม (Stobart and Ameen-Bukhari, 1984) จึงมักมีรายงานการนำ ALA มาใช้กับพืชชั้นสูงหลายชนิดโดยจะส่งผลต่อการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์และเพิ่มสีเขียวในพืช เมื่อใช้ ALA ที่ความเข้มข้นสูงๆ (มากกว่า 10 Mm) จะส่งเสริมพืชที่มีสีอ่อนให้มีสีเขียวเข้มขึ้นและเพิ่มการสะสมของสารตัวกลางที่สร้างคลอโรฟิลล์ เช่น โปรโตคลอโรฟิลไลด์ และโปรโตพอร์ไฟริน IX ดังนั้นจึงจัด ALA เป็นสารปราบวัชพืชตัวใหม่ เมื่อพืชสีเขียวได้รับแสงภายหลังการใช้ ALA ในที่มืด ปริมาณสารตัวกลางในการสร้างคลอโรฟิลล์ที่สูงนี้จะทำให้พืชไวต่อแสงและเกิดปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายของแสง (photodynamic) เป็นเหตุให้เกิดการบาดเจ็บของพืชและ เกิดการรวมตัวของออกซิเจนโมเลกุลเดี่ยว ในทางกลับกันเมื่อใช้ ALA ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ โดยการสเปรย์ที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 1.8 mM และแทรกที่ความเข้มข้น 60 μM สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มผลผลิตของพืช ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมนไซโตไคนินที่ชื่อเบนซิลดีนีนซึ่งเป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ยิ่งไปกว่านั้นเบนซิลดีนีนยังไปกระตุ้นการสร้าง ALA อีกด้วย นอกจากนี้มีรายงานว่า ALA ยังไปเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส (nitrate reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีการใช้ไนเตรท (nitrate assimilation) เอนไซม์ดังกล่าวมีผลต่อการนำไนเตรทเข้าสู่พืช ในดินไนเตรทจะถูกนำผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์รากพืชแล้วจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไตรต์ตรงบริเวณราก หรือถูกส่งไปยังลำต้นผ่านทางท่อลำเลียงน้ำ (Nishihara *et al.*, 2003) นอกจากนี้ ALA ยังช่วยเพิ่มการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในที่มีแสง และยับยั้งการปลดปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ในที่มืด (Hotta *et al.*, 1997a,b) ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆ เมื่อฉีดพ่นบริเวณใบและรากนอกจากจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชแล้ว ยังไปเพิ่มการสะสมคลอโรฟิลล์ การสังเคราะห์แสงในพืชผักเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลให้พืชผักมีผลผลิตเพิ่มมากขึ้น 10-60% โดยมีรายงานว่าเมื่อฉีดพ่น ALA ที่ระดับความเข้มข้น 100 ppm ให้กับผักขม (*Spinacia oleracea*) oilseed rape (*Brassica campestris* L. supsp. *Napus*) กระเทียม (*Allium sativum* L.) และหัวไชเท้า (*Raphanus sativas* var. *radicula* DC) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 140 140 139 163 และ 145% ตามลำดับ และเมื่อฉีดพ่น ALA ที่ระดับความเข้มข้น 30 ppm ให้กับข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare* L.) และข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้ถึง 141 และ 108% ตามลำดับ (Tanaka *et al.*, 1992) Virgin และ McEwen (1995) ได้ศึกษาผลของ ALA ต่อปริมาณของโปรโตคลอโร

ฟิลไลด์ (เป็นรงควัตถุดูดซับแสงสีแดงและน้ำเงิน) เมื่อถูกริติวซ์จะกลายเป็นคลอโรฟิลล์ของยอดอ่อน (hypocotyls) ต้นถั่ว Virgin (1996) ยังได้ศึกษาผลของ ALA ต่อปริมาณโปรโตคลอโรฟิลไลด์ ใน mesocotyl ของข้าวโพดและข้าวโอ๊ต เมื่อเจริญในสภาวะไม่มีแสง พบว่า ALA ที่ระดับความเข้มข้น 5 mM ช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์โปรโตคลอโรฟิลไลด์ ใน mesocotyl ได้ นอกจากนี้ Sasaki และคณะ (1995) พบว่า ALA ที่ระดับความเข้มข้น 500 mg/l จะช่วยส่งเสริมการเจริญ การสังเคราะห์แสง (ส่งเสริมกิจกรรมของระบบแสง I และ II) การสะสมของไฟโคไซยานิน และคลอโรฟิลล์ ของสาหร่ายเกลียวทอง (*Spirulina platensis*) มีรายงานการใช้ ALA ที่มีจำหน่ายทางการค้าชื่อ Pentakeep-V ที่ระดับ 0.02-0.08% สามารถใช้ช่วยในการขยายพันธุ์อินทผลัม (*Phoenix dactylifera* L.) ที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เจริญเติบโตได้เร็วขึ้น การผลิตสารสี และการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น สินค้าดังกล่าวผลิตโดยบริษัท Cosmo seiwa agriculture จำกัด ประเทศญี่ปุ่น เป็นเจ้าแรกที่จัดจำหน่าย ALA จากแบคทีเรียสังเคราะห์ โดยมีการระบุว่า ALA จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ส่งเสริมการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ควบคุมการหายใจของพืชในเวลากลางคืน ช่วยขยายปากใบ ส่งเสริมให้พืชทนต่อสภาพแวดล้อมที่กดดันต่างๆ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ปริมาณแสงที่พืชได้รับ และการสูญเสียน้ำจากความแห้งแล้ง เป็นต้น นอกจากนี้ ALA สามารถช่วยรักษาความชื้นของสปีไบไว้ ช่วยเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของต้นพืช โดยเฉพาะการนำน้ำเลี้ยงเซลล์จากการหมักของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงไปใช้สเปรย์ต้นข้าวเพื่อให้ทนต่อสภาวะที่บีบคั้นจากความเค็ม และยังเพิ่มปริมาณคลอโรฟิลล์และกิจกรรมของเอนไซม์อะมิลเลส กลูตาไธโอนรีดักเทส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Nunkaew *et al.*, 2014)



ภาพที่ 1 การสังเคราะห์เตตระไพโรลรวมถึงคลอโรฟิลล์และฮีมในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่เริ่มจากการรวมตัวของซัคซินิลโคเอ (1) และไกลซีน (2) จนกระทั่งได้เป็นคลอโรฟิลล์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Surpin *et al.*, 2002

จากการที่ ALA เป็นกรดอะมิโนตามธรรมชาติจึงไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์ ในปัจจุบันราคานำเข้าสารดังกล่าวจากต่างประเทศมีราคาสูงมาก ทำให้สินค้าดังกล่าวไม่ได้รับความนิยมในประเทศไทย ดังนั้นทางเลือกหนึ่งคือการผลิตสารดังกล่าวใช้เอง โดยใช้แบคทีเรียสังเคราะห์แสงสายพันธุ์ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมและแหล่งอาหารที่เหมาะสมจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดต้นทุน ทำให้เกษตรกรได้ใช้สารชีวภาพที่มีคุณภาพสูง ราคาถูก และสามารถใช้งานได้สะดวกโดยการฉีดพ่นทั้งตัวเซลล์ที่ยังมีชีวิตของแบคทีเรียสังเคราะห์แสงดังกล่าวและสาร ALA ที่ผลิตขึ้นมาโดยได้กลไกการทำงานถึงสองต่อคือได้สารเร่งการเจริญเติบโตและได้แบคทีเรียที่ช่วยตรึงธาตุไนโตรเจนจากดินได้เป็นอย่างดีอีกด้วย

ALA เป็นกรดอะมิโนคีโตสลายตัวได้ง่าย ความคงตัวขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ความเข้มข้น และเวลา (Didden *et al.*, 1994) แต่กลไกการเกิดปฏิกิริยายังไม่ค่อยมีการศึกษากันนัก พบว่าเมื่อกลุ่มอะมิโนอยู่ในรูปแบบส่อนแล้วทำปฏิกิริยากับหมู่คีโตนของโมเลกุล ALA จะก่อให้เกิดผลผลิตเป็น 2,5-(β -carboxyethyl)dihydropyrazine (CHPY) (Novo *et al.*, 1996) มีรายงานการนำ 1% สารละลายมาตรฐาน ALA (60 mM) เกรดวึเคราะห์ (Sigma) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วปรับพีเอชเป็น 2.35 และ 4.80 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C พบว่าที่พีเอช 2.35 สารจะสามารถคงตัวจนถึงวันที่ 37 นอกจากนี้ 1% สารละลาย มาตรฐาน ALA 1% (ที่พีเอช 4.81) จะมีค่าครึ่งชีวิต (half-lives) เท่ากับ 257 ชั่วโมง แต่ถ้าที่พีเอช 7.53 สารกลับมีค่าครึ่งชีวิตเพียง 3 ชั่วโมงเท่านั้น สำหรับอัตราการสลายตัวจะเพิ่มสูงขึ้น 1.5 เท่า ทุกๆ อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น 10°C (เมื่อศึกษาอุณหภูมิ ระหว่าง 37-85°C ที่พีเอช 7.53) ALA จะคงตัวที่พีเอช 2.35 เมื่อกลุ่มอะมิโนอยู่ในรูปกรดอ่อน ($pK_a = 8.05$) จากการทำนายโดยสมการพบว่า 1% สารละลายมาตรฐาน ALA ที่ระดับพีเอช 7.53 จะมี shelf-life ($t_{90\%}$) เป็น 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20°C (Elffson *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเปลี่ยนแปลงความคงตัวและคุณสมบัติทางเคมีจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีผง ALA อีกด้วย (Chang *et al.*, 1996) ในโลกแห่งเทคโนโลยีมีการนำความก้าวหน้ามาสู่วงการอุตสาหกรรมได้เสมอ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ดีขึ้นและมีความแตกต่าง สามารถทำให้สารที่อยู่ในรูปของเหลวมีความคงตัวมากขึ้นโดยกลายมาอยู่ในรูปของแข็ง ไม่เว้นแม้แต่อุตสาหกรรมยาซึ่งไม่ได้ต้องการข้อมูลการตลาดจากผู้บริโภคแต่มีจุดมุ่งหมายที่การออกฤทธิ์ทางยา ทำอย่างไรให้ตัวยาค่อยๆ ถูกปล่อยออกมา ทำอย่างไรไม่ให้องค์ประกอบของยาทำปฏิกิริยากันเอง และช่วยรักษาคุณภาพของสารชีวภาพที่สำคัญ เช่น วิตามินต่างๆ คาโรทีนอยด์ รวมทั้งสารให้กลิ่นรส หรือสารที่ใช้ปรุงแต่งหรือส่วนประกอบของอาหารให้อยู่ในสภาพเดิมนานที่สุด (Gharsallaoui *et al.*, 2007) หรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาเพื่อลดปัญหาสารที่ไวต่อการสลายตัว อันเนื่องมาจากความไม่คงตัวทางกายภาพหรือเคมี (Dziezak, 1998) ทั้งหมดนี้เราสามารถแก้ปัญหาได้ด้วยเทคนิคไมโครเอนแคปซูลชัน (microencapsulation) มีการนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้ประโยชน์ทั้งอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสิ่งทอ ด้านการเกษตร และอุตสาหกรรมอาหาร

2.2 Nanofertilizers (ปุ๋ยนาโน)

ปุ๋ยมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมการผลิตและคุณภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตข้าว แต่กลับพบว่ายังมีงานวิจัยที่นำเอาสารกลุ่ม nanomaterials (NMs) มาใช้น้อยมาก (He *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011; Gong and Dong, 2012; Sirisena *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014) NMs หมายถึงวัสดุที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1-100 นาโนเมตร ดังนั้นปุ๋ยนาโนจึงจัดเป็น NMs ที่ช่วยให้ธาตุอาหารจำนวน 1 ชนิด หรือมากกว่า 1 ชนิด ไปช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช ช่วยเพิ่มผลผลิต หรือไปช่วยให้การแสดงออกของปุ๋ยอีกชนิดได้ดียิ่งขึ้น (Liu and Lal, 2015) มีการศึกษาที่พิสูจน์ให้เห็นผลอย่างมีนัยสำคัญของปุ๋ยนาโนที่สามารถปลดปล่อยธาตุอาหารอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ได้ผลผลิตที่สูงกว่าและยังช่วยลดปัญหามลพิษทางดินได้อีกด้วย (Naderi and Danesh-Sharaki, 2013) ปุ๋ยนาโนสามารถแทรกซึมเข้าสู่เซลล์พืชได้โดยตรงเนื่องจากปุ๋ยมีขนาดเล็กกว่าขนาดของรูที่ผนังเซลล์ (cell wall pores) ซึ่งมีขนาด 5-20 นาโนเมตร

ข้าวเป็นสินค้าอันดับสองที่มีกำลังการผลิตมากที่สุดในโลก พื้นที่การปลูกข้าวทั่วโลกสูงถึง 162.3 ล้านเฮกตาร์ในปี ค.ศ. 2012 และให้ผลผลิตประมาณ 738.1 ล้านตัน เฉลี่ยเป็น 4.5 ตันต่อเฮกตาร์ (FAO, 2014) ข้าวจัดเป็นธัญพืชสำคัญที่นิยมบริโภคมากที่สุดของประเทศในกลุ่มอาเซียน ประกอบด้วยสารอาหารหลากหลายเช่นคาร์โบไฮเดรต โปรตีน เส้นใย วิตามิน และแร่ธาตุ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าข้าวมีสารทางพฤกษเคมีและสารประกอบฟีนอลิก (Tian *et al.*, 2005; Aguilar-Garcia *et al.*, 2007) ที่ไม่พบในผลไม้และผัก (Bunzel *et al.*, 2001) สารประกอบฟีนอลิกนี้มีความสำคัญต่อสุขภาพ ลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจ โรคเบาหวานชนิด 2 และโรคมะเร็งบางชนิด (Liu, 2007) การป้องกันโรคหัวใจ ด้านการก่อกลายพันธุ์ และต้านมะเร็ง เป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกซึ่งเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ที่สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ และทำให้การเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ลดน้อยลง (Potter, 2005) นักวิจัยได้ศึกษาพบว่าข้าวมีสีจะยังมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าข้าวขาว (Jang and Xu, 2009) แต่อย่างไรก็ตามผู้บริโภคก็มักจะนิยมบริโภคข้าวขาวจึงมีนักวิจัยพบว่าการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระให้แก่ข้าวนั้นสามารถทำได้ในช่วงแช่เมล็ดและระหว่างกระบวนการงอกของเมล็ด (Sawaddiwong *et al.*, 2008; Islam and Becerra, 2012) ทำนองเดียวกันสภาพแวดล้อมก็เป็นอีกปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการเจริญและการสะสมของสาร การปรับปรุงวิธีการนำธาตุอาหารไปใช้โดยควบคุมปริมาณและคุณภาพจะช่วยให้ได้ผลผลิตตามที่ต้องการ ดังนั้นปุ๋ยนาโนจึงจัดมีบทบาทที่จะช่วยให้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกได้มองเห็นความสำคัญและประโยชน์ของเทคโนโลยี “นาโน” และสนับสนุนเงินทุนมากมายในการศึกษาและพัฒนาทางด้านนี้ ในปี ค.ศ. 2003 ประเทศสหรัฐอเมริกาได้อนุมัติงบประมาณจำนวนสูงถึง 33,000 ล้านบาท ในขณะที่ประเทศญี่ปุ่นก็ให้ความสำคัญไม่แพ้กันโดยมีการลงทุนสูงถึง 30,000 ล้านบาท สำหรับประเทศไทยมีการสนับสนุนและพัฒนาความก้าวหน้าเทคโนโลยีเกี่ยวกับนาโนมากขึ้น ได้มีการจัดตั้งศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (นาโนเทค) ภายใต้สังกัดของ สวทช. นาโนเทคได้คิดค้นนวัตกรรม “ปุ๋ยอินทรีย์เคมีนาโน” ผลิตปุ๋ยสูตรผสม NPK ชนิดควบคุมการปลดปล่อยธาตุอาหารสำหรับพืชเศรษฐกิจด้วยเทคนิคการเคลือบนาโนและพัฒนาสูตรเคลือบปุ๋ยขึ้นมาเป็นพิเศษร่วมกับการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ของ

ทาง วว. นักวิจัยใช้กระบวนการเคลือบเม็ดปุ๋ยด้วยวัสดุนาโนโพลิเมอร์จากธรรมชาติที่มีรูพรุนและมีขนาดอนุภาคเล็กระดับนาโนเคลือบเข้าไปในเม็ดปุ๋ยทำให้สามารถควบคุมปริมาณและระยะเวลาการปลดปล่อยธาตุอาหารตามความต้องการของพืช ที่ช่วยให้เกษตรกรไทยมีผลผลิตทางการเกษตรดีขึ้น ช่วยลดต้นทุนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมทำให้ไม่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพงมาก ปุ๋ยอินทรีย์เคมีนาโนมีคุณสมบัติพิเศษคือละลายช้า ปล่อยธาตุอาหารได้ตามกำหนดคือตั้งแต่ 3-6 เดือนช่วยลดปริมาณการใช้ปุ๋ยของเกษตรกร ทำให้การใช้งานปุ๋ยมีประสิทธิภาพสูงขึ้น เพิ่มผลผลิตต่อไร่ ช่วยเกษตรกรลดต้นทุนการผลิตและมีรายได้เพิ่มขึ้น ที่สำคัญการใช้ปุ๋ยอินทรีย์เคมีนาโนยังส่งผลดีต่อธรรมชาติ และเกษตรกรผู้ใช้ปุ๋ย

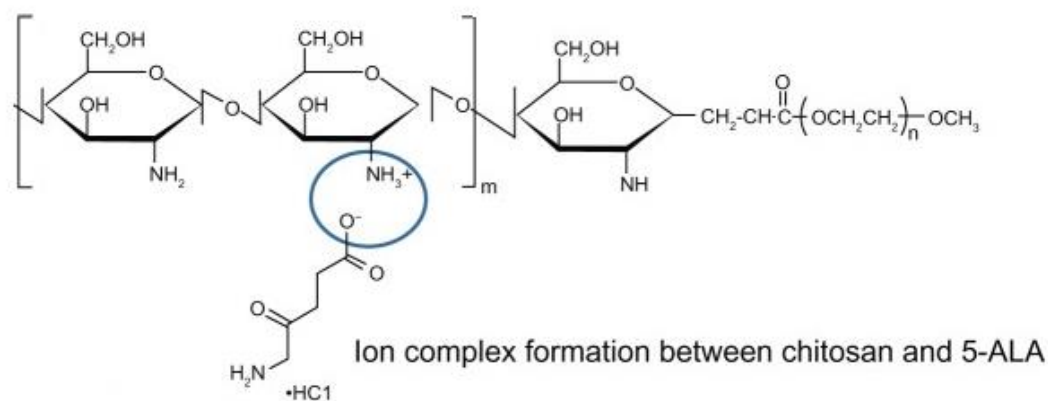
ตารางที่ 1 ความก้าวหน้าของการนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้ในการผลิตปุ๋ย (Cui *et al.*, 2010)

คุณสมบัติที่ต้องการ	ตัวอย่างการนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้
ควบคุมอัตราการปลดปล่อยธาตุอาหาร	เป็น Smart fertilizers มีการนำนาโนเทคโนโลยีมาใช้กับปุ๋ยตัวเดิมที่เคยใช้อยู่
ช่วยในการละลายและการกระจายตัวของแร่ธาตุและสารอาหารรอง	ปุ๋ยที่มีอนุภาคขนาดเล็ก พัฒนารูปแบบการละลายน้ำและการกระจายตัวของสารที่ไม่ละลายน้ำในดิน ลดการดูดซับของดินและการตรึงสาร และเพิ่มสารที่มีประโยชน์ในดิน
ประสิทธิภาพการตรึงสาร	โครงสร้างขนาดเล็กจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของปุ๋ย และอัตราการตรึงสารอาหารในดินไปใช้เพิ่มผลผลิต
ควบคุมรูปแบบการการปลดปล่อยสาร	อัตราการปลดปล่อยและรูปแบบการปลดปล่อยของปุ๋ยที่ละลายน้ำด้วยการทำแอนแคปซูลชั้นปุ๋ยด้วยสารกึ่งละลายน้ำเช่น เรซินโพลิเมอร์ (resin polymer) แวกซ์ (wax) และซัลเฟอร์ (sulphur)
ประสิทธิภาพของช่วงเวลาในการปลดปล่อยสารอาหาร	โครงสร้างอนุภาคนาโนจะสามารถขยายช่วงเวลาการปลดปล่อยสารลงสู่ดิน
อัตราการสลายตัวของสารอาหาร	โครงสร้างอนุภาคนาโนสามารถชะลออัตราการสลายสารอาหารลงสู่ดินโดยกระบวนการ leaching และ/หรือ leaking

อีกทั้งเมื่อใช้ปุ๋ยไประยะยาว ก็ทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์เหมือนเดิม มีความร่วนซุยมากขึ้น ทำให้การปลูกพืชง่ายขึ้น เป็นทางเลือกให้แก่เกษตรกรไทย และเอกชนผลิตปุ๋ยของไทยสามารถนำเทคโนโลยีใหม่ไปใช้และสร้างมูลค่าให้แก่สินค้าเกษตรได้มากยิ่งขึ้นลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศ

2.2.1 ประวัติการผลิต ALA อนุภาคนาโน

มีรายงานการทำอนุภาคนาโนของ ALA โดยการจับกับ copolymer คือ methoxy poly ethylene glycol - chitosan (PEG-Chito) เพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งลำไส้ด้วยเทคนิคการใช้แสง (photodynamic therapy/PDT) การเตรียมอนุภาคนาโนทำได้โดยการจับกันของไอออนอย่างสมบูรณ์ระหว่างประจุลบของ ALA บริสุทธิ์กับประจุบวกของไคโตซาน เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นอนุภาคทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 200 นาโนเมตร มี ALA อยู่ตรงแกนกลางของอนุภาค เมื่อนำมาใช้รักษาโรคมะเร็งลำไส้พบว่าสามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ (Chung *et al.*, 2013) การใช้ methoxy poly ethylene glycol มาจับกับไคโตซานเพื่อเป็นตัวเชื่อมและตัวปรับพีเอช (buffer) ของสารไม่ให้พีเอชต่ำจนเกินไปซึ่งอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุผิว และทำให้เกิดปัญหาระหว่างการรักษาโรคได้ ไคโตซานเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ เป็นองค์ประกอบของไคตินที่ผ่านกระบวนการ deacetylation (Wu and Liu, 2008) ไคโตซานสามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้มากเพราะโครงสร้างประกอบด้วยกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl) และอะมิโน (amino group) โดยกลุ่มอะมิโนในไคโตซานมีค่า pK_a เท่ากับ 6.5 ยิ่งไปกว่านั้นเป็นที่ทราบกันดีว่าไคโตซานเป็นตัวกระตุ้นการส่งผ่านของยาผ่านไปยังลำไส้และอวัยวะเป้าหมายนั้นคือเซลล์มะเร็ง จากการที่ไคโตซานมีประจุเป็นบวกจึงทำให้สามารถละลายน้ำได้ดีในตัวทำละลายเป็นกรด (Cho *et al.*, 1998) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้นำปุ๋ยชีวภาพ ALA นาโน มาใช้ทางการเกษตรจึงไม่จำเป็นต้องใช้ methoxy poly ethylene glycol มาเชื่อมกับไคโตซานก่อนจะจับกับ ALA (ภาพที่ 2) จึงสามารถลดขั้นตอนการผลิตและยังลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้อีกด้วย



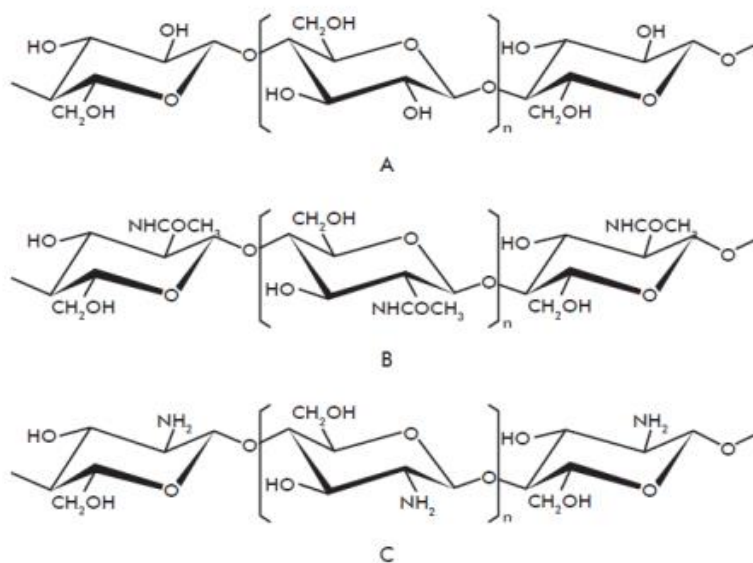
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของไคโตซานและการรวมตัวกับ ALA เพื่อเป็นอนุภาคนาโน

ที่มา: Chung *et al.* (2013)

นอกจากการใช้ประโยชน์ของ ALA ต่อการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรแล้ว ยังเป็นที่ทราบกันว่าไคโตซานเองประกอบด้วยไนโตรเจนซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช ช่วยให้พืชดึงธาตุอื่นไปใช้และยังช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศและดิน จึงสามารถนำไปใช้ทำเป็นปุ๋ยชีวภาพได้ ปัจจุบันมีการนำไคตินและไคโตซานมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ด้านการเกษตรอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะเกษตรอินทรีย์ และพบว่าสารดังกล่าวนี้ สามารถเพิ่มผลผลิตและทำให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพดีขึ้น ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลงเนื่องจากลดการใช้ปุ๋ยเคมีและยาฆ่าแมลง

2.3 โครงสร้างทางเคมีและการใช้ประโยชน์ของไคตินและไคโตซาน

ในปี ค.ศ. 1811 Henri Braconnot ค้นพบสารไคตินครั้งแรกในเห็ด ต่อมาปี ค.ศ. 1823 Odier เรียกโพลิเมอร์ (polymer) ชนิดนี้ว่า “ไคติน” คำว่าไคตินมาจากคำว่า “Chiton” ในภาษากรีกมีความหมายว่าเกราะหุ้ม และค้นพบสารไคโตซานในปี ค.ศ. 1859 โดย Rouget จากการต้มสารไคตินกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (Shahidi *et al.*, 1999) ส่วนไคโตซาน (Chitosan) เป็นอนุพันธ์ (derivative) ชนิดหนึ่งของไคตินที่ได้จากการทำปฏิกิริยาดีอะซีทิลเลชัน (deacetylation) (ภาพที่ 3) ของไคตินในสารละลายต่างเข้มข้น สารไคตินและไคโตซานเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติ สามารถแตกสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เกิดการแพ้ ไม่วิวไฟและไม่เป็นพิษ (non-phytotoxic) แหล่งวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตสารไคตินและสารไคโตซานในปัจจุบัน ได้แก่ เปลือกกุ้ง กระดองปู และแกนปลาหมึก ซึ่งเป็นของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง ซึ่งเปลือกกุ้งและกระดองปูมีส่วนประกอบที่สำคัญคือไคติน (20-30%) โปรตีน (30-40%) และแคลเซียมคาร์บอเนต (30-50%) โดยสารไคตินและไคโตซานมีลักษณะเป็นของแข็ง สีขาว นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการนำเส้นใยของเชื้อรามาผลิตสารไคตินและไคโตซานอีกด้วย (Chandrkrachang, 2002)



ภาพที่ 3 โครงสร้างของเซลลูโลส
ที่มา: Sharp (2013)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าและนำไคตินและไคโตซานไปใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง การบำบัดน้ำ วัสดุทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านเกษตรอินทรีย์ (organic agriculture) เนื่องจากไคตินและไคโตซานมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ไนโตรเจนจะถูกปลดปล่อยออกจากโมเลกุลอย่างช้าๆ รวมทั้งช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศและดิน ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพืช และกระตุ้นการนำแร่ธาตุไปใช้ ซึ่งเป็นที่น่ายินดีว่าไคตินและไคโตซานเป็นสารธรรมชาติที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านเกษตรได้อย่างมากมายดังนี้

2.3.1 การเคลือบเมล็ดพันธุ์พืช (Seed coating)

การเคลือบเมล็ดพันธุ์พืชมีประโยชน์หลายประการ เช่น ป้องกันการปลอมปนพันธุ์ (โดยใช้สีเคลือบเป็นเอกลักษณ์) ป้องกันเมล็ดพันธุ์จากโรคและแมลงศัตรูพืช และยืดอายุการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ เป็นต้น Sharathchandra *et al.* (2004) นำสารละลายไคโตซาน 0.05% มาเคลือบเมล็ด pearl ฉีดพ่นทางใบ และเคลือบเมล็ดร่วมกับฉีดพ่นทางใบเพื่อต้านทานการเกิดโรคน้ำค้ำที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerospora graminicola* พบว่ากรรมวิธีที่เคลือบเมล็ดสามารถลดการเกิดโรคได้ 42.5% และป้องกันการเกิดโรค 38% กรรมวิธีฉีดพ่นทางใบสามารถลดการเกิดโรคได้ 67% และป้องกันการเกิดโรค 25% และกรรมวิธีเคลือบเมล็ดร่วมกับการฉีดพ่นทางใบสามารถลดการเกิดโรคได้ 69% และป้องกันการเกิดโรค 23% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารไคโตซานสามารถชักนำให้เกิดระบบต้านทานในพืช

2.3.2 สารเร่งการเจริญเติบโต

ไคโตซานถูกใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ให้ผลเช่นเดียวกับฮอร์โมนเร่งราก ใช้กระตุ้นการงอกของกิ่งชำไม้ดอกและไม้ประดับต่างๆ โดยนำส่วนของพืชที่ต้องการชำแช่ในสารละลายเจือจางของไคโตซานประมาณ 2 ชั่วโมงก่อนนำไปปักชำในวัสดุเพาะ Chandkrachang (2002) พบว่าการฉีดพ่นไคโตซานความเข้มข้น 10-15 ppm ในนาข้าวส่งผลให้ข้าวมีปริมาณเพิ่มขึ้น 41.7 – 91.5% (ขึ้นอยู่กับพื้นที่ที่ทำการเพาะปลูก) และการใช้ไคโตซานความเข้มข้น 10 ppm ฉีดพ่นกล้วยไม้ซึ่งมีผลเร่งการเจริญเติบโตของใบใหม่ ในขณะที่ Siri-Upathum (2002) พบว่าเมื่อนำ oligochitosan ที่เตรียมขึ้นโดยวิธีอบรังสีมาเติมลงในอาหารสำหรับเพาะกล้วยไม้ด้วยความเข้มข้น 50-75 ppm สามารถช่วยเร่งอัตราการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ได้ดี สำหรับการศึกษากับต้นเยอบีรา *Wanichapongpan et al.* (2001) พบว่า ปริมาณไคโตซานที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนดอกและกระตุ้นการเจริญเติบโตของใบคือ 60 ppm และ 20-40 ppm ตามลำดับ

2.3.3 สารยับยั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และเชื้อไวรัสบางชนิด

อนุพันธ์ของไคตินและไคโตซาน มีผลต่อการต้านทานและกำจัดเชื้อราและแบคทีเรียบางประเภทที่ก่อโรคให้กับพืช เช่น โรคครากเม่า โคนเม่า ราน้ำค้ำ ราข้าว โรคแคงเกอร์ โรคใบติด โรคใบจุด โรคใบส้มในนาข้าวและอื่นๆ ซึ่งเกิดจากโครงสร้างทางประจุ และสร้างเอนไซม์ซึ่งทำให้ย่อยสลายทำลายเชื้อราโรคพืชได้อย่างดีและยังพบว่าไคโตซานสามารถเข้าสู่เซลล์เชื้อราและทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างและสะสมของ RNA จึงทำให้เชื้อราถูกยับยั้งการเจริญเติบโต โดย Xu *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษพบว่าสารไคโตซานสามารถควบคุมราสีเทา (gray mold) ที่เกิดจากเชื้อ *Botrytis cinerea* ในองุ่นและแอปเปิ้ลได้ และจากการศึกษาของ Prapagdee *et al.* (2007) พบว่าไคโตซาน 1% สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *F. solani* f.sp. *glycine* และยับยั้งการเกิดโรค sudden death syndrome (SDS) ของถั่วเหลือง แต่ในเชื้อราบางประเภทและแบคทีเรียบางชนิดที่มีประโยชน์จะมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเมื่อใช้อนุพันธ์ของไคตินและไคโตซาน นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Beauséjour *et al.* (2003) พบว่าการใช้เชื้อ *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76 และไคโตซานร่วมกันในการควบคุมโรคตักสะเก็ด (scab) ของมันฝรั่งทั้งในโรงเรือนและในแปลงทดลอง ซึ่งสามารถลดการเกิดโรคได้ถึง 44% และเพิ่มผลผลิตอีกด้วย

2.3.4 อาหารสัตว์ (Animal feeds)

ไคโตซานถูกใช้เป็นตัวรวมตะกอน (flocculant) ซึ่งสามารถจับโปรตีนจากน้ำเสียและโปรตีนที่ได้นี้สามารถนำกลับมาใช้เป็นอาหารสัตว์ หรือเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ เช่น ปลา วัว ควาย อีกทั้งอาหารที่ได้ยังมีความปลอดภัยและประหยัด สามารถถูกย่อยและดูดซึมได้ง่าย นอกจากนี้ไคโตซานยังเป็นเส้น

ใยอาหาร (food fiber) ของสัตว์ปีกจำพวกไก่ และเป็ด Chandkrachang (2002) ได้มีการศึกษาการเสริมโคโตซานในอาหารซึ่งเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของสุกร พบว่าสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการเปลี่ยนเป็นเนื้อให้ดีขึ้น คุณภาพซากดีขึ้น สุกรโตเร็ว ได้น้ำหนักดี ทำให้ลดต้นทุนค่าอาหารและปริมาณการใช้ยาปฏิชีวนะได้มากและยังมีการศึกษาการนำโคโตซานมาใช้เลี้ยงกุ้ง พบว่าประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการเจริญเติบโตดีขึ้น มีอัตราการรอดสูง และได้กุ้งที่มีน้ำหนักรวมสูงสุด เนื่องจากได้รับโคโตซานซึ่งอยู่ในสภาพที่กุ้งสามารถดูดซึมนำไปใช้ได้ทันที ทำให้กุ้งกินอาหารได้มากขึ้น อาหารถูกเปลี่ยนเป็นเนื้อเร็วขึ้นทำให้กุ้งมีสุขภาพแข็งแรงและโตเร็ว

2.3.5 ปุ๋ยธรรมชาติ (Fertilizers/ Soil Stabilizers)

ปุ๋ยน้ำในรูปของปุ๋ยเข้มข้นนอกจากมีประโยชน์มากมายแล้วแต่ก็มีข้อเสียหลายประการ เช่น แห้งเร็วเกินกว่าที่สารอาหารจะซึมผ่านเข้าทางใบ เป็นพิษต่อพืชและง่ายต่อการถูกชะล้างด้วยน้ำฝน โคโตซานทั้งในรูปมาตรฐานหรือในรูป microcrystalline ถูกใช้ผสมในปุ๋ยน้ำสำหรับพืชไม้ดอก มีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถยึดติดกับผิวของพืช ผิวดินได้ดี ทนต่อการถูกชะล้าง ลดการระเหยของน้ำสามารถเป็นตัวควบคุมการปลดปล่อยสารอาหารและยาให้กับพืชได้ ทำให้การแพร่กระจายตัวของปุ๋ยน้ำดีขึ้นและมีความคงตัวสูง อนุพันธ์โคตินและโคโตซานนำมาใช้ในการปรับดินที่มีส่วนประกอบของที่มีดินเหนียวมาก โดยจะเพิ่มความพรุนในดิน การดูดซับน้ำ การอุ้มน้ำ และการควบคุมอัตราการชะล้าง (erosion) ของดินรวมทั้งยังเป็นตัวพา (carrier) สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ โดยปลดปล่อยสารดังกล่าวอย่างช้าๆ ให้ผลต่อเนื่องได้นานและอัตราคงที่ ตามอัตราการย่อยสลายของอนุพันธ์โคตินและโคโตซาน ลดปัญหาการใช้สารเกินความจำเป็นซึ่งมีผลต่อพืช และสภาพดิน Poulsen et al. (2008) ได้ทำการศึกษาโดยใช้โคตินผสมกับปุ๋ยหมักจากใบไม้และโคตินผสมกับปุ๋ยหมักที่ได้จากเศษขยะในบ้านเรือน พบว่าปุ๋ยทั้ง 2 ชนิดที่ผสมโคตินชักนำให้เกิดเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับปุ๋ยหมักที่ไม่ผสมโคติน นอกจากนี้ยังทำให้กระบวนการ N – mineralization ทำงานได้ดีขึ้น

2.4 ข้าวมีสีและคุณค่าทางโภชนาการ

2.4.1 อนุกรมวิธานของข้าว (Rice Taxonomy)

ข้าวเป็นพืชตระกูลหญ้า (Gramineae) จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในตระกูลหญ้า เป็นพืชล้มลุก มีใบยาวและบาง สามารถจัดลำดับได้ดังนี้ (Lu, 1999)

Kingdom	Plantae
Division	Magnoliophyta
Class	Angiospermae
Subclass	Monocotyledonae
Family	Gramineae
Genus	<i>Oryza</i>
Species	<i>sativa, glaberrima</i>

2.4.2 การเจริญเติบโตของข้าว

ข้าวสามารถจำแนกการเจริญออกเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงการการเจริญเติบโตทางลำต้น

และใบ (vegetative growth) ประกอบด้วย 2 ระยะคือ ระยะต้นกล้า (seedling stage) และระยะแตกกอ (tillering stage) ช่วงการเจริญเติบโตทางด้านการสืบพันธุ์ (reproductive growth)

1. การเจริญเติบโตทางลำต้นและใบ (vegetative growth) โดยมี 2 ระยะคือ

- ระยะต้นกล้า (seedling stage) เป็นระยะจากข้าวงอกจนกระทั่งถึงข้าวแตกกอใช้ระยะเวลาประมาณ 20 วัน (ขึ้นอยู่กับพันธุ์) สิ้นสุดระยะนี้ต้นข้าวจะมีใบประมาณ 5-6 ใบ
- ระยะแตกกอ (tillering stage) นับจากข้าวเริ่มแตกกอดังกล่าวจนถึงข้าวเริ่มสร้างช่อดอกอ่อน (panicle initiation) ใช้เวลาประมาณ 30-50 วัน หลังจากระยะต้นกล้าขึ้นอยู่กับสภาพแสงของพันธุ์ข้าวด้วย

2. การเจริญเติบโตทางด้านการสืบพันธุ์ (reproductive growth) เริ่มจากข้าวเริ่มสร้างช่อดอกอ่อน ผ่านระยะตั้งท้อง (booting stage) จนถึงโผล่ช่อดอกและผสมเกสร (heading, flowering, fertilization) โดยจะใช้ระยะเวลาช่วงนี้ประมาณ 30-35 วัน การพัฒนาการของเมล็ด (grain development) ได้แก่ ภายหลังจากผสมเกสร ซึ่งรังไข่ที่ได้รับการผสมจะเจริญเติบโต อาหารที่ได้รับการสังเคราะห์แสงจะถูกสะสมในเมล็ดเป็นลำดับ ในหลายแห่งจึงเรียกระยะนี้ว่า ระยะสะสมในเมล็ด (grain filling period) ในระยะแรกจะอยู่ในระยะน้ำนม (milky) เปลี่ยนเป็นแป้งอ่อน (dough) จนกระทั่งเมล็ดสุก (ripening) เป็นแป้งแข็งและเป็นระยะสุกแก่หรือเก็บเกี่ยว (harvest maturity) จะใช้เวลาการพัฒนาการของเมล็ดทั้งหมดประมาณ 25-30 วัน (จำรัส, 2534)

2.4.3 ข้าวมีสีที่นิยมปลูกในประเทศไทย

ปัจจุบันการบริโภคข้าวพันธุ์ที่สีขาว และยังผ่านการขัดสีอีกซึ่งทำให้สารอาหารสำคัญที่มีประโยชน์ของข้าวหมดไป และยังมีการพัฒนาพันธุ์ข้าวที่มีความต้านทานต่อโรคและแมลงหรือให้ผลผลิตเพิ่มมากขึ้น ด้วยเหตุนี้ทำให้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองหลายสายพันธุ์ที่มีความสำคัญสูญหายไป เช่น ข้าวมีสีเข้ม สีแดง และสีดำ ล้วนเป็นแหล่งสะสมสารอาหารและยาป้องกันรักษาโรคที่มีมากกว่าข้าวขาว 2-3 เท่า

ข้าวมีสีสายพันธุ์ที่พบเห็นได้บ่อยคือข้าวมันปู ซึ่งมีสีแดง และข้าวกำ เป็นข้าวเหนียวสีดำที่นิยมนำไปทำขนมหวานพวกเปียกข้าวหรือข้าวเหนียวมูล รวมทั้งข้าวหอมนิล ข้าวเหนียวกัญญา ต่อมาด้วยความตระหนักถึงความสำคัญของสายพันธุ์ข้าวต่างๆ ก็มีทั้งภาครัฐและเอกชนที่ให้ความจริงจังต่อการพัฒนาพันธุ์ข้าวมีสีทั้งหลาย กลายเป็นพันธุ์ข้าวใหม่ๆ ขึ้นมา โดยปรับปรุงพันธุ์ข้าวให้มีโภชนาการสูง เพื่อให้ข้าวนั้นมีคุณค่าในการบำบัดและป้องกันโรคควบคู่กันไปด้วย ข้าวมีสีที่นิยมปลูกในประเทศไทยมี ดังนี้

1) ข้าวขาวสายพันธุ์สินเหล็ก

เป็นข้าวที่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์ จากศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ข้าวขาวสินเหล็ก โดดเด่นในเรื่องของธาตุเหล็ก มีธาตุเหล็กสูง และมีสารขัดขวางการดูดซึมธาตุเหล็กน้อยจึงทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้ดีกว่าข้าวอื่น ๆ และยังมีน้ำตาลต่ำ การเป็นสายพันธุ์ที่มีค่าดัชนีน้ำตาลต่ำ ซึ่งเหมาะกับผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวาน

2) ข้าวสีดำพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่

เป็นพันธุ์ข้าวมีสีที่เกิดจากสาร แอนโทไซยานิน ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านการ

เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ช่วยในการหมุนเวียนของกระแสโลหิต และชะลอความเสื่อมของเซลล์ร่างกาย คือมีกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระสูง ช่วยป้องกันไม่ให้อนุมูลอิสระไปทำลายเซลล์ ช่วยยับยั้งไม่ให้เลือดจับกันเป็นก้อน จึงช่วยลดอัตราการเกิดโรคหัวใจ เส้นเลือดอุดตันในสมอง

3) ข้าวหอมนิล

ข้าวพันธุ์ตั้งต้นของสายพันธุ์ลินเหล็ก และไรซ์เบอร์รี่ มีคุณค่าโภชนาการสูง รวมสารวิตามินบีครบ วิตามินอี โปรตีน เหล็กและสารอาหารอื่นๆ สูง ธาตุเหล็กที่มีอยู่ในข้าวหอมนิลเมื่อรับประทานทานเข้าไปร่างกายสามารถดูดซึมได้เลย ร่างกายนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการบำรุงโลหิตได้ทันทีและยังช่วยในเรื่องของการทำงานของระบบประสาท และระบบผิวหนัง ช่วยเสริมสร้างกระดูกและฟัน ป้องกันโรคโลหิตจาง ป้องกันไม่ให้เป็นตะคริว มีเส้นใย ช่วยให้อุณหภูมิร่างกายเย็น ป้องกันมะเร็งลำไส้ ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล ป้องกันโรคไขมันสะสมในเส้นเลือด และสำหรับข้าวหอมนิล จัดว่าเป็นพันธุ์ข้าวที่มีสารต้านอนุมูลอิสระป้องกันโรคเรื้อรังต่างๆ ได้ดีกว่าผลไม้ตระกูลเบอร์รี่ถึง 3 เท่า

4) ข้าวเหนียวดำ

มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด สารสกัดของข้าวเหนียวดำ ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดงในลำไส้เล็ก เพื่อช่วยในการดูดซึมอาหารได้ดียิ่งขึ้น

5) ข้าวเหนียวกัญญา

ปรากฏชื่อในตำรายาไทย กล่าวว่าข้าวเหนียวกัญญามีใบสีดำ เมล็ดสั้นมีสีน้ำตาลออกมันขม ใช้เป็นยาบำรุงโลหิต สำหรับข้าวเหนียวกัญญานั้น มีชื่อเสียงเรื่องของการบำรุงเลือด เนื่องจากธาตุเหล็กสูง และมีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดระดับไขมันในเส้นเลือด และต้านโลหิตจาง

6) ข้าวแดง

มีหลายสายพันธุ์ เช่น ข้าวมันปู ข้าวประดู่แดง ข้าวสังข์หยด ข้าวดอกมะขาม ข้าวหอมมะลิแดง เป็นสายพันธุ์ที่มีสาร GABA สูง มีสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ฟอสฟอรัส และธาตุเหล็กในปริมาณที่สูงและยังมีแร่ธาตุต่างๆ เช่น ทองแดง วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินซี เป็นต้น มีประโยชน์ต่อระบบประสาทและสมอง มีสารแคโรทีนที่จะเปลี่ยนเป็นวิตามินเอสูงกว่าข้าวขัดสี ช่วยป้องกันโรคหัวใจ ช่วยในระบบย่อยอาหารทำงานปกติ รักษาอาการมือเท้าบวมหรือฝืนขึ้น และป้องกันโรคนอนไม่หลับ

7) ข้าวกำลังมัด

เป็นข้าวเหนียวที่มีสีม่วงดำทั้งเยื่อหุ้มเมล็ดและเนื้อเมล็ด รวงมีสีดำ เมื่อหุงสุกแล้วจะมีกลิ่นหอม ผิวมัน รสชาติอร่อย ข้าวกำลังมัดมีฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับวิตามินอี แต่คุณสมบัติดีกว่า เนื่องจากโครงสร้างของสารสำคัญมากกว่าในวิตามินอี ทำให้การยึดเกาะพื้นผิวมีประสิทธิภาพมากขึ้น ช่วยในเรื่องต่อกระดูก และใช้เป็นยารักษาโรคตามภูมิปัญญาท้องถิ่น ทั้งอาการตกเลือดหลังคลอด โรคท้องร่วง

8) ข้าวสังข์หยด

ข้าวสังข์หยดหรือที่คนสงขลาเรียกว่าข้าวเหนียวแดง มีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าข้าวพันธุ์อื่นๆ คือมีกากใยอาหารสูงจึงมีประโยชน์ในการชะลอความแก่ นอกจากนี้มีโปรตีน ธาตุเหล็ก และฟอสฟอรัสสูงกว่าข้าวพันธุ์อื่นๆ ซึ่งมีประโยชน์ในการบำรุงโลหิต บำรุงร่างกายให้แข็งแรง และป้องกันโรค

ความจำเสื่อม นอกจากนี้ยังมีสารแอนติออกซิแดนท์พวก oryzanol และมี Gamma amino butyric acid (GABA) ช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเป็นมะเร็ง จึงนับได้ว่า ข้าวพันธุ์สังข์หยด เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีคุณค่าทางอาหารสูงมากๆ ชนิดหนึ่ง (อภาวรรณ, 2557)

2.4.4 ข้าวหอมนิล

ข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวที่ได้รับการคัดเลือก และพัฒนาจนได้ข้าวที่มีเมล็ดข้าวกล้องเรียวยาว สีม่วงเข้ม ข้าวกล้องเมื่อหุงสุกจะนุ่มเหนียว และมีกลิ่นหอม น่ารับประทาน ที่สำคัญคือ ข้าวกล้องมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 12.50 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 70 ปริมาณอะมิโนโลสร้อยละ 16 และยังประกอบไปด้วยธาตุเหล็ก สังกะสี ทองแดง แคลเซียม และโพแทสเซียม ซึ่งสูงกว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ตารางที่ 1 และ 2)

ตารางที่ 1 ปริมาณองค์ประกอบของสารอาหารในเมล็ดข้าวหอมนิล

องค์ประกอบ	ปริมาณที่พบ
แป้งอะมิโนโลส	ร้อยละ 12
ธาตุเหล็ก	2.00-2.25 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม
สารต้านอนุมูลอิสระ	292 ไมโครโมลต่อกรัม
น้ำมันรำข้าว	ร้อยละ 18
เส้นใยจากรำข้าว	ร้อยละ 10

ตารางที่ 2 คุณค่าทางโภชนาการของข้าวเจ้าหอมนิลเปรียบเทียบกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 (ขัดขาว)

คุณค่าทางโภชนาการ	ข้าวเจ้าหอมนิล	ข้าวขาวดอกมะลิ 105
โปรตีน (ร้อยละ)	12.56	6.00
คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)	70.00	80.00
ธาตุเหล็ก (มก./100 ก)	3.26	-
สังกะสี (มก./100 ก)	2.90	-
แคลเซียม (มก./100 ก)	4.20	-
โพแทสเซียม (มก./100 ก)	339.40	-
ทองแดง (มก./100 ก)	0.10	-

ที่มา: Chrispeels and David (1994)

1) ลักษณะประจำพันธุ์

ข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวนาสวน ไม่ไวแสง สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี อายุเก็บเกี่ยวสั้น การแตกกอดี ต้านทานต่อโรคไหม้ (Blast) ทนทานต่อสภาพแล้ง (Drought) และดินเค็ม (Salinity) ไม่ต้านทานโรคขอบใบแห้งและแมลง ลักษณะโดยทั่ว ๆ ไป

ความสูงของต้น	75 เซนติเมตร
สีของ ใบ/ลำต้น	เขียวเข้มอมม่วง

เมล็ดข้าวกล้อง	ยาวประมาณ 6.5 มิลลิเมตร มีสีม่วงดำ
เปลือกหุ้มเมล็ดข้าว	มีสีม่วงเข้ม
อายุการเก็บเกี่ยว	95-110 วัน
ผลผลิตเฉลี่ย	400-700 กิโลกรัมต่อไร่

2) ลักษณะทางโภชนาการ

ข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยมีโปรตีนอยู่ในช่วงประมาณ ร้อยละ 10-12.5 มีปริมาณแป้งอะไมล์ประมาณร้อยละ 12-13 มีปริมาณสาร 2-acetyl-1-pyrroline ปานกลางร่วมกับสารหอมระเหยจำเพาะพวก Cyclohexanone ในปริมาณมากมีแคลเซียม 4.2 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ปริมาณธาตุเหล็กแปรปรวนอยู่ระหว่าง 2.25-3.25 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม และธาตุสังกะสีประมาณ 2.9 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ข้าวเจ้าหอมนิลมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงประมาณ 293 ไมโครโมลต่อกรัม ในส่วนของเยื่อหุ้มเมล็ดที่เป็นสีม่วงเข้มประกอบไปด้วยสารแอนโทไซยานิน โพรแอนโทไซยานิน โปโอฟลาโวนอยด์ และวิตามินอี ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสีผสมอาหารตามธรรมชาติ ในส่วนของรำและจมูกข้าว มีวิตามินอี วิตามินบี และกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง ในส่วนของรำมีน้ำมันรำข้าว ร้อยละ 18 เป็นองค์ประกอบ และพบว่ามีสาร omega-3 ประมาณร้อยละ 1-2 ของรำข้าว มีปริมาณเส้นใยที่ย่อยได้ (digestible fiber) สูงถึง ร้อยละ 10 จากข้อมูลทางโภชนาการ นับได้ว่าข้าวเจ้าหอมนิลเป็นข้าวที่มีศักยภาพในการนำมาแปรรูปทางอุตสาหกรรมอาหารสูง เช่น การผลิตผลิตภัณฑ์อาหารจากแป้งข้าวเจ้าหอมนิล รวมทั้งขนมขบเคี้ยว

3.1 วัสดุ

3.1.1 เชื้อ *Rhodospseudomonas palustris* JP255

3.1.2 สารเคมี

- 3.1.2.1 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.1.2.2 กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 3.1.2.3 เมทานอล (Methanol)
- 3.1.2.4 อะลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl₃)
- 3.1.2.5 โพแทสเซียม อะซิเตท (KAc)
- 3.1.2.6 เอทานอล
- 3.1.2.7 กลูตามิก (L-glutamic acid)
- 3.1.2.8 โพแทสเซียมฟอสเฟตโมโนเบสิก (KH₂HPO₄)
- 3.1.2.9 กรดมาลิก (DL-malic acid)
- 3.1.2.10 ยีสต์สกัด (yeast extract)
- 3.1.2.11 ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ((NH₄)₂HPO₄)
- 3.1.2.12 โพแทสเซียมฟอสเฟตไดเบสิก (K₂HPO₄)
- 3.1.2.13 แมกนีเซียมซัลเฟต เฮกซาไฮเดรต (MgSO₄·7H₂O)
- 3.1.2.14 แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต (CaCl₂·2H₂O)
- 3.1.2.15 แมงกานีสซัลเฟต เฮกซาไฮเดรต (MnSO₄·7H₂O)
- 3.1.2.16 ไทอะมีน (Thiamine-HCl)
- 3.1.2.17 กรดนิโคตินิก (Nicotinic acid)
- 3.1.2.18 ไบโอติน (Biotin)
- 3.1.2.19 เปปโตน (Peptone)
- 3.1.2.20 มอลต์สกัด (Malt extract)
- 3.1.2.21 กลูโคส (Glucose)
- 3.1.2.22 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
- 3.1.2.23 เด็กซ์โตรส (Dextrose)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1.3.1 glutamate-malate (GM) (ภาคผนวก ก)

3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1 ขวดแม่โขงแบบแบน ขนาด 150 มิลลิลิตร
- 3.2.2 กระจกตวงขนาด 500 มิลลิลิตร (cylinder)
- 3.2.3 เครื่องชั่งไฟฟ้า (HAUS PA 214 Digital balance) ยี่ห้อ OHAUS
- 3.2.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave): ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HG-50 ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.5 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ยี่ห้อ Biochrom รุ่น Libra S22
- 3.2.6 เครื่องเขย่าหลอด (Vortex) ยี่ห้อ Vortex รุ่น Genie3

- 3.2.7 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Concorc รุ่น C8
- 3.2.8 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Universal 32
- 3.2.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น NB-205 VL
- 3.2.10 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) Telstar รุ่น AV-100
- 3.2.11 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert
- 3.2.12 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
- 3.2.14 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 3.2.15 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Bumer)
- 3.2.16 ครอบป้องกันความชื้น (Moisture Can)
- 3.2.17 เข็มเย็บเย็บปลายกลม (Loop)
- 3.2.18 กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter papers Whatman No.1)
- 3.2.19 เครื่องระเหิดสุญญากาศ ยี่ห้อ EYELA รุ่น FDU 2100
- 3.2.20 หัวกรอง (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 μ M)
- 3.2.21 เครื่อง SEM ยี่ห้อ Carl Zeiss รุ่น Merlin compact
- 3.2.22 เครื่อง FTIR Spectroscopy ยี่ห้อ BRUKER OPTIC รุ่น ALPHA
- 3.2.23 เครื่อง Sonicate ยี่ห้อ SONICS รุ่น VCX130 PB

3.3 การเตรียมปฏิกิริยาพอลิเมอร์ ALA-chitosan

3.3.1 การเตรียม ALA จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

นำแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodospseudomonas palustris* JP255 ที่คัดแยกได้โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว GM modified (อังกฤษ, 2556) บ่มเชื้อในสภาวะแบบมีอากาศน้อย/มีแสง ที่อุณหภูมิ 35°C เก็บเกี่ยวเชื้อที่เวลา 72 ชั่วโมง นำน้ำเลี้ยงเซลล์มาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 rpm นาน 10 นาทีแล้วนำส่วนใสไปใช้ต่อไป

3.3.2 การเตรียมไคโตซานเพื่อจับกับ ALA (ดัดแปลงจาก Shaker *et al.*, 2014)

นำไคโตซาน 150 มิลลิกรัม ละลายใน 2% กรดอะซิติก แล้วตั้งมา 10 มิลลิลิตร เติมน้ำในสารละลาย ALA (จากข้อ 3.3.1) 990 มิลลิลิตร แล้วนำไป sonicate นาน 40 วินาที ที่กระแสไฟฟ้า 120 วัตต์ บนอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปกวนด้วยเครื่อง magnetic stirred นาน 4 ชั่วโมงแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที จะได้อนุภาคนาโนในส่วนใสที่เติม 5% potato starch ลงไปก่อนฟรีซดรายน (ชุด negative control ให้ทำซ้ำทุกขั้นตอนยกเว้นขั้นตอนการเติม ALA)

3.3.3 การทำฟรีซดรายน

ใช้ฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตรบรรจุน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเตรียมสารเคลือบปริมาตร 350

มิลลิลิตร แล้วนำไปเข้าเครื่องเคลือบแผ่นฟิล์มโดยทำให้เย็นอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ -40°C นำไปแช่ข้ามคืนในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80°C จากนั้นนำมาต่อกับเครื่อง Vacuum freeze-drying machine (lyophilizer) กระแสไฟฟ้า 230 โวลต์, 50 Hz แรงดัน 26.5 Pa อุณหภูมิ -45°C นาน 18 ชั่วโมง (Reddy *et al.*, 2009) เมื่อได้ผงปุ๋ยนาโนแล้วให้นำไปบรรจุในถุงซิพทอนความเย็น

3.4 วิเคราะห์คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์

3.4.1 การศึกษาขนาดของอนุภาค

การศึกษาอนุภาคด้วยวิธีการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกวาด (Scanning Electron Microscopy/SEM) โดยวัดขนาดอนุภาคเทียบกับสเกลของกล้องจุลทรรศน์

3.4.2 ดัชนีการละลายน้ำและดัชนีการดูดซับน้ำ (Anderson *et al.*, 1969)

ชั่งตัวอย่างผง ALA 2.5 กรัม ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงที่มีฝาและทราบน้ำหนักแน่นอน เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยคนด้วยแท่งแก้ว และคนทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างส่วนที่ติดมากับแท่งแก้วลงในหลอดหมุนเหวี่ยงโดยใช้น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 2,200 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสลงในถ้วยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105°C จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณดัชนีการละลายน้ำ สำหรับหลอดหมุนเหวี่ยงพร้อมส่วนที่เหลือในหลอด นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณค่าการดูดซับน้ำดังนี้

$$\text{ดัชนีการละลายน้ำ} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างส่วนที่ละลายน้ำ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{ดัชนีการดูดซับน้ำ} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดหมุนเหวี่ยงพร้อมตะกอน} - \text{น้ำหนักหลอดหมุนเหวี่ยง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

3.4.3 ความชื้น (moisture content) (AOAC., 1990)

นำผงอนุภาคนาโน ALA-chitosan น้ำหนัก 2 กรัม ที่ผ่านการบดผ่านตะแกรงขนาด 70 mesh ใส่ลงในภาชนะอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วางภาชนะอะลูมิเนียมในโถดูดความชื้น 20 นาทีโดย

$$\text{MC (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

3.4.4 ประสิทธิภาพการ Encapsulation และ Loading capacity efficiency/EE)

(Shi *et al.*, 2013)

1) ประสิทธิภาพการ encapsulation (The encapsulation efficiency)

วัดจากการกระจายตัวของคอลลอยด์ของอนุภาคนาโน ALA-chitosan ใน น้ำกลั่น โดยมีขั้นตอนเริ่มจากการปั่นเหวี่ยงสารแขวนลอย (suspension) ที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนอนุภาคนาโนมาละลายใน dichloromethane (DCM) เพื่อให้ ALA ถูก ปล่อยออกมา แล้วจึงนำไปตรวจหาปริมาณที่เหลืออยู่ด้วยวิธีของ Mauzerall and Granick (1956)

$$EE\% = \frac{\text{ปริมาณ ALA ที่ถูกตรึงในอนุภาคนาโน}}{\text{ปริมาณ ALA เริ่มต้นที่เติมลงไป}} \times 100\%$$

2) ประสิทธิภาพการบรรจุ ALA (Loading capacity/LC)

อนุภาคนาโน ALA-chitosan ที่ผ่านการฟริชทรายน์จะถูกนำมาชั่งน้ำหนัก แล้วละลายใน DCM แล้วคำนวณจากสูตรดังต่อไปนี้

$$LC\% = \frac{\text{ปริมาณ ALA ที่ถูกตรึงในอนุภาคนาโน}}{\text{น้ำหนักของอนุภาคนาโนหลังฟริชทรายน์}} \times 100\%$$

3.5 ศึกษาการสลายตัวของปฏิกิริยาของ ALA-chitosan (Elfsson *et al.*, 1998)

ผง ALA ที่เก็บรักษานำมาวัดอัตราการสลายตัว ใช้กฎปฏิกิริยาลำดับสอง (the second-order reaction) เขียนโดยใช้สูตร

$$-d[ALA]/dt = k_2 [ALA]^2$$

เมื่อ $[ALA]$ = ความเข้มข้นของ ALA ที่เวลา t

ค่าครึ่งชีวิตต่อลำดับสองของการย่อยสลายของ ALA คำนวณจากสูตร

$$T_{1/2} = 1/[ALA]_0$$

เมื่อ $[ALA]_0$ = ความเข้มข้นเริ่มต้นของ ALA

และ k_2 = ค่าคงที่ที่ได้จากความชันเมื่อพล็อตกราฟ $1/[ALA]$ ต่อเวลา t

3.6 การทำกราฟมาตรฐานและการหาความเข้มข้นของ ALA

นำสารละลาย ALA มาตรฐานที่เจือจางอย่างเหมาะสมที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 และ 200 μM ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมอะซิเตตที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 4.7) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรและเติมอะซิติลอะซิโตนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำส่วนผสมทั้งหมดไป ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างบรรจุน้ำแข็ง หลังจากเติม modified Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 533 นาโนเมตร และเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร ALA กับค่า

การดูดกลืนแสง ในการทดสอบใช้น้ำเลี้ยงเชื้อหรือผงอนุภาคนาโน ALA-chitosan ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเติม แทนสารละลายมาตรฐานจากนั้นเติมสารตามลำดับ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปแทนค่าในสมการ (Mauzerall and Granick, 1956)

3.7 ศึกษาความคงตัวของผงอนุภาคนาโน ALA-chitosan

นำผงอนุภาคนาโน ALA-chitosan ที่เตรียมได้มาแบ่งใส่ถุงซิปลู๊ต ถุงละ 1 กรัม (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ/ ตัวอย่าง) จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4, -20 และ 30°C แล้วนำมาตรวจหาปริมาณ ALA ที่คงเหลือในผงอนุภาคนาโนทุก 15 วัน เป็นเวลา 5 เดือน เมื่อครบ 150 วัน จึงนำมาพล็อตกราฟแสดงอัตราการย่อยสลายของสาร

3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยชีวภาพนาโน ALA-chitosan ในโรงเรือน

การทดลองปลูกข้าวมีสี่สายพันธุ์หอมนิลซึ่งเป็นข้าวไม่ไวแสงที่ ทำการทดลองทำในโรงเรือนใช้การออกแบบการทดลองแบบ Randomized complete block design (จำนวน 5 ซ้ำ) (ดัดแปลงจาก Benzon *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2012) โดยประกอบด้วย 10 ชุดการทดลองดังนี้คือ

- 1) Chitosan (ความเข้มข้นเดียวกับที่ระดับ ALA-nano 1 μM)
- 2) Chitosan (ความเข้มข้นเดียวกับที่ระดับ ALA-nano 5 μM)
- 3) Chitosan (ความเข้มข้นเดียวกับที่ระดับ ALA-nano10 μM)
- 4) ALA Conventional 1 μM
- 5) ALA Conventional 5 μM
- 6) ALA Conventional 10 μM
- 7) ALA-Nano 1 μM
- 8) ALA-Nano 5 μM
- 9) ALA-Nano 10 μM
- 10) Control

สำหรับ conventional fertilizer คือการใช้ปุ๋ย ALA ชีวภาพในรูปแบบเดิม ส่วน ALA Nano คือปุ๋ยอนุภาคนาโน ALA-chitosan ที่ใช้ฉีดพ่นที่ใบข้าวในระยะแตกกอและแตกช่อดอก หลังจากแช่เมล็ดข้าวไว้จนเกิดตุ่มรากเป็นเวลา 2 คืน จากนั้นนำเมล็ดไปเพาะลงในถาดหลุมนาน 15 วัน แล้วย้ายไปปลูกในกระถางขนาด 31x27 เซนติเมตรซึ่งมีดินบรรจุอยู่ 15 กิโลกรัม ให้น้ำที่ระดับความสูงท่วมหน้าดินปลูก 3 เซนติเมตรโดยเติมน้ำทุกวัน หลังจากนั้นรักษาระดับน้ำให้มีความสูงประมาณ 5 เซนติเมตร คอยตรวจดูระดับน้ำทุกวัน หากพบว่าปริมาณน้ำต่ำกว่า 5 เซนติเมตรให้เติมน้ำลงไปเพื่อรักษาระดับไว้ หากข้าวแตกรวงผ่านไปแล้ว 15 วัน งดการเติมน้ำจนกว่าจะถึงระยะเก็บเกี่ยว สำหรับการให้ปุ๋ยแก่ต้นข้าวเมื่ออายุครบ 45 วันให้ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ 50 กรัมต่อกระถาง และให้ปุ๋ยอีกครั้งเมื่อต้นข้าวอายุประมาณ 75 วัน หลังจากที่ดินข้าวออกรวงแล้วให้ใส่ปุ๋ยอินทรีย์ 100 กรัมต่อกระถาง เมื่อข้าวแตกรวง (มีอายุประมาณ 117 วัน) ให้เก็บผลผลิตและวิเคราะห์ผลดังต่อไปนี้

3.8.1 เก็บข้อมูลองค์ประกอบผลผลิต ได้แก่ จำนวนเมล็ดดีต่อรวง และน้ำหนักต่อ 1,000 เมล็ด และผลผลิตรวมต่อพื้นที่

3.8.2 วิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.9 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Nagaia *et al*, 2005)

โดยเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ร่วมกับเมทานอลปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่านาน 30 นาที นำไปวัดอัตราการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่องเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แบบ UV - visible จากนั้นนำมาหาค่าร้อยละของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (% Inhibition activity) ดังสมการ

$$\% \text{ Inhibition activity} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control}

3.10 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Mongolsilp *et al.*, 2004)

นำสารละลายกรดแกลลิกเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก โดยนำสารละลายข้างต้นมาจำนวน 2, 4, 6, 8 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างส่วนสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบนำมาละลายด้วยเอทานอลจำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Folin - Ciocalteu reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 7 นาที แล้วเติม 7% Na_2CO_3 จำนวน 8 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ยในรูปมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อสารสกัด 1 กรัม (mg GAE/g extracted)

3.11 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

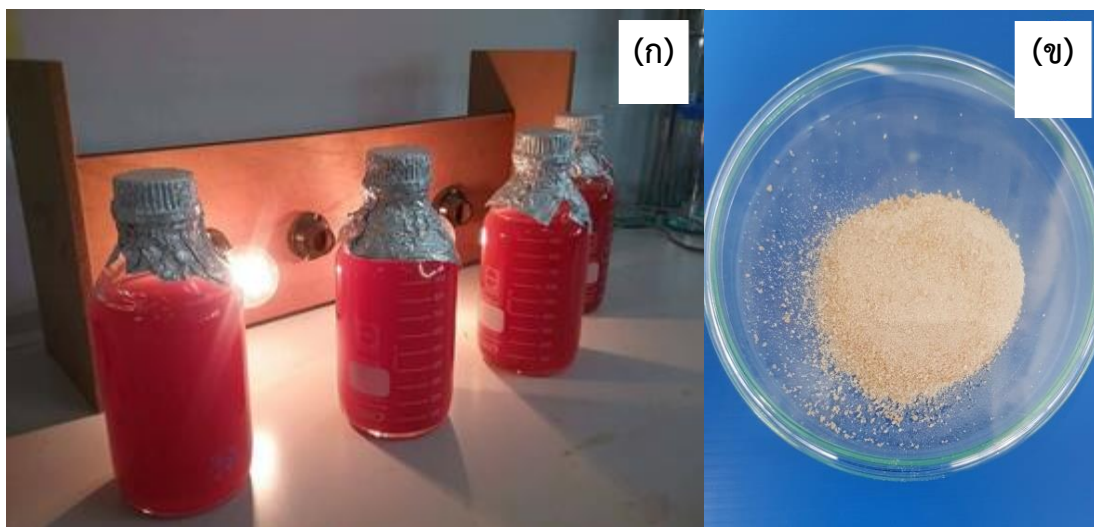
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมปุ๋ยชีวภาพอนุภาคนาโน ALA-chitosan

4.1.1 การเตรียม ALA จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodospseudomonas palustris* JP255 ในอาหารสูตร GM modified แล้วนำไปบ่มเชื้อในสภาวะแบบมีอากาศน้อย/มีแสง ที่อุณหภูมิ 35°C นาน 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถผลิต ALA และปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ที่ความเข้มข้น 100 μM เมื่อนำน้ำเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 ลิตรไปฟริชตรายนสามารถให้ ALA ผงน้ำหนักสุทธิ 40 กรัม จากนั้นทดลองนำผง ALA น้ำหนัก 1 กรัมมาผสมน้ำปริมาตร 1 ลิตร แล้วนำมาวัดหาปริมาณความเข้มข้นของสาร ALA ซึ่งภาพนี้โดยเมื่อใช้ ALA 1 กรัมละลายในน้ำปริมาตร 1 ลิตรให้ปริมาณ ALA 1.5 μM

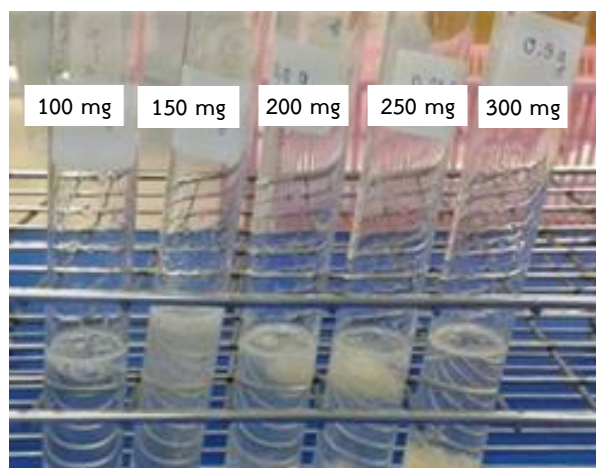


รูปที่ 1 น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rhodospseudomonas palustris* JP255 (ก) และนำไปฟริชตรายน จนได้เป็น ALA ชนิดผง (ข)

4.2 การเตรียมโคโตซานเพื่อจับกับ ALA

1) ทดสอบสัดส่วนที่เหมาะสมของโคโตซานที่สามารถละลายได้ในกรดอะซิติก

เมื่อนำโคโตซานที่ระดับ 100 และ 150 มิลลิกรัมละลายใน 2% กรดอะซิติกที่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ที่ความเข้มข้นโคโตซาน 1 และ 1.5%) พบว่าสามารถละลายเข้ากันได้หมด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโคโตซานเป็น 200, 250 และ 300 มิลลิกรัม จะทำให้เกิดตะกอนค่อยๆ เกิดความหนืดเพิ่มขึ้นดังรูปที่ 2 ดังนั้นจึงเลือกใช้โคโตซานที่ระดับ 150 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่สามารถละลายโคโตซานได้หมด มาใช้ในการศึกษาความสามารถในการจับกับ ALA

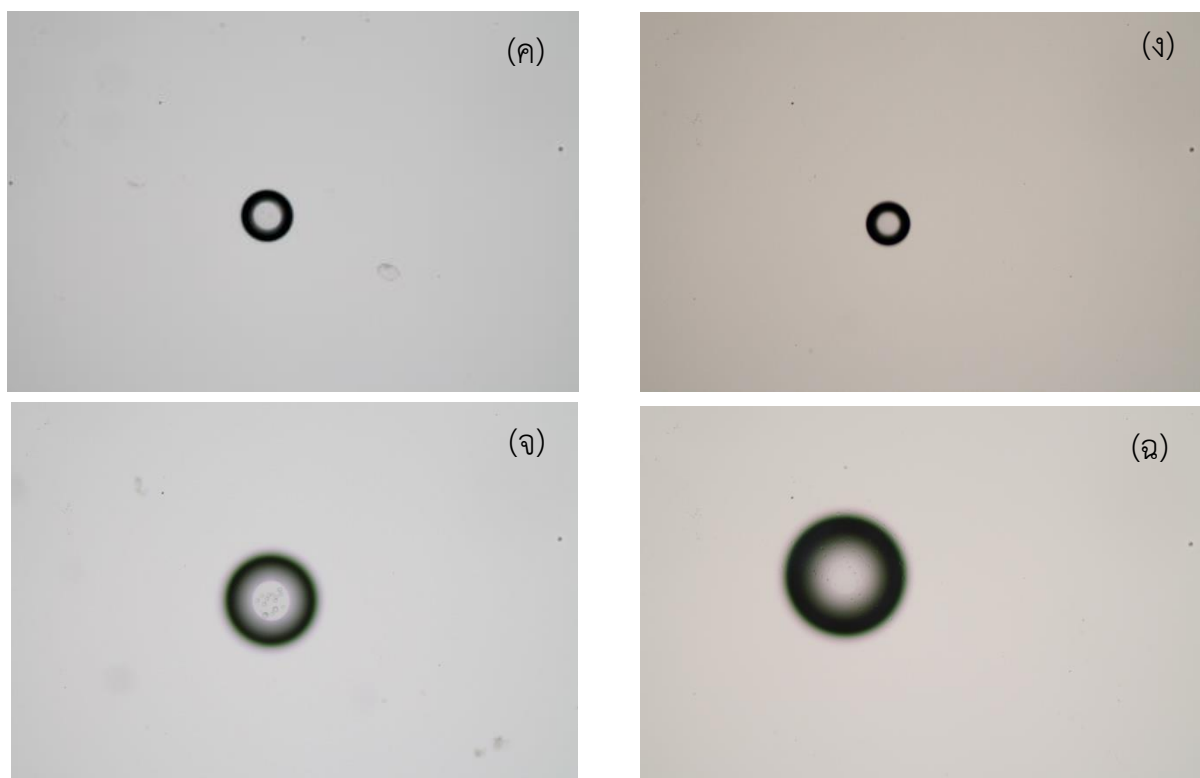


รูปที่ 2 ความสามารถในการละลายของโคโตซานที่ระดับ 100, 150, 200, 250 และ 300 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น

2) การทดสอบความสามารถขึ้นต้นของโคโตซานที่จับกับ ALA มาตรฐาน

เมื่อนำโคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 1.5% มาศึกษารูปแบบการจับตัวกับ ALA มาตรฐานโดยที่เป็นการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น แต่ยังไม่ได้นำไปจับกันภายใต้การเกิดกระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง sonicate พบว่าระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของโคโตซานความเข้มข้น 150 mg นั้นจะสามารถละลายเข้ากันได้กับ ALA มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 μM ได้ทุกระดับความเข้มข้น และเมื่อนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าให้ผลแสดงดังรูปที่ 3 (ก-จ) โดยโครงสร้างในขั้นตอนนี้จะเห็นว่าอนุภาคที่เกิดขึ้นสามารถมองเห็นได้ที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ที่ 40 เท่าซึ่งขนาดของภาพที่ปรากฏจะมีขนาดประมาณ 50-100 μm (ขนาด 50,000-100,000 nm) แต่รูปแบบการจับยังไม่สมบูรณ์เพราะยังไม่สามารถศึกษาโครงสร้างภายในได้ชัดเจนนัก



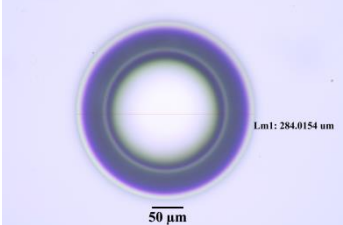
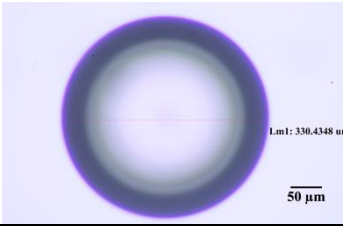
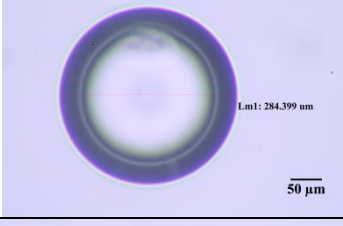
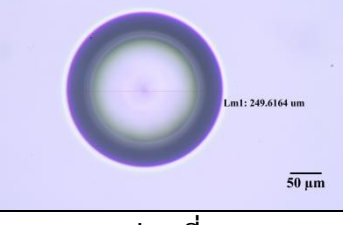


รูปที่ 3 สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ 1.5%ไคโตซาน ที่จับตัวกับ ALA ความเข้มข้น 100 (ก) 200 (ข) 300 (ค) 400 (ง) 500 (จ) 600 (ฉ) μM (กำลังขยาย 40X)

3) การศึกษาความสามารถในการจับกันของไคโตซานและ ALA มาตรฐานเมื่อใช้เครื่อง sonicate ร่วมด้วย

เมื่อนำไคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 1.5% มาศึกษารูปแบบการจับตัวกับ ALA ซึ่งในขั้นต้นได้ทำการคัดเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมได้แล้วคือที่ระดับ 500 μM นั้น แล้วนำไป sonicate บนอ่างน้ำแข็งก่อนนำไปกวนและปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสามารถมองเห็นการจับตัวได้ชัดเจนขึ้นซึ่งแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโตซานที่จับตัวกับ ALA มาตรฐาน

อนุภาคที่	ขนาด (μm) ที่กำลังขยาย 40X
1. 	284.0154
2. 	330.4348
3. 	284.399
4. 	249.6164
ค่าเฉลี่ย	287.1164

เมื่อนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังตารางที่ 1 พบว่าได้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 287.1614 μm หรือมีขนาด 287,161 nm

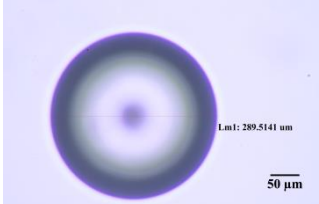
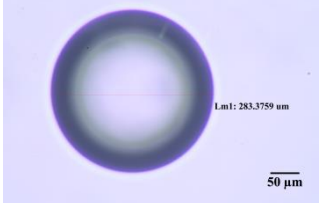

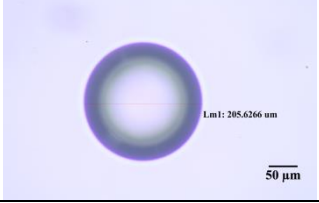
4) การศึกษาความสามารถในการจับกันของโคโตซานและ ALA ชีวภาพที่เตรียม

ขึ้นมา

เมื่อนำ โโตซาน (1.5% ใน 2% กรดอะซิติก) ผสมกับผง ALA ชีวภาพที่ผ่านการฟรีซดรายน์ (ในสัดส่วน 1:1) แล้วปรับพีเอชเป็น 5.5 ก่อนนำไป sonicate บนอ่างน้ำแข็ง แล้วกวนด้วยเครื่อง magnetic stirred แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนจะได้อนุภาคนาโน เมื่อนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังตารางที่ 2 พบว่าได้ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 234.0153 μm หรือมีขนาด 234,015 nm ขนาดอนุภาค

ทั้งของ ALA มาตรฐานและชีวภาพที่ได้ที่ยังไม่ผ่านการฟริชตรายน์ ซึ่งเมื่อนำไปทำให้แห้งแล้วขนาดอนุภาคจึงน่าจะมีขนาดเล็กลงอีกโดยการวัดขนาดอนุภาคดังกล่าวจะใช้เครื่องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านตรวจสอบอีกครั้ง

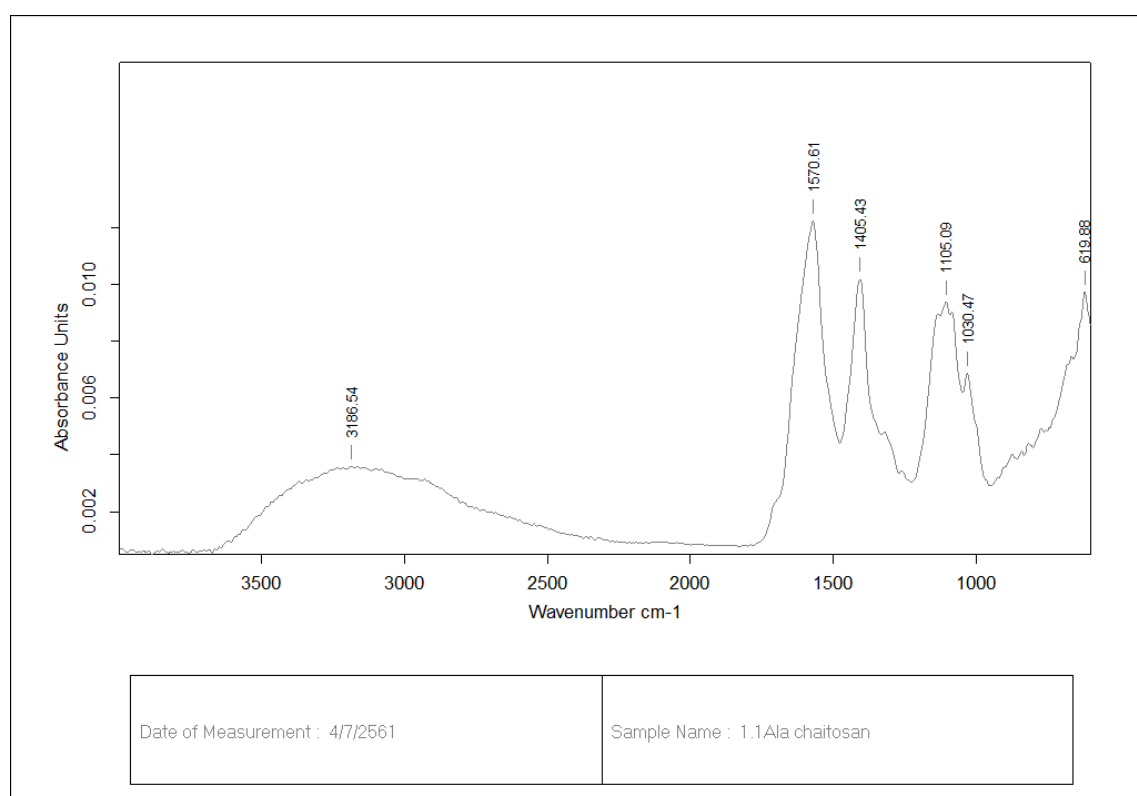
ตารางที่ 2 สัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของโคโตซานที่จับตัวกับ ALA ชีวภาพ

อนุภาคที่	ขนาด (μm) ที่กำลังขยาย 40X
1. 	289.5141
2. 	283.3759
3. 	157.5448
4. 	205.6266
ค่าเฉลี่ย	234.0153

5) การศึกษาโครงสร้างในการจับกันของโคโตซานและ ALA ชีวภาพด้วยเครื่อง FTIR

จากการตรวจสอบโครงสร้างของการจับกันของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกรด 5 อะมิโนลิวูลินิก (ALA) กับโคโตซาน เพื่อให้เกิดการจับกันการเตรียมอนุภาคนาโนทำได้โดยการจับกันของไอออนอย่างสมบูรณ์ระหว่างประจุลบของ ALA บริสุทธิ์กับประจุบวกของโคโตซาน โคโตซานเป็นสารโพลีแซคคาไรด์ เป็นองค์ประกอบของโคตินที่ผ่านกระบวนการ deacetylation (Wu and Liu, 2008) โคโตซานสามารถเกิดปฏิกิริยาทางเคมีได้มาก

เพราะโครงสร้างประกอบด้วยกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl) และอะมิโน (amino group) เพื่อเป็นการพิสูจน์โครงสร้างดังกล่าวจึงได้นำสาร ALA-nano มาตรวจยืนยันด้วยเครื่อง FTIR ให้ผลการทดสอบดังภาพที่ 1 โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ค่า absorbance 1570.61 คือโครงสร้างของ C=N ค่าการดูดกลืนแสงที่ค่า absorbance 3186.54 คือโครงสร้างของ -OH และ -NH₂ ค่าการดูดกลืนแสงที่ค่า absorbance 1405.43 คือโครงสร้างของ -CH₃ และค่าการดูดกลืนแสงที่ค่า absorbance 1105.09 คือโครงสร้างของ C-O ซึ่งจากค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงดังภาพนี้ทำให้ทราบว่าเกิดการจับตัวกันระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของ ALA และหมู่อะมิโนของไคโตซาน โดยความเข้มข้นของไคโตซานที่ใช้คือ 150 มิลลิกรัมในน้ำเลี้ยงเชื้อใส (supernatant) 1 ลิตร เมื่อสารทั้งสองเกิดการจับตัวกันผ่านการ sonicate นาน 40 วินาที ที่กระแสไฟฟ้า 120 วัตต์ บนอ่างน้ำแข็ง (ดังรูปที่ 2) ก่อนนำไปกวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 4 ชั่วโมงเพื่อแยกตะกอนออกไป จะได้เป็นอนุภาค ALA-nano เมื่อได้สารที่ต้องการแล้วจึงนำไปผสมกับผง Potato starch เพื่อช่วยยัดเกาะสารก่อนพรีซเซรเวชัน



ภาพที่ 1 การตรวจหาโครงสร้างของผงชีวภัณฑ์ ALA Nano ที่เตรียมขึ้นมาด้วยเครื่อง FTIR

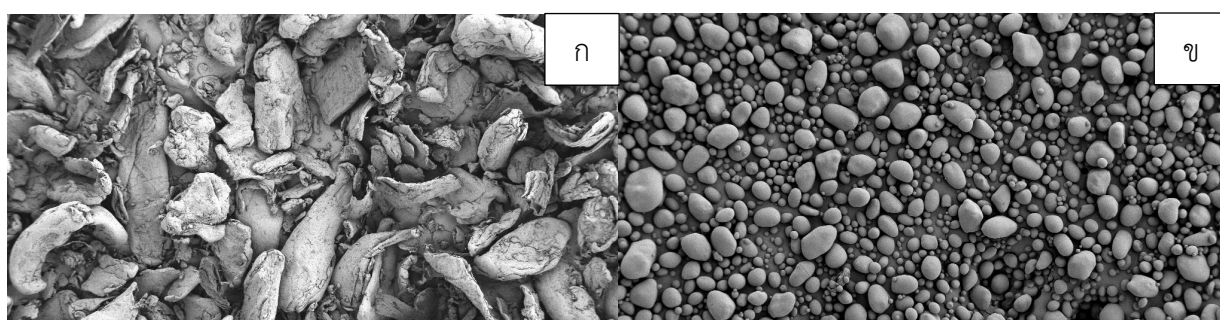


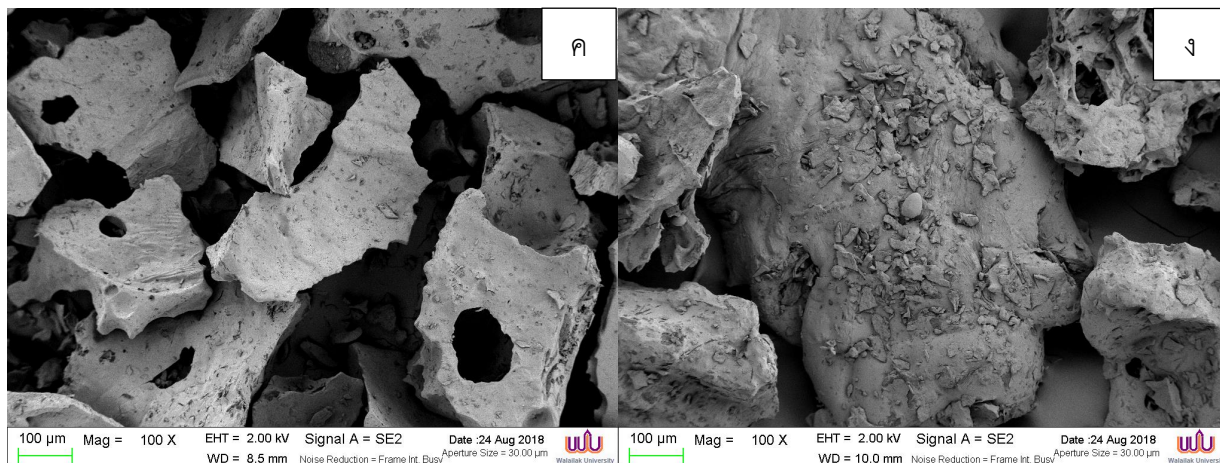
ภาพที่ 2 การใช้เครื่อง Sonicate เพื่อเร่งปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนประจุระหว่าง ALA และไคโตซาน

จากนั้นจึงนำไปวัดขนาดของอนุภาคที่จับว่ามีขนาดเป็นระดับนาโนหรือไม่ด้วยเครื่อง Scanning electron microscope (SEM) เพื่อศึกษารูปร่างและหาขนาดอนุภาคโดยคร่าวๆ

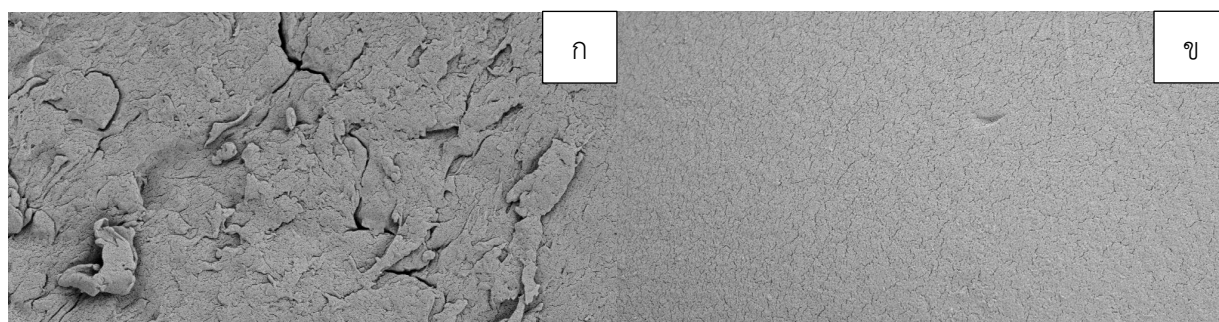
6) การตรวจหาขนาดของอนุภาคสาร ALA Nano

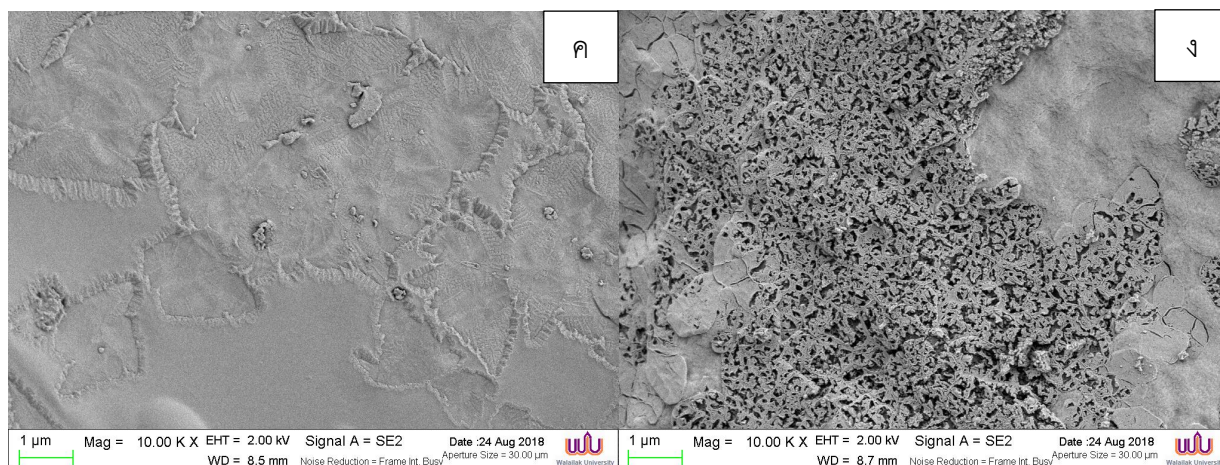
มีการตรวจหาขนาดอนุภาคของ ALA Nano โดยเปรียบเทียบกับ ผง ALA สูตรเดิมที่ยังไม่ได้จับกับไคโตซาน, Chitosan และผงแป้งมันฝรั่ง (Potato starch) ด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยายต่างๆ กัน จาก **ภาพที่ 3** แสดงให้เห็นภาพของผงไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยภาพ (ก) จะเห็นเป็นเกล็ดที่มีขนาดประมาณ 50-250 ไมครอน ส่วนผงแป้งมันฝรั่งจะมีรูปร่างกลมขนาดประมาณ 10-50 ไมครอน (ข) ในขณะที่ ผง ALA จะมีรูปร่างเป็นแท่งรูปร่างแตกต่างกัน (ค) มีขนาดประมาณ 100-400 ไมครอน ส่วน ALA ที่ผ่านการจับกับไคโตซานจะเห็นได้ชัดว่าไคโตซานเกิดการหลอมรวมกับ ALA และกลายเป็นแผ่นของไคโตซานที่มี ALA ซึ่งมีขนาดเล็กมากฝังอยู่ในเนื้อดังกล่าว (ง) แต่จากภาพอาจมองไม่เห็นไม่ชัดเท่าที่ควร ดังนั้น **ภาพที่ 4** จึงได้เพิ่มกำลังขยายจาก 100x ให้เพิ่มเป็น 10K (10,000 เท่า) ซึ่งสามารถมองเห็นพื้นผิวของไคโตซาน (ก) ที่มีความหยาบกระด้าง ไม่เรียบเนียน ในขณะที่ผิวของแป้งมันฝรั่งจะมีความเรียบเนียนกว่ามาก (ข) ส่วนผง ALA ก็จะมีเรียบเนียน มีรูพรุนบางตำแหน่ง ซึ่งอาจเกิดจากการเดือดของสารละลายขณะเย็นจัดในขณะฟริชดรายนจ์จนเปราะและเนื้อผิวสัมผัสโดยทั่วไปก็จะเรียบเนียนมากกว่าผิวของไคโตซานและ ALA มาก (ค) ส่วนภาพของ ALA Nano จะมีพื้นผิวของไคโตซานที่มีอนุภาค ALA ฝังตัวอยู่อย่างหนาแน่น (ง) และเมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 30 K (30,000 เท่า) ดัง **ภาพที่ 5** จะเห็นว่าลักษณะที่มองเห็นจะเหมือนกันกับ **ภาพที่ 4** โดยต่างกันเพียงกำลังขยายที่มากกว่าเท่านั้น และที่เห็นชัดเจนขึ้นมากคือ ALA Nano จะเห็นอนุภาคขนาดเล็กๆ ชัดเจนมาก โดยมีขนาดประมาณ 50 นาโนเมตร



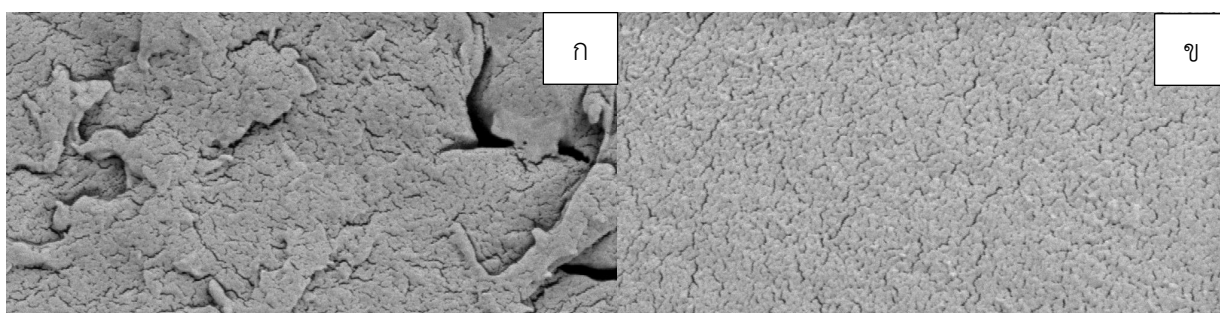


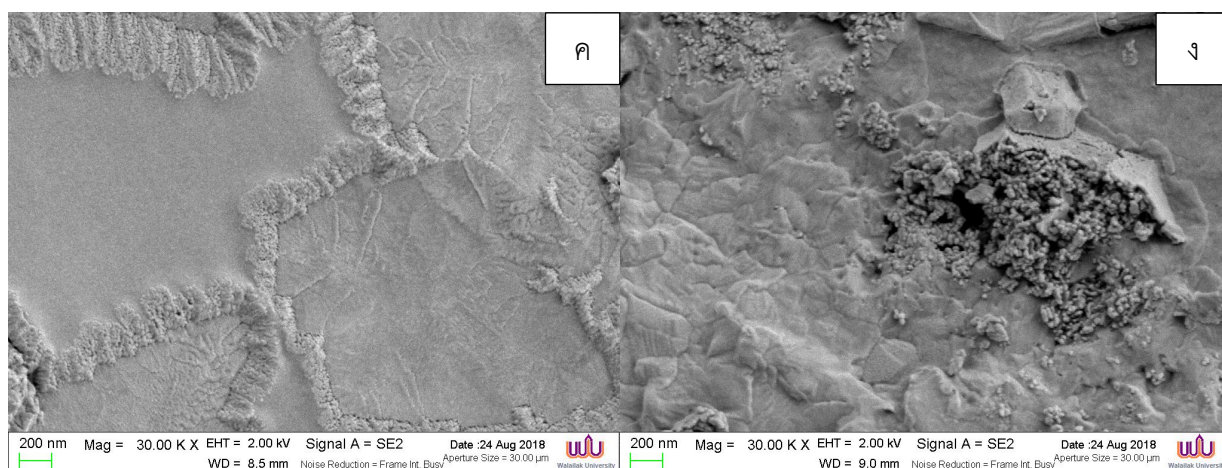
ภาพที่ 3 การวิเคราะห์ภาพด้วยเครื่อง SEM ของโคโตซาน (ก) แป้งมันฝรั่ง (ข) ALA (ค) และ ALA Nano (ง) ที่กำลังขยาย 100x (EHT 2.00 kV)



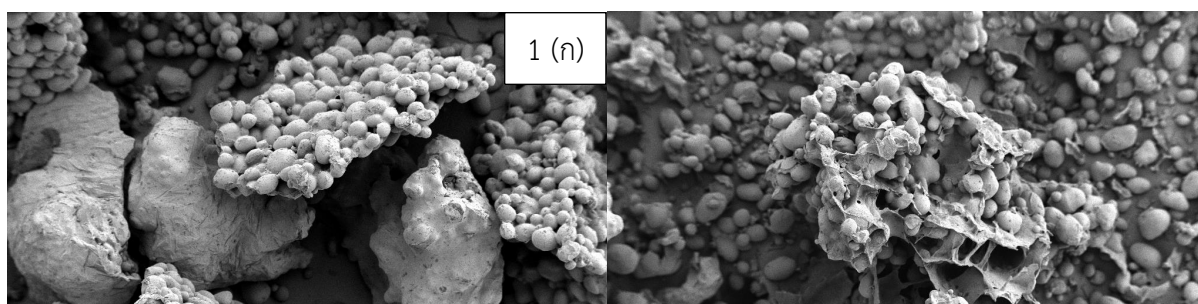


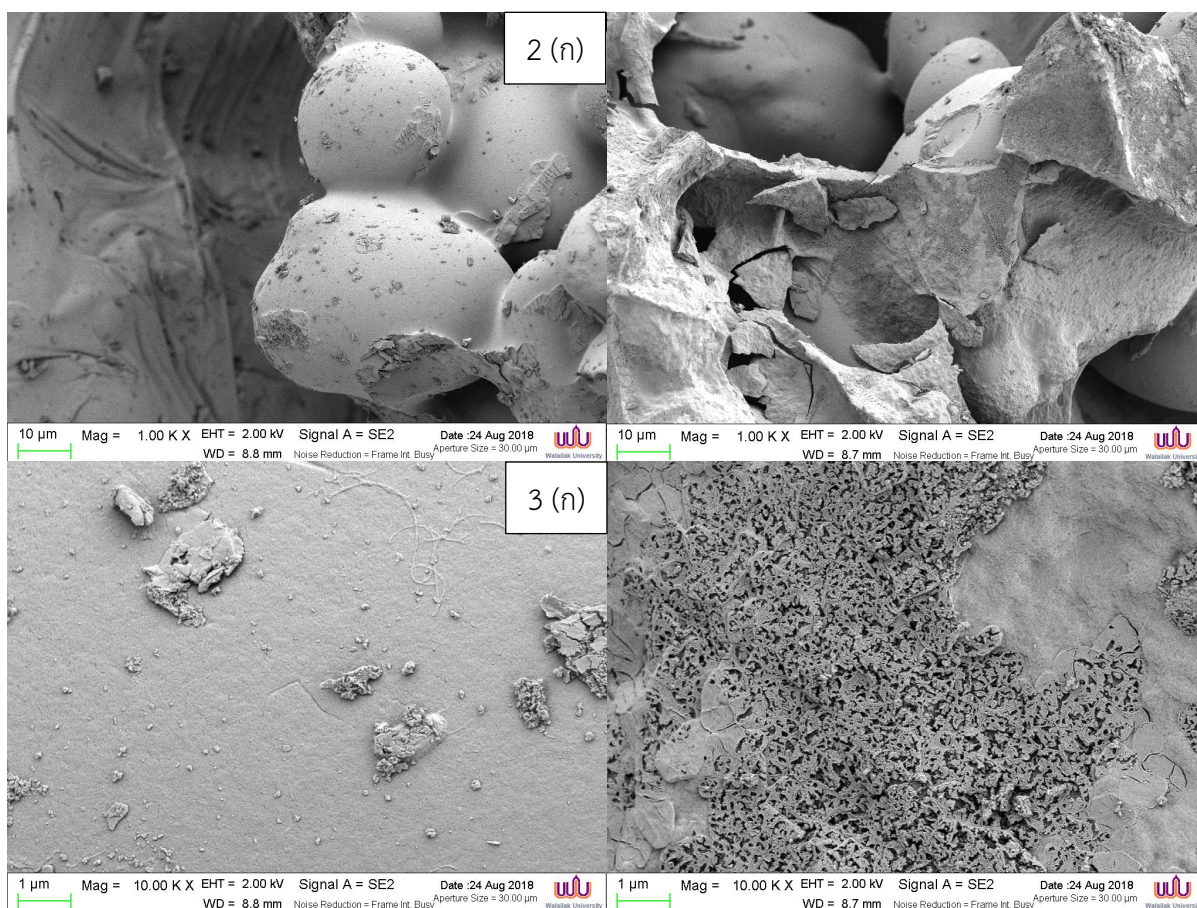
ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ภาพด้วยเครื่อง SEM ของโคโตซาน (ก) แป้งมันฝรั่ง (ข) ALA (ค) และ ALA Nano (ง) ที่กำลังขยาย 10 K (EHT 2.00 kV)





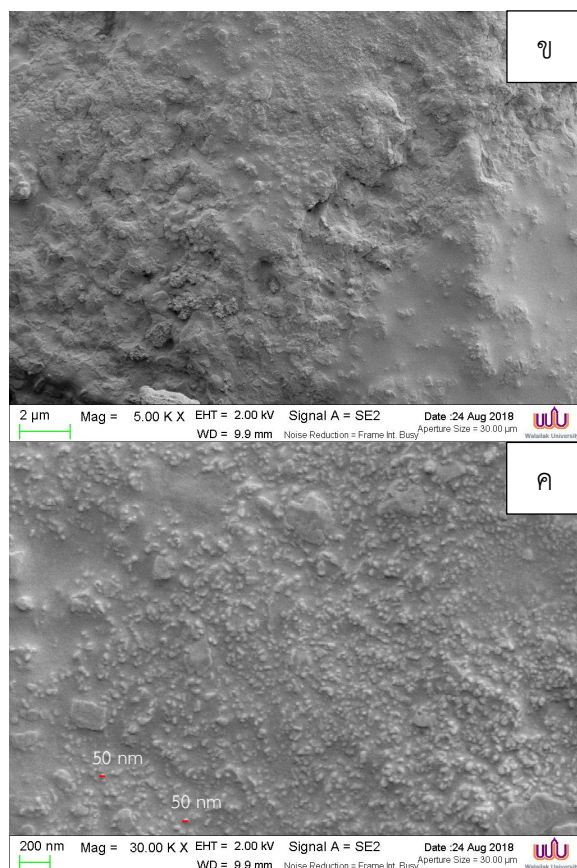
ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ภาพด้วยเครื่อง SEM ของโคโตซาน (ก) แป้งมันฝรั่ง (ข) ALA (ค) และ ALA Nano (ง) ที่กำลังขยาย 30 K (EHT 2.00 kV)





ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ภาพด้วยเครื่อง SEM ของ ALA-starch ที่กำลังขยาย 100x (1ก) 10 K (2ก) 100 K (3ก) และ ALA-Chitosan Starch ที่กำลังขยาย 100x (1ข) 10 K (2ข) 100 K (3ข)

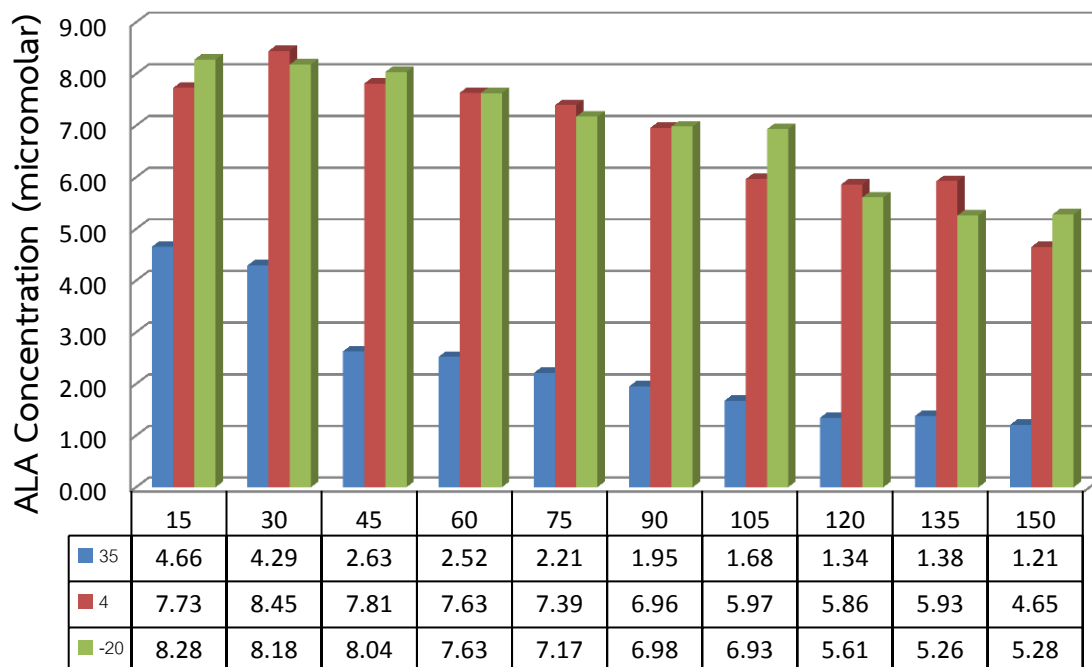




ภาพที่ 7 การวิเคราะห์ภาพด้วยเครื่อง SEM ของ ALA-Chitosan ที่กำลังขยาย 1K (ก) 5K (ข) และ 30 K (ค)

จากภาพที่ 6 เป็นการวิเคราะห์ภาพของ ALA ที่เดิมยังไม่ได้เติมแป้งเพื่อเป็นสารเติมเต็มและใช้ยึดเกาะในขณะทำการพรีซดราเยน โดยในรูปนี้จะเปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างจากภาพเดิมที่ไม่มีแป้งเป็นการเติมแป้งของ ALA (1ก, 2ก, และ 3ก) และ ALA nano (1ข, 2ข, และ 3ข) โดยจะเห็นว่าผง ALA จะรวมกันกับแป้งมันฝรั่งเป็นเนื้อเดียวกันโดยผิว ALA จะมีผิวเนียนเรียบ ส่วน ALA nano จะเห็นส่วนของโคโตะซานช่วยในการประสานเนื้อแป้งและ ALA เมื่อเพิ่มกำลังขยายจะเห็นอนุภาคเล็กๆ ของ ALA nano ชัดเจนมาก และผู้วิจัยยังได้แสดงให้เห็นการเกิดอนุภาคนาโนของ ALA อย่างชัดเจนในภาพที่ 7 ซึ่งใช้กำลังขยาย 10,000 เท่า 50,000 เท่า และ 300,000 เท่า ซึ่งได้วัดขนาดอนุภาคพบว่ามีขนาดโดยเฉลี่ย 50 นาโนเมตร จากนั้นจึงได้นำผง ALA nano ไป

ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษา โดยได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (35°C) เก็บในตู้เย็น (4°C) และเก็บในตู้แช่แข็ง (-20°C) โดยเก็บตัวอย่างทุก 15 วันเป็นเวลานาน 150 วัน (5 เดือน) ให้ผลดังแผนภาพต่อไปนี้



ภาพที่ 8 แสดงผลการเก็บรักษา ALA nano ที่อุณหภูมิต่างกัน

จากกราฟแสดงให้เห็นว่า ALA nano เริ่มต้นเมื่อนำมา 10 กรัมละลายในน้ำ 1 ลิตร จะมี ALA เข้มข้น 8.5 ไมโครโมลาร์ จะสลายตัวไปถึงร้อยละ 85.76 เมื่อผ่านไป 5 เดือน แต่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำที่อุณหภูมิต่ำ 4°C จะสลายไปถึงร้อยละ 45.29 ส่วนที่ -20°C จะสูญหายไปร้อยละ 38.77 โดยอัตราการสลายตัวในช่วง 3 เดือนแรกจะสลายตัวไปน้อยมาก แต่จะเพิ่มอัตราการสลายตัวอย่างรวดเร็วตั้งแต่เดือนที่ 4 เป็นต้นไป ทั้งนี้การเก็บรักษาผู้วิจัยได้เก็บในถุงซิปล็อคและอาจเกิดกระบวนการสัมผัสกับอากาศอย่างช้าๆ จึงควรเปลี่ยนบรรจุภัณฑ์เป็นถุงอะลูมิเนียมฟรอยด์ และควรใช้วิธีการเก็บแบบสุญญากาศ ซึ่งคาดว่าจะช่วยยืดอายุได้อีกเท่าตัวเป็นอย่างน้อย

7. ดัชนีการละลายน้ำ ดัชนีการดูดซับน้ำ และความชื้น

จากการชั่งตัวอย่างผง ALA 1 กรัม ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงที่มีฝาและทราบน้ำหนักแน่นอน เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยคนด้วยแท่งแก้ว และคนทุกๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างส่วนที่ติดมากับแท่งแก้วลงในหลอดหมุนเหวี่ยงโดยใช้น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 2,200 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสลงในถ้วยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105°C จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณดัชนีการละลายน้ำ สำหรับหลอดหมุนเหวี่ยงพร้อมส่วนที่เหลือในหลอด นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณค่าการดูดซับน้ำดังนี้

$$\text{ดัชนีการละลายน้ำ} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างส่วนที่ละลายน้ำ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{ดัชนีการละลายน้ำ} = \frac{9.309 \times 100}{1}$$

$$= 93.09$$

$$\text{ดัชนีการละลายน้ำ} = \frac{9.438 \times 100}{1}$$

$$= 94.38$$

$$\text{ดัชนีการละลายน้ำ} = \frac{9.111 \times 100}{1}$$

$$= 91.11$$

$$\text{ดัชนีการละลายน้ำ} = \frac{9.574 \times 100}{1}$$

$$= 95.74$$

$$\text{ดัชนีการละลายน้ำ} = \frac{9.596 \times 100}{1}$$

$$= 95.96$$

$$\text{ดัชนีการละลายน้ำ} = \frac{9.533 \times 100}{1}$$

$$= 95.33$$

พบว่าดัชนีการละลายน้ำ (water solubility index) มีค่าตั้งแต่ 91.11-95.74

$$\text{ดัชนีการดูดซับน้ำ} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดหมุนเหวี่ยงพร้อมตะกอน} - \text{น้ำหนักหลอดหมุนเหวี่ยง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

$$\text{ดัชนีการดูดซับน้ำ} = \frac{7.091 - 6.841}{1}$$

$$1$$

$$\begin{aligned}
 &= 0.25 \\
 \text{ดัชนีการดูดซับน้ำ} &= \frac{7.102 - 6.852}{1} \\
 &= 0.25 \\
 \text{ดัชนีการดูดซับน้ำ} &= \frac{7.135 - 6.885}{1} \\
 &= 0.25 \\
 \text{ดัชนีการดูดซับน้ำ} &= \frac{7.423 - 6.887}{1} \\
 &= 0.536 \\
 \text{ดัชนีการดูดซับน้ำ} &= \frac{7.504 - 6.883}{1} \\
 &= 0.621 \\
 \text{ดัชนีการดูดซับน้ำ} &= \frac{7.404 - 6.835}{1} \\
 &= 0.569
 \end{aligned}$$

พบว่าดัชนีการดูดซับน้ำ (water absorption index) มีค่าตั้งแต่ 0.25-0.621

ส่วนความชื้นทำโดยการนำผงอนุภาคนาโน ALA-nano น้ำหนัก 0.2 กรัม ที่ผ่านการบดผ่านตะแกรงขนาด 70 mesh ใส่ลงในภาชนะอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน อบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วางภาชนะอะลูมิเนียมในโถดูดความชื้น 20 นาทีโดย

$$\text{MC (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

$$\begin{aligned}
 \text{MC (\%)} &= \frac{16.321 - 16.299}{16.321} \times 100 \\
 &= 0.134
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{MC (\%)} &= \frac{15.803 - 15.777}{15.803} \times 100 \\
 &= 0.164
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{MC (\%)} &= \frac{15.100 - 15.084}{15.100} \times 100 \\
 &= 0.105
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{MC (\%)} &= \frac{15.824 - 15.808}{15.824} \times 100 \\ &= 0.101 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{MC (\%)} &= \frac{15.550 - 15.524}{15.550} \times 100 \\ &= 0.167 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{MC (\%)} &= \frac{15.147 - 15.128}{15.147} \times 100 \\ &= 0.125 \end{aligned}$$

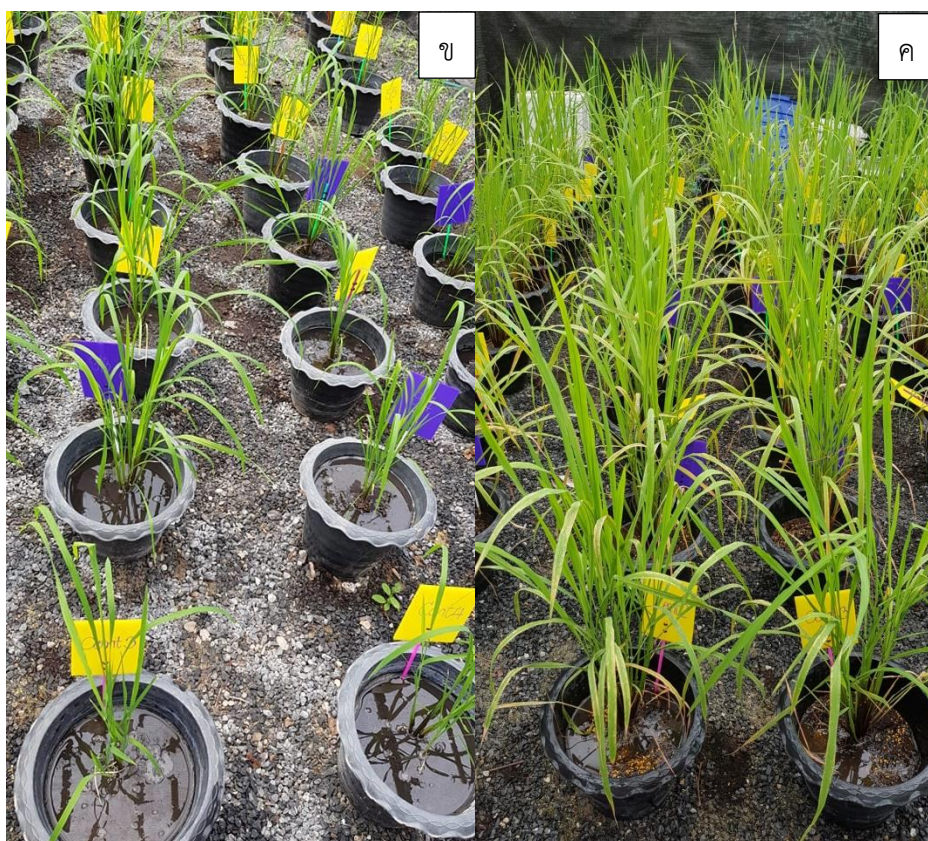
พบว่าความชื้นมีค่าตั้งแต่ 0.101-0.167

จากนั้นจึงนำสารที่เตรียมได้ไปทดสอบการเร่งการเจริญและเพิ่มผลผลิตของข้าวหอมนิลในโรงเรือน โดยเปรียบเทียบกับ ALA ผงสูตรเดิม โดยมี ไคโตซานเป็นชุดควบคุมเชิงบวก และมีชุดควบคุมที่ไม่ได้ใช้สารเร่งใดๆ

8. ผลของสารชีวภัณฑ์ต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวหอมนิล

ในการเตรียมสารทดลองจะเปรียบเทียบผลของ ALA ผงสูตรเดิมที่มีความเข้มข้นของ ALA (ที่ 1, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์) กับ ALA nano (ที่ความเข้มข้น 1, 5 และ 10 ไมโครโมลาร์) และมีชุดควบคุมเชิงบวกเป็นไคโตซานที่ 3 ระดับความเข้มข้นซึ่งมีปริมาณเดียวกันกับที่ใช้ในสูตร ALA nano โดยเริ่มเพาะเมล็ดในวันที่ 20 มีนาคม 2561 ใช้เวลาเพาะเมล็ด 30 วัน จากนั้นวันที่ 11 เมษายน 2561 จึงนำต้นกล้าลงปลูกในกระถางขนาด 15 นิ้ว โดยลงต้นกล้ากระถางละ 2 ต้น เมื่อต้นกล้าอายุได้ 1 เดือนจึงเริ่มฉีดสารครั้งที่ 1 จากนั้นจึงปล่อยน้ำลงในกระถางให้มีความสูงของน้ำจากหน้าดินประมาณ 5 เซนติเมตร และคอยตรวจดูระดับน้ำทุกวัน หากพบว่าปริมาตรน้ำต่ำกว่า 5 เซนติเมตร จึงเติมน้ำในวงล้อให้มีระดับน้ำ 5 เซนติเมตรอยู่เสมอ จากนั้นจึงฉีดสารรอบที่ 2 ในวันที่ 25 พฤษภาคม 2561 โดยเว้นระยะห่างการฉีดนานประมาณ 2 สัปดาห์ ให้น้ำเมื่อข้าวออกช่อรวงผ่านไปแล้ว 15 วัน โดยงดการเติมน้ำจนกว่าจะถึงการเก็บเกี่ยว การให้ปุ๋ยบำรุงต้นข้าว เมื่อต้นข้าวอายุ 20 วัน ใส่มูลวัวอบแห้งเพิ่มเติม 1-2 กำมือต่อกระถาง เมื่อข้าวอายุครบ 30 วัน เมื่อข้าวอายุครบ 45 วัน ใส่ปุ๋ยออสโมโค้ท สูตร 16-16-16 จำนวน 1 ช้อนชาต่อกระถาง และฉีดพ่นสารชีวภัณฑ์กำจัดเพลี้ยทุกสัปดาห์ หลังฉีดสาร และหลังจากที่ต้นข้าวออกรวง ใส่ปุ๋ยออสโมโค้ท สูตร 16-16-16 เพิ่มเติมจำนวน 1 ช้อนชาต่อกระถาง





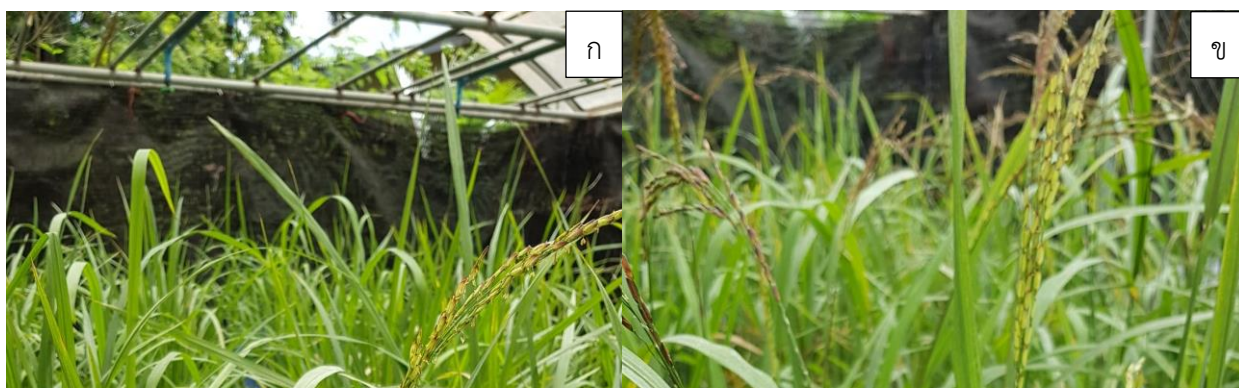
ภาพที่ 9 ย้ายต้นกล้าอายุ 1 เดือนจากสภาพเพาะชำลงในกระถาง (ก) รดน้ำวันละครั้งจนครบ 1 เดือนจึงเริ่มสเปรย์สารรอบที่ 1 (ข) และเว้นระยะห่างประมาณ 2 สัปดาห์จึงเริ่มสเปรย์สารรอบที่ 2 (ค)

สำหรับชุดการทดลองที่ได้ออกแบบไว้ประกอบด้วย 10 ชุดการทดลองดังนี้คือ

- 1) Chitosan (ความเข้มข้นเดียวกับที่ระดับ ALA-nano 1 μM)
- 2) Chitosan (ความเข้มข้นเดียวกับที่ระดับ ALA-nano 5 μM)
- 3) Chitosan (ความเข้มข้นเดียวกับที่ระดับ ALA-nano10 μM)
- 4) ALA Conventional 1 μM
- 5) ALA Conventional 5 μM
- 6) ALA Conventional 10 μM
- 7) ALA-Nano 1 μM
- 8) ALA-Nano 5 μM
- 9) ALA-Nano 10 μM
- 10) Control



ภาพที่ 10 การสเปรย์สารจะใช้ขวดสเปรย์ที่บรรจุสารขวดละ 15 มิลลิลิตรสเปรย์จนทั่วต้นข้าว โดยการใช้
อุปกรณ์กำบังทิศทางของลม



ภาพที่ 11 ต้นข้าวเริ่มแตกรวงอ่อนเมื่ออายุ 3 เดือน (ก) หลังจากนั้นอีก 3 สัปดาห์จึงเริ่มแตกเป็นเมล็ดข้าว (ข)

จากนั้นเมื่อต้นข้าวอายุ 4 เดือนจึงเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อนำไปวัดหาพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้คือ ความสูงของต้นข้าว การแตกกอ





ภาพที่ 12 เริ่มเก็บเกี่ยวผลผลิตเมื่อต้นข้าวอายุ 4 เดือนโดยนำมาวัดหาขนาดคอรวงและความยาวรวง (ก) จากนั้นนำไปตากแดดเพื่อไล่ความชื้น (ข) และนับจำนวนเมล็ดดีเมล็ดลีบต่อรวง (ค)

8.1 การเจริญเติบโตของต้นข้าว

1) จากการศึกษาความยาวคอรวงหรือก้านรวงข้าวเมื่อต้นข้าวอายุครบ 4 เดือน พบว่ามีขนาดความยาวไม่แตกต่างกันมากนักอยู่ในช่วง 10.277-11.295 เซนติเมตร แต่ทุกชุดการทดลองจะสูงกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1) และในชุดที่ใช้ ALA nano 1 ไมโครโมลาร์จะมีความยาวรวงสูงสุด (11.280 เซนติเมตร) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ ALA nano พบว่าความยาวรวงจะลดต่ำลงแต่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ

2) จากการศึกษาความยาวรวงโดยวัดตั้งแต่คอรวงถึงปลายรวงข้าวเมื่อต้นข้าวอายุครบ 4 เดือน พบว่า ALA nano 1 ไมโครโมลาร์ และ ALA 5 ไมโครโมลาร์ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันคือมีความยาวรวง 29.443 เซนติเมตร และ 29.473 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่จะแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

3) จากการศึกษาความสูงของต้นข้าว โดยวัดความสูงของต้นข้าวเมื่อครบ 4 เดือน พบว่า ALA nano 1 ไมโครโมลาร์ มีความสูงเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 141.333 เซนติเมตร รองลงมาคือ ALA 5 ไมโครโมลาร์ (138.667 ไมโครโมลาร์) ลำดับถัดมาคือ ALA 1 ไมโครโมลาร์ และโคโตซานที่ระดับ 3 ซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเจริญเติบโตของต้นข้าว ด้านความยาวคอรวง ความยาวรวง ความสูงของต้นข้าวจากโคนถึงปลายใบ ความยาวใบ และจำนวนการแตกกอ (แขนง)

การทดลอง	คอรวง (ซ.ม.)	ความยาว รวง (ซ.ม.)	ความสูงของ ต้นข้าว (ซ.ม.)	ความยาวใบ (ซ.ม.)	การแตกกอ (แขนง)
โคโตซานระดับ 1	10.514 ^{abc}	27.574 ^b	129.667 ^b	72.000 ^{bcd}	34.00 ^e
โคโตซานระดับ 2	10.538 ^{abc}	27.488 ^b	132.333 ^d	72.750 ^{bcd}	35.67 ^d
โคโตซานระดับ 3	11.115 ^{ab}	28.004 ^{ab}	135.333 ^c	73.250 ^{abc}	37.33 ^c

ALA 1 ไมโครโมลาร์	10.932 ^{ab}	28.005 ^{ab}	135.333 ^c	73.500 ^{abc}	37.67 ^c
ALA 5 ไมโครโมลาร์	11.295 ^a	29.473 ^a	138.667 ^b	73.750 ^{ab}	41.00 ^b
ALA 10 ไมโครโมลาร์	10.264 ^{bc}	27.422 ^b	128.000 ^e	71.500 ^{bcd}	33.67 ^e
ALA nano 1 ไมโครโมลาร์	11.280 ^a	29.443 ^a	141.333 ^a	75.000 ^a	42.33 ^a
ALA nano 5 ไมโครโมลาร์	10.280 ^{bc}	27.468 ^b	124.333 ^f	71.000 ^{cd}	35.33 ^d
ALA nano 10 ไมโครโมลาร์	10.277 ^{bc}	27.487 ^b	121.000 ^g	70.250 ^d	33.33 ^e
Control	9.890 ^c	25.587 ^c	84.333 ^h	67.500 ^e	29.67 ^f

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

4) จากการศึกษาความยาวใบเมื่อครบ 4 เดือน ข้าวพันธุ์หอมนิลที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นข้าวหอมนิลสุรินทร์ ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมเพาะปลูกกันในภาคอีสานและภาคกลางตอนบน ไม่นิยมปลูกในภาคใต้เนื่องจากสภาพภูมิอากาศไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังมีความเสี่ยงต่อการระบาดของโรคหลายๆ โรคเนื่องจากพันธุ์นี้ไม่ต้านทานโรคพืชชนิดอื่น อีกทั้งยังเกิดการบูกรุกของเพลี้ยได้รวดเร็ว สร้างความเสียหายอย่างมาก สารที่เร่งความยาวใบได้ดีที่สุดคือ ALA nano 1 ไมโครโมลาร์ ALA 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ และ ไคโตซานที่ระดับ 3 โดยให้ความยาวใบเป็น 75.00 เซนติเมตร 73.50 เซนติเมตร และ 73.25 เซนติเมตร ตามลำดับ

5) จากการศึกษาการแตกกอ (แขนง) ของต้นข้าว โดยนับจำนวนแขนงของต้นข้าว ตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงระยะเก็บเกี่ยวผลผลิต พบว่า ALA nano 1 ไมโครโมลาร์ มีการแตกกอเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 42.33 แขนง ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ

8.2 ด้านผลผลิต

1) จากการศึกษาจำนวนเมล็ดต่อรวง โดยนับจำนวนเมล็ดของรวงในระยะเก็บเกี่ยวแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยพบว่า ALA nano 1 ไมโครโมลาร์ และ ALA 5 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนเมล็ดต่อรวงเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (147.42 และ 146.5 เมล็ด ตามลำดับ) รองลงมาคือ ALA 1 ไมโครโมลาร์ และ ไคโตซานระดับ 3 (144.53 และ 143.65 เมล็ด ตามลำดับ) ส่วน ALA nano 5 และ 10 ไมโครโมลาร์ จะมีจำนวนเมล็ดเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (138.79 และ 136.76 เมล็ด ตามลำดับ) และชุดควบคุมจะมีเมล็ดน้อยสุด และแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ (ตารางที่ 2)

2) จากการศึกษาจำนวนเมล็ดสีต่อรวง โดยนับจำนวนเมล็ดสีของรวงในระยะเก็บเกี่ยวแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยพบว่า ชุดควบคุมจะมีจำนวนเมล็ดสีต่อรวงเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 20.56 เมล็ด รองลงมาคือ ALA nano 10 ไมโครโมลาร์ และ ALA nano 5 ไมโครโมลาร์ (19.59 และ 18.58 เมล็ด ตามลำดับ) ส่วน ALA เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น (10 ไมโครโมลาร์) ปริมาณเมล็ดสีจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (17.78 เมล็ด) ส่วนไคโตซานเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นปริมาณเมล็ดสีจะลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

3) จากการศึกษาจำนวนเมล็ดดีต่อรวง โดยนับจำนวนเมล็ดดีของรวงในระยะเก็บเกี่ยวแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยพบว่า ALA nano 1 ไมโครโมลาร์ และ ALA 5 ไมโครโมลาร์ มีจำนวนเมล็ดดีต่อรวงเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (135.58 และ 134.10 เมล็ด ตามลำดับ) รองลงมาคือ ALA 1 ไมโครโมลาร์ และไคโตซานระดับ 3 จะมีค่าไม่แตกต่างกัน ส่วนจำนวนเมล็ดดีต่อรวงเฉลี่ยน้อยสุดคือชุดควบคุม (111 เมล็ด) (ตารางที่ 2)

4) จากการศึกษาน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือก 100 เมล็ด โดยนับจำนวนเมล็ด

ข้าวเปลือกจำนวน 100 เมล็ดในระยะเก็บเกี่ยวแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยพบว่า ALA nano 1 ไมโครโมลาร์ มีน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือกเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 2.90 กรัม รองลงมาคือ ALA 5 ไมโครโมลาร์ และโคโตซานที่ระดับ 3 จะให้ผลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และชุดควบคุมจะมีน้ำหนักเมล็ดข้าวเปลือกน้อยที่สุด (1.967 กรัม) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 จำนวนเมล็ดต่อรวง จำนวนเมล็ดสีต่อรวง จำนวนเมล็ดดีต่อรวง และน้ำหนักข้าวเปลือก 100 เมล็ด

การทดลอง	จำนวน เมล็ดต่อ รวง	จำนวนเมล็ด สีต่อรวง	จำนวนเมล็ด ดี/รวง	ข้าวเปลือก 100 เมล็ด (กรัม)
โคโตซานระดับ 1	138.95 ^d	17.25 ^d	121.70 ^d	2.433 ^d
โคโตซานระดับ 2	141.53 ^c	16.21 ^e	125.32 ^c	2.633 ^c
โคโตซานระดับ 3	143.65 ^b	15.00 ^f	128.65 ^b	2.767 ^b
ALA 1 ไมโครโมลาร์	144.53 ^b	14.11 ^f	130.42 ^b	2.600 ^c
ALA 5 ไมโครโมลาร์	146.75 ^a	12.65 ^g	134.10 ^a	2.833 ^{ab}
ALA 10 ไมโครโมลาร์	139.11 ^d	17.78 ^c	121.33 ^d	2.433 ^d
ALA nano 1 ไมโครโมลาร์	147.42 ^a	11.84 ^g	135.58 ^a	2.900 ^a
ALA nano 5 ไมโครโมลาร์	138.79 ^d	18.58 ^c	120.21 ^d	2.333 ^d
ALA nano 10 ไมโครโมลาร์	136.76 ^e	19.59 ^b	117.76 ^e	2.167 ^e
Control	131.56 ^f	20.56 ^a	111 ^f	1.967 ^f

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวคอลัมน์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธี DMRT

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาการเตรียมกรด 5-อะมิโนลิวูลินิก (ALA) ที่ใช้โคโตซานมาจับกับ ALA ในน้ำเลี้ยงเซลล์ เมื่อศึกษาภาพถ่ายและตรวจสอบโครงสร้างตำแหน่งที่เกิดการจับกันนั้นสามารถจับกันได้อย่างจำเพาะ และเมื่อวัดขนาดอนุภาคด้วยเครื่อง SEM พบว่ามีขนาด 50 นาโนเมตร เมื่อนำสารดังกล่าวมาใช้เป็นสารเร่งการเจริญของต้นข้าวพันธุ์หอมนิลสุรินทร์ ซึ่งนิยมปลูกในภาคอีสานและภาคกลาง แต่ไม่นิยมปลูกในภาคใต้ ผู้วิจัยคัดเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวเนื่องจากเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก และสามารถทานข้าวเป็นยาได้แต่การเพาะปลูกจำเป็นต้องควบคุมภาวะคุกคามจากโรคและแมลงศัตรูพืชที่เกิดการแพร่กระจายอย่าง

รวดเร็ว พบว่า ALA Nano ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์สามารถใช้เร่งการเจริญ เพิ่มความยาวรวง ความยาวใบ และการแตกกอ รวมทั้งยังเพิ่มผลผลิตทั้งจำนวนเมล็ดต่อรวง เมล็ดต่อรวง และน้ำหนักข้าวเปลือกต่อ 100 เมล็ด เมื่อเปรียบเทียบกับ ALA สูตรเดิมที่ไม่ได้ใช้โคโตซานที่ต้องใช้ความเข้มข้นถึง 5 ไมโครโมลาร์จึงจะให้ผลที่เหมือนกัน รวมถึงเมื่อเปรียบเทียบกับโคโตซานที่ระดับเดียวกับที่ใช้ในสูตร ALA nano พบว่าโคโตซานเพียงอย่างเดียวก็ให้ผลที่ดีเช่นกันแต่ต้องใช้ปริมาณมากขึ้น ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นสารเร่งการเจริญในต้นข้าวพันธุ์หอมนิลซึ่งมีปัจจัยจำกัดในการเพาะปลูกในพื้นที่ภาคใต้ และสามารถนำไปใช้ข้าวพันธุ์อื่นๆ และพืชชนิดอื่นๆได้

2. ข้อเสนอแนะ

การใช้ ALA สูตรเดิมที่ระดับความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ก็ให้ผลไม่แตกต่างจาก ALA nano 1 ไมโครโมลาร์ จึงสามารถใช้สูตรเดิมความเข้มข้นที่ใช้เดิมทดแทนการใช้สูตรนาโนได้ แต่ทั้งนี้ทั้งนั้น สารอนุภาคนาโนจะมีจุดเด่นคือการดูดซึมเข้าทางใบจะเกิดขึ้นได้ง่ายยิ่งขึ้น จึงเป็นผลดีต่อเกษตรกรที่สามารถใช้ในปริมาณน้อย และจำนวนครั้งลดลงเพียงแค่ 2 ครั้งจากเดิมที่ต้องใช้ถึง 3 ครั้งจึงจะให้ผลดี

เอกสารอ้างอิง

กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ. การส่งออกข้าว. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา:

www.thaifita.com/thaifita/Portals/0/file/ascn_rice1.doc (5 มกราคม 2558)

กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2555. ข้าวหอมนิล. [ระบบออนไลน์].

แหล่งที่มา: <http://www.most.go.th/main/index.php/component/search/>

(5 มกราคม 2558)

เจตนิพิฐ ปานเพชร. 2555. วิธีการทำนาบก. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา:

<http://www.rakbankerd.com> (10 พฤษภาคม 2558).

จำรัส โปรงศิริวัฒนา. 2534. ความรู้เรื่องข้าว. สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและ

สหกรณ์. กรุงเทพฯ.

อังคณา ไส้เกื้อ. 2556. การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนกรด/ชอบกรด จากเขตดินเปรี้ยวในจังหวัด นครศรีธรรมราช และส่งเสริมการผลิตซีวามวลและกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกโดยเทคนิค Plackett-Burmann. 3(2): 75-89.

อภาววรรณ โสภณธรรมรักษ์. 2557. ข้าว 5 สีพันธุ์ข้าวหอม. [ระบบออนไลน์] แหล่งที่มา:

<http://www.thaihealth.or.th> (10 พฤษภาคม 2558).

Aguilar-Garcia, C. Gavino, G., Baragaño-Mosqueda, M., Hevia, P. and Gavino, V. 2007.

Correlation of tocopherol, tocotrienol, γ -oryzanol, and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assay. *Food Chem.* 102: 1228-1232.

Al-Thabet, S.S. 2006. Promotive effect of 5-aminolevulinic acid on growth and yield of wheat grown under dry conditions. *Agronomy J.* 5(1): 45-49.

Anderson, R. A., Conway, H.F., Pfeifer, V.F. and Griffin, E. L. Jr. 1969. Roll and extrusion cooking of grain sorghum grits. *Cereal Sci. Today.* 14: 372-375.

AOAC. 1990. Official methods of analysis (14th) Washington: Association of analysis chemists.

Balesstrass, K.B., Gallego, S.M. and Tomaro, M.L. 2006. Oxidation of the enzymes involved in nitrogen assimilation plays an important role in the cadmium-induced toxicity in soybean plants. *Plant Soil.* 284: 187-194.

Beauséjour J., Clermont, N. and Beaulieu, C. 2003. Effect of *Streptomyces melanosporafaciens* strain EF-76 and of chitosan on common scab of potato. *Plant & Soil.* 256: 463-468.

Benzon, H.R.L., Rubenecia, Ma. R.U., Ultra, V.U. Jr. and Lee, S.C. 2015. Nano-fertilizer affects the growth, development, and chemical properties of rice. *Int. J. Agri. & Agri. R.* 7(1): 105-117.

Bunzel, M., Ralph, J., Marita, JM., Hatfield, RD. and Steinhart, H. 2001. Diferulates as structural components in soluble and insoluble cereal dietary fibre. *J. Sci. Food Agri.* 81: 653-660.

Chandrkrachang, S. 2002. The application of chitin and chitosan in agriculture in Thailand. *Advances in Chitin Science* 5. p.458-462.

Chang, S.C. MacRobert, A.J. and Brown, S.G. 1996. Biodistribution of protoporphyrin IX in rat urinary bladder after intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *J. Urol.* 155:

1744-1748.

- Cho, Y., No, H.K. and Meyers, S.P. 1998. Physicochemical characteristics and function properties of various commercial chitin and chitosan products. *J. Agri Food Chem.* 46(9): 3839-3843.
- Chrispeels, M.L. and David, E.S. 1994. Plants, genes and agriculture. Jones and Bartlett Publishers. London, England. 478 p.
- Chung, C.W., Chung, K.D., Jeong, Y.I. and Kang, D.H. 2013. 5-Aminolevulinic acid-incorporated nanoparticles of methoxy poly(ethylene glycol)-chitosan copolymer for photodynamic therapy. *Intl. J. Nanomed.* 8: 809-819.
- Cui, HX., Sun, C.J., Liu, Q., Jiang, J. and Gu, W. 2010. Applications of nanotechnology in agrochemical formulation, perspectives, challenges and strategies. International conference on Nanoagri, Sao pedro, Brazil, 20-25 June 2010.
- Diddens, H., Humpel, B., Huttmann, G. and Novo, M. 1994. Chemische instabilität von 5-aminolaevulinsäure: pH and konzentrationsabhängigkeit. *Lasermedizin.* 10: 106.
- Dziezak, J.D. 1998. Microencapsulation and encapsulated ingredients: use of microencapsulation can improve ingredient functionality. *Food Technology.* 42: 136-151.
- Elfsson, B., Wallin, I., Eksborg, S., Rudaeus, K., Ros, A.M. and Ehrsson, H. 1998. Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution. *European J of Pharmaceutical Sci.* 7: 87-91.
- Fan, L., Wang, Y., Shao, X., Geng, Y., Wang, Z., Ma, Y. and Liu, J. 2012. Effects of combined nitrogen fertilizer and nano-carbon application on yield and nitrogen use of rice grown on saline-alkali soil. *J. Food Agri Environ.* 10(1): 558-562.
- Feng, X., Shuiyuan, C., Jun, Z., Weiwei, Z. and Yan, W. 2011. Effects of 5-aminolevulinic acid on chlorophyll, photosynthesis, soluble sugar and flavonoids of *Ginkgo biloba*. 39(1): 41-47. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. "FAOSTAT: Production Crops, 2012 data".
- Fukada, H., Casas, A. and Battle, A. 2005. Aminolevulinic acid:from its unique biological function to its star role in photodynamics therapy. *The international J Biochem and Cell Bio.* 37:272-276.
- Gong, CL. And Dong, GZ. 2012. First exploration of effects of "nanometer 863" biological promote growth device application in rice production. (In Chinese.) *Rice.* 5: 68-69.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A. and Saurel, R. 2007. Application of

- spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 40(9) 1107-1121.
- He, YQ. 2005. Influence of plant synergist “Quangdi nanometer 863” on seeding quality and yield of rice. (In Chinese, with English abstract.) *Guangxi Agricultural Science*. 4: 294-295.
- Hotta, Y., Tanaka, T., Tanaka, H., Takeuchi, Y. and Konnai, M. 1997. Improvement of cold resistant in rice seedling by 5-aminolevulinic acid in plants: the increase of photosynthesis, chlorophyll content, and plant growth. *Biosci Biotechnol Biochem*. 61: 2025-2028.
- Huang, S., Wang, L., Liu, L., Hou, Y. and Li, L. 2014. Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China. A review. *Agronomy for sustainable development*. [Available online]. <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-014-0274-x>.
- Inze, D. and Montagu, M.V. 2002. *Oxidative stress in plants*. Taylor and Francis, London.
- Islam, MA. And Becerra, JX. 2012. Analysis of chemical components involved in germination process of rice variety Jhapra. *J. Scientific Research*. 4(1): 251-262.
- Jang, S. and Xu, Z. 2009. Lipophilic and hydrophilic antioxidants and their antioxidant activities in purple rice bran. *J. Food Chem*. 57(3): 858-862.
- Jyothi, N., Prasanna, M., Prabha, S., Ramaiah, P.S., Srawan, G. and Sakarkar, S. 2008. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency: A review. *The internet J. of Nanotechnology*. 3(1): 1-11.
- Liu, H. 2007. Whole grain phytochemicals and health. *J. Cereal Sci*. 46: 207-219.
- Liu, R. and Lal, R. 2015. Potential of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic production. A review. *Science of the Total Environment*. 514: 131-139. [Available online]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.104>.
- Lu, B.R. 1999. Taxonomy of the genus *Oryza* (Poaceae): Historical perspective and current status. Genetic Resource Center, *IRRI*. p. 4-8.
- Maruyama-Nakashita, A., Hira, M.Y., Funada, S. and Fuek, S. 2010. Exogenous application of 5-aminolevulinic acid increases the transcript levels of sulfur transport and assimilatory genes, sulfate uptake, and cysteine and glutathione contents in *Arabidopsis thaliana*. *Soil Sci. Plant Nut*. 56: 281-288.
- Memon, S.A., Xilin, H., Liangju, W. and Ying, L. 2009. Promotive effect of 5-aminolevulinic

- acid (ALA) of photosynthetic rate, hydrogen peroxide content, antioxidant level and active oxygen scavenging enzymes in spinach (*Spinacia oleracea* L.). *J. of Japanese society for Horticultural Science*. 70: 346-352.
- Muzzarelli, R.A.A. 1977. Chitin. Pergamon Press: Oxford, UK.
- Muzzarelli, R.A.A., Terbojevich, M. and Cosani, A. 1996. Unspecific activities of lipases and amylases on chitosans. In: Chitin Enzymology Vol.2, R.A.A.Muzzarelli (ed), Atec, Grottammare, Italy. 69-82.
- Naderi, MR. and Danesh-Sharaki, A. 2013. Nanofertilizers and their role in sustainable Agriculture. *Intl J Agri Crop Sci*.
- Nishihara, E., Kondo, K., Masud, Parvez, M., Takahashi, K., Watanabe, K., Tanaka, K. 2003. Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). *J. Plant Physiol*. 160: 1085-1091.
- Novo, M., Huttman, G and Diddens, H. 1996. Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumours. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 34: 143-148.
- Potter, JD. 2005. Vegetables, fruit, and cancer. *The Lancet*. 366: 527-530.
- Poulsen, P.H.B., Moller, J. and Magid, J. 2008. Determination of a relationship between chitinase activity and microbial diversity in chitin amended compost. *Bioresource Tech*. 99: 4355-4359.
- Prapagdee, B., Kotchadat, K., Kumsopa, A. and Visarathanonrh. 2007. The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. glycines. *Bioresource Tech*. 98: 1353-1358.
- Reddy, K.B.P.K., Awasthi, S.P., Madhu, A.N. and Prapulla, S.G. 2009. Role of cryoprotectants on the viability and functional properties of probiotic lactic acid bacteria during freeze drying. *Food Biotechnol*. 23: 243-265.
- Sasaki, K., Marquez, F., Nishio, N. and Nagai, S. 1995. Promotive effects of 5-aminolevulinic acid on the growth and photosynthesis of *Spirulina platensis*. *J. of Ferment and Bioengineering*. 79:453-457.
- Sawaddiwong, R., Jongjareonrak, A. and Benjakul, S. 2008. Phenolic content and antioxidant activity of germinated brown rice as affected by germination temperature and extraction solvent. *KMTITL Science J*. 8(2): Section B.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V. and Jeon, Y.J. 1999. Food applications of chitin and chitosan. *Trends Food Sci Tech*. 10: 37-51.

- Shahidi, F. and Han, X. Q. 1993. Encapsulation of food ingredients. *Food Science and Nutrition*. 33 (6): 501-547.
- Shaker, M.N., Ramadan, H.S., Moustafa, M.M., El khatib, A.M. and Roston, G.D. 2014. Enhanced photodynamic efficiency of PLGA-encapsulated 5-ALA nanoparticles in mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Appl Nanosci*. 4: 777-789.
- Sharathchandra, R.G., Niranjan Raj, S., Shetty, N.P., Amuruthesh, K.N. and Shekar Shetty, H. 2004. A chitin formulation elixir induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. *Crop Protection*. 23: 881-838.
- Sharp, R.G. 2013. A review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields. *Agronomy*. 3: 757-793.
- Shi, L.E., Li, Z.H., Li, D.T., Xu, M., Chen, H.Y. and Zhang, Z.L. 2013. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *J. Food Eng.* 117: 99–104.
- Sirisena, DN., Dissanayake, DMN., Somaweera, KATN., Karunaratne, V. and Kottegoda, N. 2013. Use of nanofertilizer as a source of potassium in rice cultivation. *Annals of Sri Lanka department of Agriculture*. 15: 257-262.
- Siri-Uphum, C. 2002. Radiation derogation of chitosan and its application for young orchid plant growth promotion. *Advance in Chitin Science* 5. p. 475-478.
- Stobart, A.K., Ameen-Bukhari, J. 1984. Regulation of alpha-aminolevulinic acid synthesis and protochlorophyllide regeneration in the leaves of dark-grown barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *Biochem. J.* 222:419-426.
- Tanaka, T., Takahashi, K., Hotta, T., Takeuchi, Y., Konnai, M. 1992. Promotive effect 5-aminolevulinic on yield of several crops. In: Proceedings of the 19th annual meeting of plant growth regulator Society of America, San Francisco. Plant Growth Regulator Society of America, Washington DC. pp. 237-241.
- Tian, S., Nakamura, K., Cui, T., Kayahara, H. 2005. High performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *J. Chrom A*. 1063: 121-128.
- Nunkaew, T., Kantachote, D., Kanzaki, H., Nitoda, T., Raymond, Ritchie, RJ. 2014. Effects of 5-aminolevulinic acid (ALA)-containing supernatants from selected *Rhodospseudomonas palustris* strains on rice growth under NaCl stress, with

- mediating effects on chlorophyll, photosynthetic electron transport and antioxidative enzymes. *Electronic J. Biotech.* 17(1): 19-26.
- Trubiano, P. C. and Lacourse, N. L. 1988. Emulsion-stabilizing starches: Use in flavour encapsulation. In: Risch, S. J. and Reineccius, G. A. (Eds), Flavour Encapsulation. Washington D.C.: ACS Symposium Series 370, American Chemical Society. pp. 45-54.
- Virgin, H.I. 1996. Pigments in mesocotyls of corn (*Zea mays*) and oats (*Avena sativa*) in darkness, and after irradiation and treatment with 5-aminolevulinic acid. *Physiologia Plantarum.* 98:714-722.
- Virgin, H.I. and McEwen, B. 1995. Effect of 5-aminolevulinic acid on the pigment content of dark-grown hypocotyls of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum.* 121:258-264.
- Wang, XY., Wang, Y., Tian, XH. And Ma, GH. 2011. Effects of NM urea on nitrogen run losses of surface water and nitrogen fertilizer efficiency in paddy field. (In Chinese, with English abstract.) *Trans. Chinese Society of Agricultural Engineering.* 1: 106-111.
- Wanichapongpan, P., Suriyachan, K. and Chandkrachang. 2001. Effect of chitosan on the growth of Gerbera flower plant (*Gerbera jamesonii*). *Chitin and chitosan in life science.* 198-201.
- Wilson, N and Shah, N.P. 2007. Microencapsulation of vitamins. *ASEAN Food Journal.* 14(1): 1-14.
- Wu, L., Liu, M. and Liang, R. 2008. Preparation and properties of a double-coated slow-release NPK compound fertilizer with superabsorbent and water-retention. *Bioresour. Technol.* 99: 547-554.
- Zhang, SS., Zhang, JS., Yan, JZ., Liu, SS., Peng, CA., Dong, YZ., Liu, GX. And Wu, DM. 2007. Application effect in early rice production of farm oriented active source of water. (In Chinese.) *Hubei Agricultural Science.* 2: 204-205.
- Xu, W.T., Huang, K., Guo, F., Qua, W., Yang, J.J., Liag, Z.H. and Luo, Y.B. 2007. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatment of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology.* 46: 86-94.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. glutamate-malate (GM) (Saikeur, 2009)

เป็นอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงเพื่อผลิตสาร ALA ประกอบด้วย L-glutamic acid 3.8 g/l DL-malic acid 2.7 g/l yeast extract 2.0 กรัม/ลิตร $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0.8 g/l) KH_2HPO_4 (0.5 g/l) K_2HPO_4 (0.5 g/l) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/l) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.053 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1.2×10^{-3} g/l Thiamine-HCl 1.0×10^{-3} g/l Nicotinic acid 1.0×10^{-3} g/l และ Biotin 1.0×10^{-5} g/l ละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 1 ลิตร เทใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 mm. แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

2. เตรียมสารละลาย 0.2 mM DPPH ในเมทานอล ปริมาตร 10 ml (M.W. = 394.33)

จาก $g / M.W. = CV/1000$

$$g = (0.2 \times 10^{-3}) \times 10 \times 394.33 / 1000$$

$$g = 0.00078 \text{ g}$$

โดยชั่ง DPPH 0.00078 g ละลายในเมทานอล ปริมาตร 10 ml

3. เตรียมสารละลายบีเอชที ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ในเมทานอล ปริมาตร 10 ml

โดยชั่งบีเอชที 10 mg ละลายในเมทานอล ปริมาตร 10 ml

4. เตรียมสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml

โดยชั่งกรดแกลลิก 25 mg ละลายในเมทานอล ปริมาตร 1 ml จากนั้นเติมสารละลาย Folin – Ciocalteu reagent จำนวน 1 ml แล้วเติม Na_2CO_3 7 % จำนวน 8 ml แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 ml ด้วยน้ำกลั่น

5. เตรียมสารละลาย 7% Sodium carbonate ปริมาตร 250 ml

โดยชั่งสารละลาย Sodium carbonate 17.5 g ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 200 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 ml ด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร

6. เตรียมสารละลาย Folin – Ciocalteu reagent (เจือจาง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น) ปริมาตร 10 ml

โดยใช้ Folin – Ciocalteu reagent ปริมาตร 1 ml ละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 9 ml

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของสาร ALA

สารเคมี

1. Sodium Acetate (NaOAc) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 4.7)

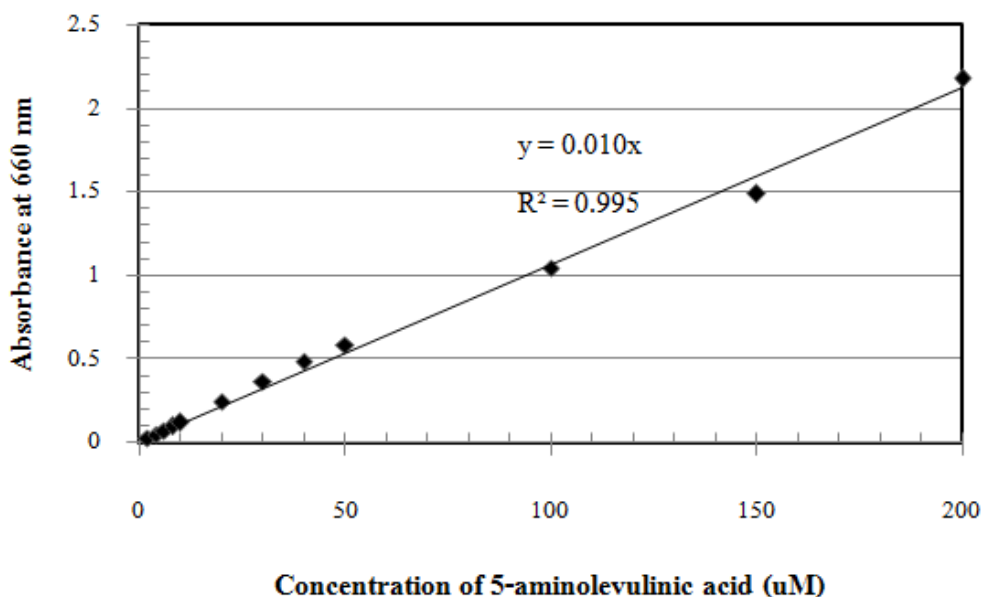
2. Acetyl acetone
3. Dimethyl - p - aminobenzaldehyde (DMAB)
4. 70% Perchloric acid
5. Glacial acetic acid

วิธีการวิเคราะห์

นำสารละลาย ALA มาตรฐานที่เจือจางอย่างเหมาะสมที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 และ 200 μM ปริมาตร 1 ml เติม โซเดียมอะซิเตต ที่ความเข้มข้น 1 M (pH 4.7) ปริมาตร ปริมาตร 2 ml และเติมอะซิโตน ปริมาตร 50 μl ผสมให้เข้ากันและนำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างบรรจุน้ำแข็ง หลังจากเติม modified Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 ml ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 533 nm และเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร ALA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 533 nm

หมายเหตุ : ส่วนผสมของ Modified Ehrlich's reagent (100 ml)

1. Dimethyl - p - aminobenzaldehyde 2 g
2. 70% Perchloric acid 16 ml
3. Glacial acetic acid 84 ml

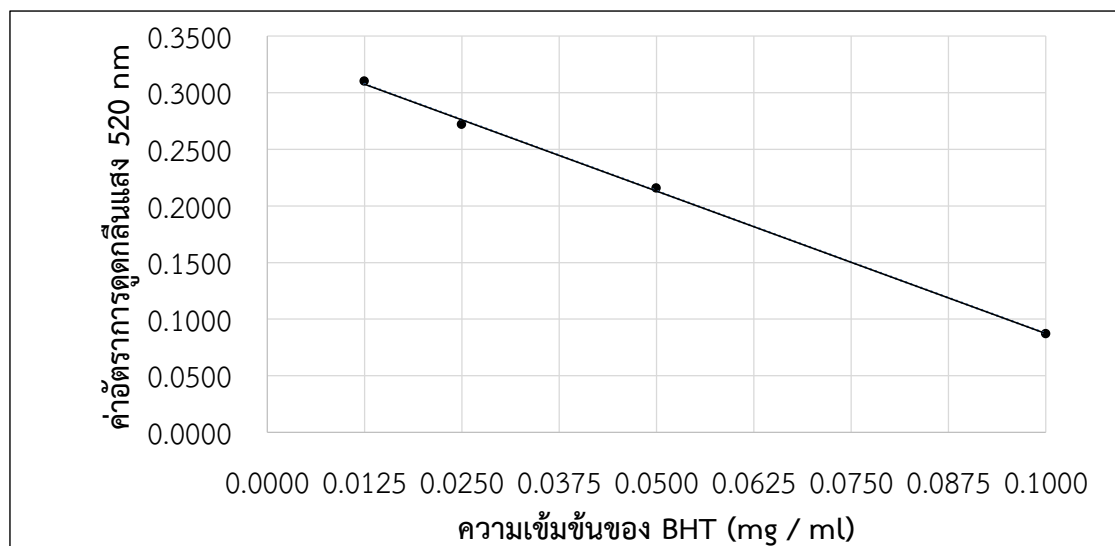


ภาพภาคผนวกที่ ข1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณสาร ALA กับค่าการดูดกลืนแสง

2. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี ด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Nagaia *et al*, 2005)

โดยเติมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 200 μM ปริมาตร 1 ml ร่วมกับเมทานอลปริมาตร 3 ml จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่านาน 30 นาที นำไปวัดอัตราการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วยเครื่องเปคโตร

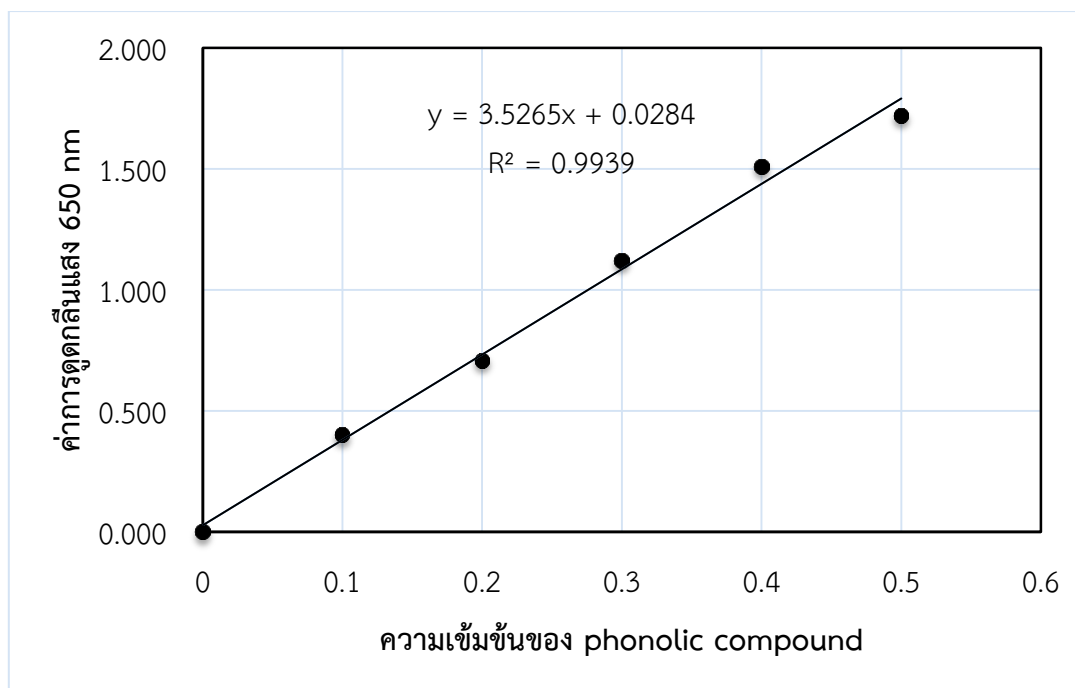
โฟโตมิเตอร์ แบบ UV - visible ถ้าการดูดกลืนแสงมีค่าต่ำแสดงว่าการต้านอนุมูลอิสระสูง ใช้ butylated hydroxytoluene (BHT) ความเข้มข้น 20 – 100 µg/ml เป็นสารมาตรฐานในเปรียบเทียบหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ แสดงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบมิลลิกรัมของ butylated hydroxytoluene (BHT) ต่อส่วนสกัด 0.025 กรัม (mg BHT /0.025 g extracted)



ภาพภาคผนวกที่ ข2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH กับค่าการดูดกลืนแสง

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด Mongolsilp et al., (2004)

นำสารละลายกรดแกลลิกเข้มข้น 0.5 mg/ml มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/ml ตามลำดับ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิก โดยนำสารละลายข้างต้นมาจำนวน 2, 4, 6, 8 ml แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 ml หรือตัวอย่างส่วนสกัดหยาบที่ต้องการทดสอบนำมาละลายด้วยเอทานอลจำนวน 1 ml จากนั้นเติมสารละลาย Folin – Ciocalteu reagent จำนวน 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 7 นาที แล้วเติม 7 % Na_2CO_3 จำนวน 8 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเฉลี่ยในรูปแบบมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อส่วนสกัด 0.025 กรัม (mg GAE/0.025g extracted)



รูปภาคผนวกที่ ข3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของสารประกอบฟีนอลิก กับค่าการดูดกลืนแสง

ผลการทดสอบทางสถิติ

คอรวง (เซนติเมตร)

Duncan

group	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Control	21	9.890		
ALA10	22	10.264	10.264	
ALA-Chitosan10	22	10.277	10.277	
ALA-Chitosan5	20	10.280	10.280	
Chitosan1	22	10.514	10.514	10.514
Chitosan5	21	10.538	10.538	10.538
ALA1	22		10.932	10.932

Chitosan10	20		11.115	11.115
ALA-Chitosan1	20			11.280
ALA5	21			11.295
Sig.		.191	.087	.112

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 21.067.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

ความยาวรวง (เซนติเมตร)

Duncan

group	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Control	23	25.587		
ALA10	23		27.422	
ALA-Chitosan5	22		27.468	
ALA-Chitosan10	24		27.487	
Chitosan5	24		27.488	
Chitosan1	23		27.574	
Chitosan10	24		28.004	28.004
ALA1	22		28.005	28.005
ALA-Chitosan1	23			29.443
ALA5	22			29.473
Sig.		1.000	.556	.108

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 22.974.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

ความสูงของต้นข้าว (เซนติเมตร)

Duncan

group	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Control	3	84.333							
ALA-Chitosan10	3		121.000						
ALA-Chitosan5	3			124.333					
ALA10	3				128.000				

Chitosan1	3				129.667				
Chitosan5	3					132.333			
Chitosan10	3						135.333		
ALA1	3						135.333		
ALA5	3							138.667	
ALA-Chitosan1	3								141.333
Sig.		1.000	1.000	1.000	.151	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การแตกกอ (แขนง)

Duncan

group	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Control	3	29.67					
ALA-Chitosan10	3		33.33				
ALA10	3		33.67				
Chitosan1	3		34.00				
ALA-Chitosan5	3			35.33			
Chitosan5	3			35.67			
Chitosan10	3				37.33		
ALA1	3				37.67		
ALA5	3					41.00	

ALA-Chitosan1	3						42.33
Sig.		1.000	.318	.594	.594	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ความยาวใบ (เซนติเมตร)

Duncan

group	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Control	4	67.500				
ALA-Chitosan10	4		70.250			
ALA-Chitosan5	4		71.000	71.000		
ALA10	4		71.500	71.500	71.500	
Chitosan1	4		72.000	72.000	72.000	
Chitosan5	4		72.750	72.750	72.750	72.750
Chitosan10	4			73.250	73.250	73.250
ALA1	4			73.500	73.500	73.500
ALA5	4				73.750	73.750
ALA-Chitosan1	4					75.000
Sig.		1.000	.051	.055	.083	.078

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

จำนวนเมล็ด/รวง

Duncan

group	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Control	18	131.56					
ALA-Chitosan10	17		136.76				
ALA-Chitosan5	19			138.79			
Chitosan1	20			138.95			
ALA10	18			139.11			
Chitosan5	19				141.53		
Chitosan10	20					143.65	
ALA1	19					144.53	
ALA5	20						146.75

ALA-Chitosan1	19						147.42
Sig.		1.000	1.000	.747	1.000	.346	.471

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.852.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

จำนวนเม็ล็ดดี/รวง

Duncan

group	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Control	18	111.00					
ALA-Chitosan10	17		117.76				
ALA-Chitosan5	19			120.21			
ALA10	18			121.33			
Chitosan1	20			121.70			
Chitosan5	19				125.32		
Chitosan10	20					128.65	
ALA1	19					130.42	
ALA5	20						134.10
ALA-Chitosan1	19						135.58
Sig.		1.000	1.000	.131	1.000	.058	.112

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.852.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

จำนวนเม็ล็ดลีบ/รวง

Duncan

group	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
ALA-Chitosan1	19	11.84						
ALA5	20	12.65						
ALA1	19		14.11					
Chitosan10	20		15.00					
Chitosan5	19			16.21				
Chitosan1	20				17.25			
ALA10	18				17.78	17.78		
ALA-Chitosan5	19					18.58		
ALA-Chitosan10	17						19.59	
Control	18							20.56
Sig.		.079	.052	1.000	.249	.081	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 18.852.
 b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

น้ำหนักข้าวเปลือก 100 เมล็ด (กรัม)

Duncan

group	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Control	3	1.967					
ALA-Chitosan10	3		2.167				
ALA-Chitosan5	3			2.333			
Chitosan1	3			2.433			
ALA10	3			2.433			
ALA1	3				2.600		
Chitosan5	3				2.633		
Chitosan10	3					2.767	
ALA5	3					2.833	2.833
ALA-Chitosan1	3						2.900
Sig.		1.000	1.000	.104	.557	.246	.246

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.