บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และสายพันธุ์ ATCC 42023 พบว่า เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะรูปร่างหลายแบบคือ รูปร่างแบบบลาสโตสปอร์ คลาไมโดสปอร์ เซลล์พอง และรูปร่างแบบเส้นใย ที่สำคัญคือ พบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกำลังหลั่งพูลลูแลนออกภายนอกเซลล์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Simon และคณะ (1993) ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* ระหว่างการผลิตพูลลูแลน พบลักษณะเซลล์รูปร่างต่าง ๆ ประกอบด้วย รูปร่างแบบบลาสโตสปอร์ คลาไมโดสปอร์ เซลล์พอง และรูปร่างแบบเส้นใยในระหว่างการผลิตพูลลูแลน โดยรูปร่างแบบเซลล์พอง และคลาไมโดสปอร์เป็นรูปร่างที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตพูลลูแลน และสอดคล้องกับ Lamaipis และ Punnapayak (1996) ซึ่งรายงานไว้ว่า *A. pullulans* มีรูปร่างหลายแบบในระหว่างการเจริญในอาหารเหลวประกอบด้วยรูปร่างที่คล้ายเซลล์ยีสต์ คลาไมโดสปอร์ เซลล์พอง รูปร่างแบบเส้นใย และการหลั่งของพูลลูแลนในเซลล์รูปร่างแบบเซลล์พอง นอกจากนั้นจากการสำรวจเอกสารเกี่ยวกับการหลั่งพูลลูแลนออกมาภายนอกเซลล์ไม่พบการรายงานการหลั่งของพูลลูแลนออกมาภายนอกเซลล์ด้วยภาพถ่าย ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* อย่างยิ่งต่อไป

ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับพูลลูแลนมาตรฐาน (Sigma, USA) เพื่อศึกษาว่าไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตขึ้นนี้มีความเหมือน หรือ แตกต่างไปจากพูลลูแลนมาตรฐานอย่างไร จากผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง IR spectrophotometer พบว่า ไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีองค์ประกอบของโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับพูลลูแลนมาตรฐานมาก มีเพียงองค์ประกอบเดียวที่ต่างไปจากพูลลูแลนมาตรฐาน คือ องค์ประกอบที่มีหมู่ไนโตรเจนรวมอยู่ อาจเป็นไปได้ว่าองค์ประกอบที่มีหมู่ไนโตรเจนรวมอยู่ด้วยนั้นเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างทางเคมีของเซลล์เชื้อจุลินทรีย์ เช่น โปรตีน เป็นต้น ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย เนื่องจากในระหว่างการสกัดพูลลูแลนออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อต้องผ่านกระบวนการปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยกระบวนการนี้อาจมีเซลล์ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ปะปนอยู่ด้วย และเมื่อนำไปสกัดแยกพูลลูแลนออกจากน้ำเลี้ยงนั้นสารเคมีที่ใช้ในการแยกพูลลูแลนคือ เอทธานอล ซึ่งเอทธานอลนี้เป็นสารเคมีที่สามารถทำลายชั้นผนังเซลล์ได้ทำให้ผนังเซลล์เกิดรูพรุนจากการทำลายชั้นฟอสโฟลิปิด (phospholipid) โปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของไซโตรพลาสซึม (cytoplasm) อาจหลุดปะปนกับพูลลูแลนที่สกัดได้ ดังนั้นเมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง

IR spectrophotometer จึงพบหมู่ฟังชั่นนัลที่เป็นหมู่อะมิโนดังผลการทดลอง แต่สำหรับพูลลูแลนมาตรฐานนั้นมีกระบวนการในการสกัดพูลลูแลนเพื่อให้เกิดความบริสุทธิ์หลายขั้นตอน ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง IR spectrophotometer จึงไม่พบหมู่อะมิโนเป็นองค์ประกอบ

เนื่องจากการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยที่สำคัญได้แก่ ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ชนิดของแหล่งคาร์บอน และชนิดของแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาถึงผลของ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพูลลูแลนทำให้ทราบว่า ชนิดของสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อระดับ pH เริ่มต้นต่างๆ ในการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตได้ต่างกันโดยสายพันธุ์ ATCC 42023 จะเจริญเติบโตได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ NRRL 6992 แต่ในทางตรงกันข้ามกับให้ผลผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์ NRRL 6992 และระดับ pH เริ่มต้นก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ต่างกันเช่นกันโดยที่ระดับ pH 4.0 เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตได้สูงสุดแต่จะให้ผลผลิตต่ำสุด ในขณะที่ระดับ pH ที่ 6.5 มีการเจริญเติบโตต่ำกว่าแต่ให้ผลผลิตได้สูงสุด โดยสายพันธุ์ NRRL 6992 ให้ผลผลิตสูงสุด 0.236 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และ สายพันธุ์ ATCC 42023 ให้ผลผลิตสูงสุด 0.471 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ West และ Hamer (1993) ที่ได้ศึกษาถึงผลกระทบของ pH ต่อการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 พบว่า ระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพูลลูแลนคือ ระดับ pH เริ่มต้นที่ 6.5 และยังสอดคล้องกับ Ono และคณะ (1977) ที่ได้ศึกษาถึงผลกระทบของ pH ต่อการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ S-1 พบว่าที่ระดับ pH เริ่มต้นที่ 2.5 เป็นระดับ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเซลล์ และระดับ pH เริ่มต้นที่ 6.0 เป็นระดับ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพูลลูแลน นอกจากนั้น Lacroixt และคณะ (1985) ซึ่งศึกษาถึงผลกระทบของ pH ต่อการผลิตพูลลูแลน พบว่า ความเข้มข้นของมวลของเซลล์มีปริมาณสูงมากที่ระดับ pH เริ่มต้นต่ำๆ เช่น pH 2.0

จากการศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ทราบว่า ชนิดของสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อระดับอุณหภูมิต่างๆ ในการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตได้ต่างกัน โดยสายพันธุ์ ATCC 42023 จะเจริญเติบโตได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ NRRL 6993 แต่ในทางตรงกันข้ามกับจะให้ผลผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์ NRRL 6993 ระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของทั้ง 2 สายพันธุ์เช่นกันโดยที่ระดับอุณหภูมิ 25°C เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเจริญเติบโตได้สูงสุด และต่ำสุดที่ระดับอุณหภูมิ 35°C ถึงแม้ว่าระดับอุณหภูมิที่ 30°C

สายพันธุ์ NRRL 6992 นั้นจะมีการเจริญเติบโตสูงสุดสูงกว่าที่ระดับอุณหภูมิ 25°C ก็ตาม แต่การเจริญเติบโตใน 6 วันแรกนั้นมีการเจริญเติบโตได้ต่ำกว่าที่ระดับอุณหภูมิ 25°C เช่นกัน ในขณะที่ระดับอุณหภูมิ 30°C เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์มีการตอบสนองและให้ผลผลิตได้สูงที่สุด และต่ำสุดที่ระดับอุณหภูมิ 35°C โดยสายพันธุ์ NRRL 6992 ให้ผลผลิตสูงสุด 0.236 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และสายพันธุ์ ATCC 42023 ให้ผลผลิตสูงสุด 0.471 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ซึ่ง West และ Hamer (1993) ได้ศึกษาถึงผลกระทบจากอุณหภูมิต่อการผลิตพูลลูแลนของสายพันธุ์ ATCC 42023 โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่ง พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจะอยู่ที่ระดับอุณหภูมิ 30°C และอุณหภูมิที่ เหมาะสมต่อการผลิตพูลูแลนอยู่ที่ระดับอุณหภูมิ 25°C ขณะที่ McNeil และ Kristiansen (1990) ซึ่งศึกษาถึงผลกระทบของอุณหภูมิต่อการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* ในถังหมักโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจะอยู่ที่ระดับ 32°C แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลนนั้นอยู่ที่ระดับ 24 °C แต่ West และ Hamer (1993) แนะนำว่าเมื่อชนิดของแหล่งคาร์บอนเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลให้ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตพูลลูแลนจะเปลี่ยนแปลงเช่นกัน ดังนั้นจึงสรุปได้เพียงว่าระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตนั้นจะไม่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลน และเมื่อชนิดของแหล่งคาร์บอนเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลให้ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต และการผลิตพูลลูแลนเปลี่ยนแปลงไปเช่นกัน

จากการศึกษาถึงผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพูลลูแลนทำให้ทราบว่า ชนิดของสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อชนิดของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตได้ต่างกันโดยสายพันธุ์ ATCC 42023 มีการเจริญเติบโตได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ NRRL 6992 แต่ในทางตรงกันข้ามกลับให้ผลผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์ NRRL 6992 และชนิดของแหล่งคาร์บอนก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ต่างกันเช่นกันโดยสายพันธุ์ NRRL 6992 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดเมื่อใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับสายพันธุ์ ATCC 42023 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ ต่ำสุดเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดเมื่อใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสายพันธุ์ NRRL 6992 ให้ผลผลิตสูงสุด 0.310 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และสายพันธุ์ ATCC 42023 ให้ผลผลิตสูงสุด 0.525 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Ueda และคณะ (1963) พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *P. pullulans* ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นให้ผลผลิตพูลลูแลนสูงกว่าแหล่งคาร์บอน

ชนิดอื่นๆ และสอดคล้องกับ Leathers และคณะ (1988) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพูลลูแลน นอกจากนั้นผลการทดลองนี้ยังได้สอดคล้องกับ West และ Hamer (1991) ที่ได้ศึกษาถึงความสามารถของเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 ต่อการผลิตพูลลูแลน พบว่าแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตพูลลูแลนคือ น้ำตาลซูโครสเช่นเดียวกัน

จากการศึกษาถึงผลของชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตพูลลูแลนทำให้ทราบว่าชนิดของสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ในการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตได้ต่างกันโดยสายพันธุ์ ATCC 42023 มีการเจริญเติบโตได้ต่ำกว่าสายพันธุ์ NRRL 6992 แต่ในทางตรงกันข้ามกับให้ผลผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์ NRRL 6992 และชนิดของแหล่งไนโตรเจนก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ต่างกันเช่นกันโดยสายพันธุ์ NRRL 6992 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อใช้ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน และต่ำสุดเมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และต่ำสุดเมื่อใช้ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับสายพันธุ์ ATCC 42023 มีการเจริญเติบโตสูงสุดเมื่อใช้ NH_4NO_3 และต่ำสุดเมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และต่ำสุดเมื่อใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยสายพันธุ์ NRRL 6992 ให้ผลผลิตสูงสุด 0.310 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และสายพันธุ์ ATCC 42023 ให้ผลผลิตสูงสุด 0.525 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ผลที่ได้สอดคล้องกับ Auer และ Seviour (1990) ซึ่งศึกษาถึงอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตพูลลูแลนโดย *A. pullulans* พบว่า $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตแต่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตพูลลูแลน ในทางตรงกันข้าม $(NH4)_2SO_4$ นั้นเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตพูลลูแลน แต่ไม่เหมาะต่อการการเจริญเติบโตของเชื้อ นอกจากนั้นยังสอดคล้องกับ West และ Strohfus (1996 b) ศึกษาเปรียบเทียบผลผลิตของพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ และ กากเหลือจากการหมักข้าวโพดเพื่อผลิตแอลกอฮอล์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตพูลลูแลน

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของสายพันธุ์ NRRL 6992 และ สายพันธุ์ ATCC 42023 จากภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลนด้วยสูตรอาหารดัดแปลงแหล่งฟอสเฟตกับผลผลิตของสายพันธุ์ NRRL 6992 และ สายพันธุ์ ATCC 42023 จากการทดลองของ Leathers และคณะ (1988) และ West และ Hamer (1993) ซึ่งให้ผลผลิตพูลลูแลนสูงสุด 0.12 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และ 0.16 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ แต่ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากภาวะที่เหมาะสมในการผลิตของทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ NRRL 6992 และสายพันธุ์ ATCC 42023 จากสูตรอาหารดัดแปลงแหล่งฟอสเฟตให้ผลผลิตพูลลูแลน

ได้สูงถึง 0.310 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และ 0.525 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าผลผลิตจากนักวิทยาศาสตร์ทั้งสองท่านที่ได้รายงานไว้มาก และ เมื่อเปรียบเทียบถึงผลผลิตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023 จากภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลนแล้ว พบว่า สายพันธุ์ ATCC 42023 ให้ผลผลิตพูลลูแลนได้สูงถึง 0.525 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ซึ่งสูงกว่าพูลลูแลนจากสายพันธุ์ NRRL 6992 ซึ่งให้ผลผลิตสูงสุด 0.310 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ NRRL 6992 จะให้ผลผลิตสูงสุดต่ำกว่าพูลลูแลนจากสายพันธุ์ ATCC 42023 แต่เมื่อวิเคราะห์ถึงคุณภาพของพูลลูแลน และการย่อยสลายในธรรมชาติแล้ว พบว่า พูลูแลนจากสายพันธุ์ NRRL 6992 นั้นปราศจากเม็ดสีเมลานินที่ปนเปื้อนกับพูลลูแลนจากสายพันธุ์ ATCC 42023 นอกจากนั้นยัง พบว่าพูลลูแลนจากสายพันธุ์ NRRL 6992 มีความสามารถสลายตัวในธรรมชาติได้รวดเร็วกว่าพูลลูแลนจากสายพันธุ์ ATCC 42023 ดังนั้นสายพันธุ์ NRRL 6992 จึงเหมาะสมต่อการนำไปผลิตในเชิงอุตสาหกรรม หรือ ทดลองปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการผลิตต่อไป

สำหรับการเปรียบเทียบการสลายตัวทางธรรมชาติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023 โดยการวางบนผิวดินเป็นเวลานาน 9 วัน พบว่า พูลลูแลนที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ NRRL 6992 นั้นมีคุณสมบัติในการย่อยสลายได้ดีกว่าพูลลูแลนที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ ATCC 42023 ซึ่งเกิดจากคุณสมบัติบางประการที่ต่างกัน คือ คุณสมบัติในการดูดความชื้น โดยสังเกตได้จากความสามารถในการดูดซับความชื้นในดิน และสลายตัวจากผลการทดลอง พบว่าพูลลูแลนที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ NRRL 6992 นั้นความสามารถในการดูดซับความชื้นในดิน และสลายตัวได้ในระยะที่สั้นเพียง 1-3 วันเท่านั้น ในขณะที่พูลลูแลนที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ ATCC 42023 ถึงแม้ว่าจะมีการดูดซับความชื้นได้ดีตั้งแต่ 1 วันหลังจากการวางบนผิวดินก็ตาม แต่การสลายตัวนั้นสังเกตพบว่าเกิดขึ้นช้ามาก คุณสมบัติอีกประการหนึ่งที่ต่างกันคือ พูลลูแลนที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ ATCC 42023 นั้นมีเม็ดสีเมลานินรวมอยู่กับชิ้นพูลลูแลน ในขณะที่ว่าพูลลูแลนที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ NRRL 6992 นั้นไม่มีเม็ดสีดังกล่าวปะปน อาจเป็นไปได้ว่าเม็ดสีดังกล่าวนี้มีส่วนช่วยยึดโครงสร้างของพูลลูแลนไว้ได้ทำให้การสลายตัวเนื่องจากความชื้น หรือ จากเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ช้ากว่าพูลลูแลนที่ไม่มีเม็ดสีปะปน ดังนั้นประเด็นในเรื่องการสลายตัวในธรรมชาตินี้จึงเป็นอีกประเด็นหนึ่งที่ควรมีการศึกษาค้นคว้าต่อไปอย่างยิ่ง