

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จันทร์หา ทงคำเกา และเบญจลักษณ์ กาญจนเศรษฐ์. 2537. ภูมิปัญญาชาวบ้าน. จุลสารสภาวะแวดล้อม 13: 8-27, 36.
- ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, งานสารสนเทศ. 2540. พลาสติกที่ย่อยสลายได้. ข่าวเทคโนโลยีชีวภาพ. 3(8): 4-5.

ภาษาอังกฤษ

- Andrew, J.H., Harris, R.F., Spear, R.N., Lau, G.W., and Nordheim, E.V. 1994. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. **Canadian Journal of Microbiology** 40: 6-17
- Aure, D. P. F., and Seviour, R. J. 1990. Influence of varying nitrogen source on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. **Applied Microbiology Biotechnology** 32: 637-644
- Bender, H., Lehmann, J. and Wallenfels, K. 1959. Pullulan , ein extracelluläres glucan von Pullularia pullulans. **Biochem. Biophys. Acta** 36: 309-16
- Bernier, B. 1958. The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter. **Canadian Journal of Microbiology** 4: 195-204
- Berry, D. R. 1988. Extracellular polysacchrides. **Physiology of Industrial Fungi**. pp. 146-149. Oxford London : Blackwell Scientific publication.
- Boa, J. M., and LeDuy, A. 1984. Peat hydrolysate medium optimization for pullulan production. **Applied Environmental Microbiology** 48: 26-30
- Boa, J. M., and LeDuy, A. 1987. Pullulan from peat hydrolyzate fermentation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering** 30: 463-470
- Bulmer, M. A., Catley, B. J., and Kelly, P. J. 1987. The effect of ammonium ion and pH on the elaboration of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan, by *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology Biotechnology** 25: 362-365

- Catley, B. J. 1971 a. Utilization of carbon sources by *Pullularia pullulans* for the elaboration of extracellular polysaccharides. **Applied Microbiology** 22(4): 641-649
- Catley, B. J. 1971 b. Role of pH and nitrogen limitation in the elaboration of the extracellular polysaccharide pullulan by *Pullularia pullulans*. **Applied Microbiology** 22: 650-654
- Catley, B. J. 1973. The rate of elaboration of the exopolysaccharide, pullulan during growth of *Pullularia pullulans*. **Journal of General Microbiology** 78: 33-38
- Englbrecht, U., and Schmidt, H.L. 1992. Flow injection analysis with immobilized enzymes for process control of pullulan production by fermentation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 53: 397-400
- Finkelman, M. A. J., and Vardanis, A. 1982. Pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* protoplasts. **Applied and Environment Microbiology** 44(1): 121-127
- Gibbs, P. A., and Seviour, R. J. 1992. Influence of bioreactor design on exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters** 14(6): 491-494
- Imshenetskii, A. A., Kondrat'eva, T. F., and Smut'ko, A. N. 1981. Influence of the acidity of the medium, conditions of aeration, and temperature on pullulan biosynthesis by polyploid strains of *Pullularia (Aureobasidium) pullulans*. **Microbiology** 50(3): 471-475
- Kondrat'eva, T. F., and Lobacheva, N. A. 1991. Use of a mathematical planning method for optimizing the growth medium composition to increase the quantity of pullulan synthesized by *Pullularia pullulans*. **Microbiology** 59(6): 1004-1009
- Lacroix, C., LeDuy, A., Noel, G., and Choplin, L. 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. **Biotechnology and Bioengineering** 27: 202-207
- Lamaipis, P., and Punnapayak, H. 1996. Morphological studies of a polymer producing *Aureobasidium pullulans*, **Proceedings**, Asian International Mycological Congress, Chiba, Japan, pp. 195
- Leathers, T. D., Nofsingerm, G.W., Kurtzman, C. P., and Bothast, R. J. 1988. Pullulan production by color variant strains of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters** 15(11): 1167-1172
- LeDuy, A., and Boa, J. M. 1983. Pullulan production from peat hydrolyzate. **Canadian Journal of Microbiology** 29: 143-146

- Lee, K. Y., and Yoo, Y. J. 1993. Optimization of pH for high molecular weight pullulan. **Biotechnology Letters** 15(10): 1021-1024
- McNeil, B., and Kristiansen, B. 1987. Influence of impeller speed upon the pullulan fermentation. **Biotechnology Letters** 9(2): 101-104
- McNeil, B., and Kristiansen, B. 1990. Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks. **Enzyme Microbiology and Technology** 12: 521-526
- McNeil, B., Kristiansen, B., and Seviour, R. J. 1989. Polysaccharide production and morphology of by *Aureobasidium pullulans* in continuous culture. **Biotechnology and Bioengineering** 33: 1210-1212
- Moscovici, M., Ionescu, C., Oniscu, C., Fotea, O., and Hanganu, L.D. 1993. Exopolysaccharide by a fast-producing strain of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters** 15(11): 1167-1172
- Ono, K., Yasuda, N., and Ueda, S. 1977. Effect of pH on pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* S-1. **Agriculture of Biology and Chemistry**, 41(11): 2113-2118
- Perkin Elmer Corporation. 1990. **Search application program, Perkin-Elmer infrared data station**. Volume 1. U.S.A.
- Pollock, T.J. 1992. Pullulan from polymorphic *Aureobasidium pullulans*. **Society for Industrial Microbiology News** 42(4): 147-155
- Reeslev, M., Jorgensen, B. B., and Jorgensen, O. B. 1993. Influence of Zn^{2+} on yeast-mycelium dimorphism and exopolysaccharide production by the fungus *Aureobasidium pullulans* grown in a defined medium in continuous culture. **Journal of General Microbiology** 139: 3065-3070
- Rho, D., Mulchandani, A., Luong, J. H. T., and LeDuy, A. 1988. Oxygen requirement in pullulan fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 28: 361-366
- Schuster, R., Wenzig, E., and Mersmann, A. 1993. Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 39: 155-158

- Seviour, R. J., and Kristiansen, B. 1983. Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. **European Journal of Applied Microbiology Biotechnology** 17: 178-181
- Shin, Y. C., Kim, Y. H., Lee, H. S., Kim, Y. N., and Byun, S. M. 1987. Production of pullulan by a fed-batch fermentation. **Biotechnology Letters** 9(9): 621-624
- Shin, Y. C., Kim, Y. H., Lee, H. S., Cho, S. J., and Byun, S. M. 1989. Production of exopolysaccharide pullulan from inulin by a mixed culture of *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnology and Bioengineering** 33: 129-133
- Silman, R. W., Bryan, W. L., and Leathers, T. D. 1990. A comparison of polysaccharides from strains of *Aureobasidium pullulans*. **FEMS Microbiology Letters** 71: 65-70
- Simon, L., Vaugien, C. C., and Bouchonneau, M. 1993. Relation between pullulan production, morphology state and growth condition in *Aureobasidium pullulans*: new observations. **Journal of General Microbiology** 139: 979-985
- Slodki, M. E., and Cadmus, M. C. 1978. Production of microbial polysaccharide. **Advance Applied Microbiology**. 23: 19-54
- Sowa, W., Blackwood, A. C. and Adams, G. A. 1963. Neutral extracellular glucan of *Pullularia pullulans* (De Bary) Berkhout. **Canadian Journal of Chemistry** 41: 2314-2319
- Stasinopoulos, S. J., Seviour, R. J., and Auer, D. F. 1989. Inhibition of fungal exopolysaccharide production by chemical antifoams. **Letters and Applied Microbiology** 8 : 91-93
- Tsujisaka, T. and Mitsuhashi, M. 1988. Manufacture of pullulan. In the amylase research society of Japan (ed)., **Handbook of amylases and related enzymes**, pp. 221-224. Great Britain : Pergamon Press.
- Ueda, S., Fujita, K., Komatsu, K. and Nakashima, Z. I. 1963. Polysaccharide produced by the genus *Pullularia* I. Production of polysaccharide by growing cells. **Applied Microbiology** 11: 211-215
- Wecker, A., and Onken, U. 1991. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters** 13(3): 155-160
- West, T. P. 1990. Corn utilization in the production of pullulan. **Corn utilization conference III proceedings**. pp. 1-3

- West, T. P., and Hamer, B. R. 1991. Ability of *Aureobasidium pullulans* to synthesize pullulan upon selected sources of carbon and nitrogen. **Microbios** 67: 117-124
- West, T. P., and Hamer, B. R. 1993 a. Effect of temperature on pullulan production in relation to carbon source. **Microbios** 72: 261-268
- West, T. P., and Hamer, B. R. 1993 b. Polysaccharide production by a reduced pigmentation mutant of the fungus *Aureobasidium pullulans*. **FEMS Microbiology Letters** 113: 345-350
- West, T. P., and Hamer, B. R. 1995. Effect of oils and surfactants on pullulan production relative to nitrogen source. **Microbios** 83: 249-259
- West, T. P., and Strohfus, B. 1996 a. A pullulan-degrading enzyme activity of *Aureobasidium pullulans*. **Journal Basic for Microbiology** 36(5): 377-380
- West, T. P., and Strohfus, B. 1996 b. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* grown on ethanol stillage as a nitrogen source. **Microbios** 88: 7-18
- Wickerham, L. J., and Kurtzman, C. P. 1975. Synergistic color variants of *Aureobasidium pullulans*. **Mycologia** 67 : 342-361
- Yamasaki, H., Lee, M. S., Tanaka, T. and Nakanishi, K. 1993. Improvement of performance for cross-flow membrane filtration of pullulan broth. **Applied Microbiology and Biotechnology** 39: 21-25
- Yuen, S. 1974. Pullulan and its applications. **Process Biochemistry** 9: 7-9, 22
- Zajic, J. E., and LeDuy, A. 1973. Flocculant and chemical properties of a polysaccharide from *Aureobasidium pullulans*. **Applied Microbiology** 25: 328-635

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Production medium (Ueda *et al.*, 1963)

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

Glucose	50	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.6	กรัม
K_2HPO_4	5.0	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
Yeast extract	0.4	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับให้มี pH 6.5 ถ่ายใส่พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตรให้มี ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

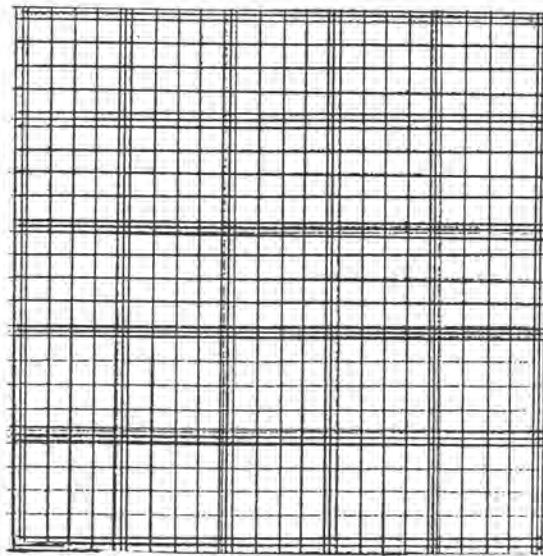
หมายเหตุ งานวิจัยนี้ทดลองตัดแปลงสูตรอาหารของ Ueda และ คณะ, 1963 โดยเปลี่ยน องค์ประกอบจาก K_2HPO_4 ไปเป็น KH_2PO_4 แทน

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์ผล

1. การนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Counting chamber ของ Heamacytometer

เมื่อนำ Heamacytometer มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นดังภาพ



ประกอบด้วยช่องขนาดใหญ่จำนวน 25 ช่อง แต่ละช่องใหญ่ยังประกอบด้วยช่องเล็กอีก 25 ช่อง

วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก) = 0.1 มม.³

สมมุติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่ = X เซลล์

สมมุติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก = Y เซลล์

นั่นคือ $X = 16Y$ เซลล์

เพราะฉะนั้น

ใน 0.1 มม.³ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด $X \times 25$ หรือ $Y \times 16 \times 25$ เซลล์

ใน 1.0 มม.³ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด $X \times 25 \times 10$ หรือ $Y \times 16 \times 25 \times 10$ เซลล์

ใน 1.0 มล. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด $X \times 25 \times 10 \times 1000$ หรือ $Y \times 16 \times 25 \times 10 \times 1000$ เซลล์

= $25X \times 10^4$ หรือ $4Y \times 10^6$ เซลล์

2. การหาน้ำหนักแห้งของเชื้อรา

แยกเซลล์ของเชื้อ *A. pullulans* จากอาหารเหลวโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อออก ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งต้องเขย่าให้เซลล์ผสมเข้ากันกับน้ำกลั่น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที แยกเซลล์ไปอบในตู้อบฆ่าเชื้อเพื่อหาน้ำหนักแห้ง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

3. การตกตะกอนพุลลูแลนด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์

นำอาหารเหลวที่ได้จากข้อ 3 ผสมกับเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ส่วน เขย่าจนพุลลูแลนแยกออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอน กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No 1 วัดปริมาณพุลลูแลนที่ผลิตได้จากเชื้อราโดยนำพุลลูแลนไปอบในตู้อบแห้งเพื่อหาน้ำหนักแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

4. การเตรียมสารละลาย Nelson-Somogyi (Nelson-Somogyi colorimetric Determination)

4.1 สารละลาย A

Na_2CO_3	25.0	กรัม
NaK Tartrate (Rochelle salt)	25.0	กรัม
NaHCO_3	20.0	กรัม
Na_2SO_4	200.0	กรัม

4.2 สารละลาย B

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	15	กรัม + H_2SO_4 เข้มข้น 2 หยด
---	----	--

4.3 สารละลาย C (Alkaline copper reagent)

ผสมสารละลาย A 25 มิลลิลิตร กับสารละลาย B 1 มิลลิลิตร (เตรียมสด)

4.4 สารละลาย D (Arsenomolybdate reagent)

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดรท 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันใน H_2SO_4 เข้มข้น 21 มิลลิลิตร ใส่ $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน เก็บไว้ในขวดสีชา

5. การทำกราฟน้ำตาลมาตรฐาน

- 5.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวิซ์ให้มีความเข้มข้น 0 25 50 75 100 125 150 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ใส่ในหลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
- 5.2 ใส่สารละลาย C ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา
- 5.3 ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที
- 5.4 ทำให้เย็นด้วยน้ำเย็น
- 5.5 ใส่สารละลาย D ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 5.6 ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง
- 5.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 550 นาโนเมตร นำค่าที่อ่านได้มาสร้างกราฟระหว่างค่า OD กับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ดังรูปที่ ข. 1 และ ข. 2

6. การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลซูโครส

นำค่า area ที่ได้จากการวัดน้ำตาลซูโครสด้วยเครื่อง Hyper Performance Liquid Chromatography (HPLC) ไปหาค่าปริมาณน้ำตาลซูโครสจากกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ข. 3)

กำหนดให้

X = area ของน้ำตาลซูโครสที่เกิดขึ้น

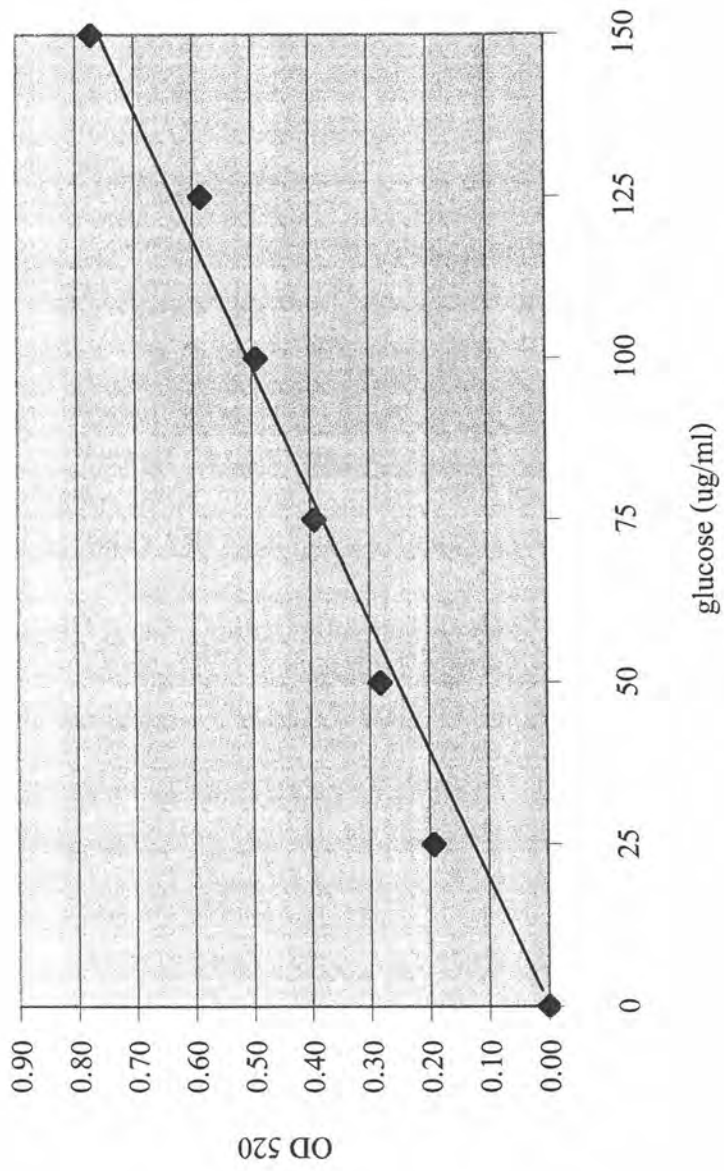
Y = ปริมาณของสารละลายน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ (มก./มล.)

นั่นคือ

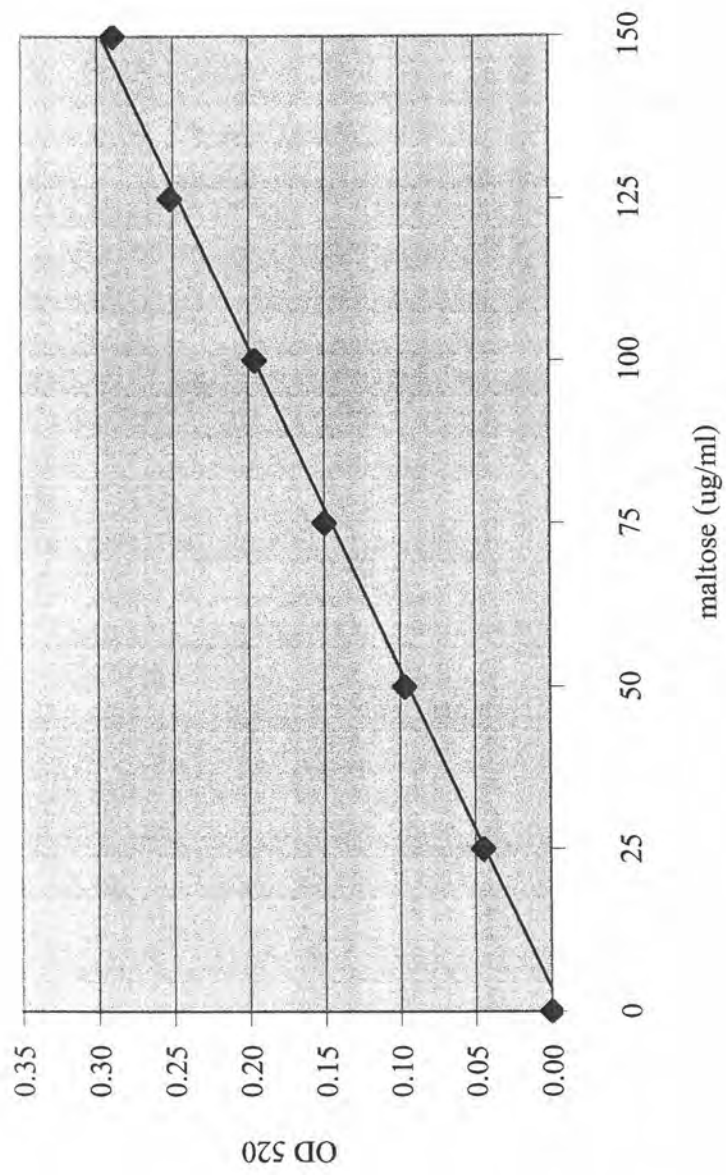
ปริมาณของน้ำตาลซูโครส = X/Y = มก./มล.

7. การวิเคราะห์ความเป็นพอลิเมอร์ด้วยเครื่อง Infrared spectrophotometer

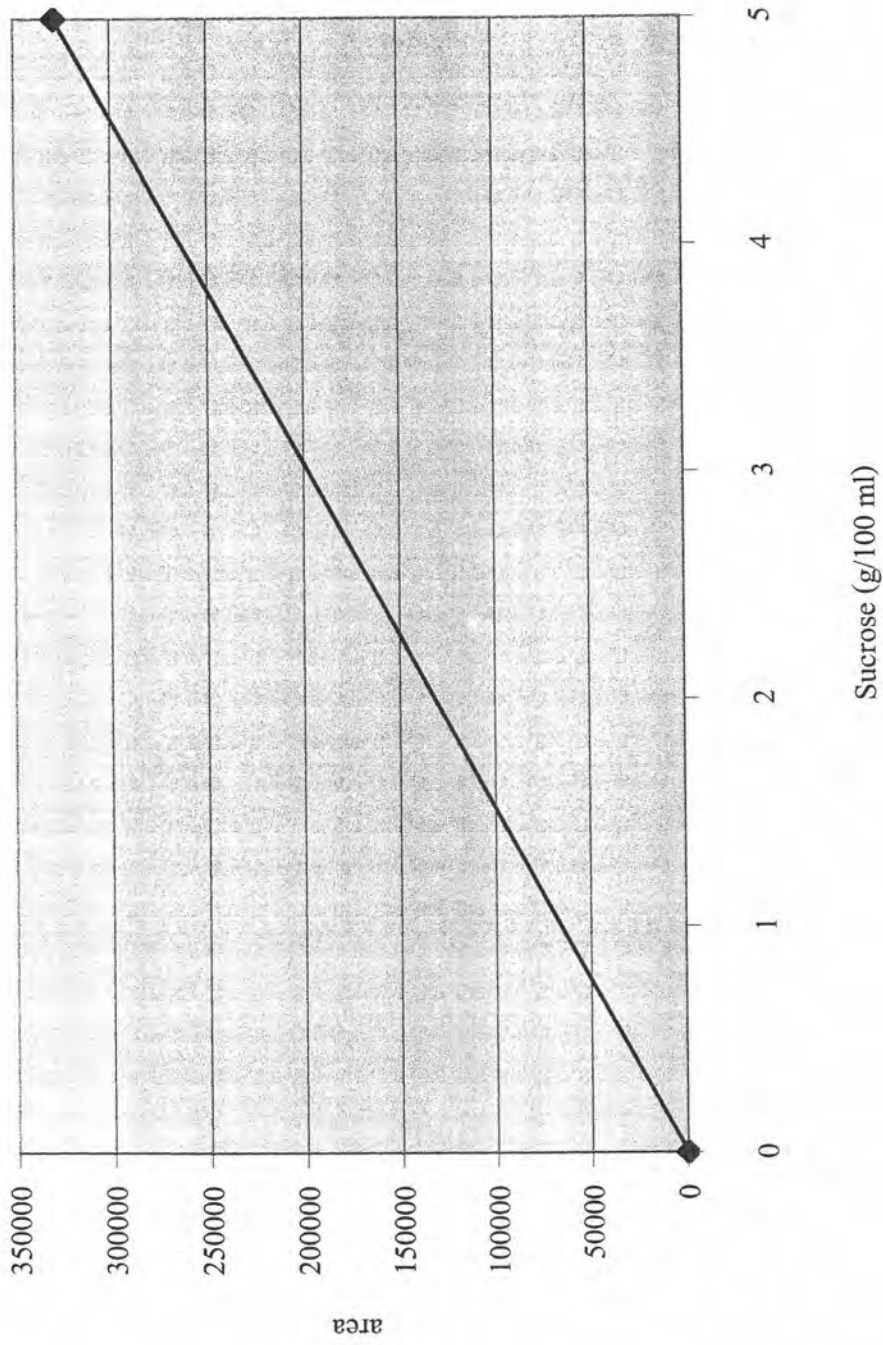
- 7.1 นำพอลิเมอร์มาตรฐาน และพอลิเมอร์ที่ต้องการวิเคราะห์มาบดให้ละเอียด
- 7.2 ชั่งน้ำหนักของพอลิเมอร์ในแต่ละตัวอย่างให้เท่ากัน
- 7.3 ผสม KBr ลงไป 95%
- 7.4 อัดให้เข้ากัน
- 7.5 นำเข้าเครื่องเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมี
- 7.6 นำกราฟที่ได้ไปแปลผล



รูปที่ ข. 1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ ข. 2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส



รูปที่ ข. 3 กราฟมาตรฐานแสดงน้ำตาลซูโครส

ประวัติผู้เขียน

นายพงษ์ศักดิ์ ละไมพิศ เกิดเมื่อวันที่ 12 ธันวาคม พ.ศ. 2516 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี
วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์บางพระ สถาบันเทคโนโลยี
ราชมงคล ปีการศึกษา 2537 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2538 และสำเร็จการศึกษาใน
ปีการศึกษา 2540