

ลักษณะสมบัติและการประยุกต์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ฟิล์มจาก *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 ร่วมกับซินนามาลดีไฮด์



นางสาวจิตมณี ศรีสุขอัยกา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FILM FROM *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 WITH CINNAMALDEHYDE

Miss Jitmanee Srisookaiyaka



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial

Technology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ลักษณะสมบัติและการประยุกต์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์
ฟิล์มจาก *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 ร่วมกับ
ซินนามาลดีไฮด์

โดย

นางสาวจิตมณี ศรีสุขอัยกา

สาขาวิชา

จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ซาลีดา บรมพิชัยชาติกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ซาลีดา บรมพิชัยชาติกุล)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

จิตมณี ศรีสุขอัยกา : ลักษณะสมบัติและการประยุกต์เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ฟิล์มจาก *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 ร่วมกับซินนามาลดีไฮด์ (CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FILM FROM *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 WITH CINNAMALDEHYDE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. ชาลิตา บรมพิชัยชาติกุล, 136 หน้า.

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* YP6-14 จัดเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว และทำปฏิกิริยากับเอนไซม์พอลูลูรานเนส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลมอลโทโทรโอส มีสมบัติการละลายน้ำที่ดี ทนความร้อน มีความชื้นหนืดสามารถก่อรูปฟิล์ม และเมื่อเติมผสมซินนามาลดีไฮด์เพื่อเพิ่มสมบัติการต้านจุลินทรีย์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญได้ในจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งตัวแทนของราและแบคทีเรียในความเข้มข้นที่ต่ำ เมื่อใช้สารละลายฟิล์มที่มีความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาขึ้นรูปแผ่นฟิล์มพบว่า ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ผสมสารมีลักษณะใส บาง เป็นแผ่นเรียบ ไม่มีสีและกลิ่น แผ่นฟิล์มมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันทั่วแผ่น ในขณะที่แผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์มีสีเหลือง และมีความทึบมากกว่า มีกลิ่นของอบเชย เมื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าแผ่นฟิล์มไม่เป็นเนื้อเดียวกัน สารถูกกักเป็นหยดกลมกระจายอยู่ทั่วภายในเนื้อฟิล์ม ส่งผลให้แผ่นฟิล์มมีความหนามากขึ้น และเพิ่มสมบัติการต้านการซึมผ่านไอน้ำในฟิล์มผสมสาร 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขั้นตอนการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มต้องอาศัยความร้อนในระเหยตัวทำละลาย (น้ำ) ออกส่งผลให้ซินนามาลดีไฮด์สูญเสียไปในขั้นตอนนี้ประมาณ 70% เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี เมื่อติดตามปริมาณซินนามาลดีไฮด์ที่คงอยู่ในแผ่นฟิล์มพบว่า สารค่อยๆลดปริมาณในแต่ละสัปดาห์แต่ยังคงมีปริมาณสูงกว่าค่า MIC แม้ในสัปดาห์ที่ 5 และยังมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เมื่อนำแผ่นฟิล์มไปทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และนำมาติดตามประสิทธิภาพการต้านการเจริญในโมเดลอาหารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5871920123 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: AUREOBASIDIUM PULLULANS, EXOPOLYSACCHARIDE, EDIBLE FILM / CINNAMALDEHYDE / ANTIMICROBIAL ACTIVITY

JITMANEE SRISOOKAIYAKA: CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FILM FROM *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 WITH CINNAMALDEHYDE. ADVISOR: ASSOC. PROF. JIRAPORN THANIYAVARN, CO-ADVISOR: ASST. PROF. CHALEEDA BOROMPICHAICHARTKUL, Ph.D., 136 pp.

Polysaccharide from *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 is a homopolysaccharide, contains solely glucose as constituent. The reaction with pullulanase which hydrolyses α -(1,6) glycosidic bond produces maltotriose as final product. This polysaccharide is well dissolved in water the solution of which is heat stable with thick solution appearance and able to form film. Film solution was mixed with cinnamaldehyde (CH) as an antimicrobial additive. CH exhibited good growth inhibition both of tested fungi and bacteria at low concentration. Film forming solutions with CH 24 and 30 mg/ml were chosen to form the films. The film without CH was thin, smooth, homogeneously in texture, colorless and odorless while the CH incorporated film showed more yellowness, less transparent with cinnamon smell. The small CH droplets were found in the matrix of the modified film under scanning electron microscope. The addition of CH caused film to be inhomogeneous, more color different and thicker film. Moreover, the modified polysaccharide film with CH at 30 mg/ml increased water vapor permeability of the film. In the process of film preparation, the use of hot air to evaporate solvent (water) away caused CH loss by 70%. At room temperature CH was gradual decrease every week nevertheless, remained higher than MIC value even at 5 weeks of standing. The antimicrobial activity of the films incorporated with CH were observed on food model and agar plate. The polysaccharide film with CH 30 mg/ml showed the highest inhibiting activity on the tested microorganism.

Department: Microbiology Student's Signature

Field of Study: Microbiology and Advisor's Signature

Microbial Technology Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงเนื่องด้วยความช่วยเหลือและผลักดันของ รองศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ซึ่งกรุณาให้การช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษา คำแนะนำในระหว่างการศึกษาวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำ ให้ข้อคิดเห็น ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนช่วยแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ข้อเสนอในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช ทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำในทุกด้าน ขอขอบคุณนางสาวรุ่งนภา อ่อนชู เจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ เอื้ออำนวยความสะดวก และแนะนำการใช้เครื่องมือ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีการบรรจุและวัสดุ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และตลอดจนเจ้าหน้าที่ของบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในหลายด้าน

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา คำแนะนำในด้านการวิจัย ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ดีแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นที่ปรึกษาที่ดี เป็นแรงผลักดัน เป็นกำลังใจที่สำคัญเสมอมา และยังคงคอยช่วยเหลือสนับสนุนในทุกๆด้านแก่ผู้วิจัยอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งสำเร็จการศึกษา จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	ญ
สารบัญตาราง.....	ต
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ประวัติความเป็นมา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	4
1.3 ขั้นตอนการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	5
2.1 พอลิแซ็กคาไรด์.....	5
2.1.1 ประเภทของพอลิแซ็กคาไรด์ จำแนกตามองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์	5
2.1.2 จำแนกตามหน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์	8
2.2 พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์	11
2.3 <i>Aureobasidium pullulans</i>	20
2.3.1 ผลผลิตชีวภาพจาก <i>A. pullulans</i>	20
2.3.2 พอลิแซ็กคาไรด์จาก <i>A. pullulans</i>	22
2.3.3 การตรวจวิเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์พุลูลแลน.....	24
2.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์.....	27
2.5 บรรจุภัณฑ์.....	30

2.5.1	แผ่นฟิล์มรับประทานได้	30
2.5.2	การขึ้นรูปฟิล์มรับประทานได้.....	32
2.6	บรรจุภัณฑ์แบบเอกทิฟ	36
2.6.1	บรรจุภัณฑ์ฟิล์มยับยั้งจุลินทรีย์	36
2.6.2	สารยับยั้งจุลินทรีย์.....	37
2.7	ซินนามาลดีไฮด์.....	42
2.7.1	ข้อจำกัดในการใช้ซินนามาลดีไฮด์.....	45
บทที่ 3	วิธีการทดลอง	46
3.1	อุปกรณ์.....	46
3.2	เคมีภัณฑ์.....	47
3.3	วิธีการทดลอง.....	49
3.3.1	ผลิตและสกัดพอลิแซ็กคาไรด์.....	49
3.3.2	ศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์	49
3.3.3	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของซินนามาลดีไฮด์	52
3.3.3.1.1	การเตรียมแบคทีเรียแขวนลอย	52
3.3.3.1.2	การเตรียมสปอร์ราแขวนลอย	52
3.3.4	ศึกษาผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมกับซินนามาลดีไฮด์	54
3.3.4.2.1	ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย.....	54
3.3.4.2.2	ความสามารถในการยับยั้งรา	54
3.3.5	ศึกษาสมบัติทางกายภาพของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ประยุกต์	55
3.3.5.2.1	ลักษณะภายนอก	55
3.3.5.2.2	วัดค่าความหนา	56

3.3.5.2.3 วัดค่าสีด้วยเครื่องโครมามิเตอร์วัดสี	56
3.3.5.2.4 ค่าการซึมผ่านไอน้ำ.....	57
3.3.6 ติดตามปริมาณสารและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์ม ประยุกต์.....	58
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	62
4.1 การผลิตและการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์.....	62
4.2 ศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์.....	63
4.3 ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของซินนามาลดีไฮด์.....	66
4.4 ผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมกับซินนามาลดีไฮด์	67
4.5 การขึ้นแผ่นฟิล์มศึกษาสมบัติทางกายภาพของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ประยุกต์.....	72
4.6 ปริมาณซินนามาลดีไฮด์ที่เหลือในแผ่นฟิล์ม	80
4.7 การติดตามประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแผ่นฟิล์มประยุกต์.....	82
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	89
รายการอ้างอิง	99
ภาคผนวก.....	123
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	124
ภาคผนวก ข สารเคมี	125
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	127
ภาคผนวก ง โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน.....	129
ภาคผนวก จ ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	132
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	136

สารบัญภาพ

รูปที่ 2.1	โครงสร้างไซแลน.....	6
รูปที่ 2.2	โครงสร้างอินูลิน.....	6
รูปที่ 2.3	โครงสร้างไฮยาลูโรแนน	7
รูปที่ 2.4	โครงสร้างฮีพาริน (ซ้าย) โครงสร้างฮีพารานซัลเฟต (ขวา).....	8
รูปที่ 2.5	โครงสร้างคอนดรอยทินซัลเฟต	8
รูปที่ 2.6	โครงสร้างเซลลูโลส	9
รูปที่ 2.7	โครงสร้างไคติน.....	9
รูปที่ 2.8	โครงสร้างอะไมโลส (บน) และ อะไมโลเพกติน (ล่าง).....	10
รูปที่ 2.9	โครงสร้างไกลโคเจน.....	11
รูปที่ 2.10	โครงสร้างแซนแทน.....	16
รูปที่ 2.11	โครงสร้างเจลาแลน	17
รูปที่ 2.12	โครงสร้างสตีเวน	17
รูปที่ 2.13	โครงสร้างพุลลูแลน.....	18
รูปที่ 2.14	กระบวนการสังเคราะห์พุลลูแลน	19
รูปที่ 2.15	ปฏิกิริยาของเอนไซม์พุลลูลานเนสต่อพุลลูแลนและผลิตภัณฑ์	27
รูปที่ 2.16	การจัดจำแนกประเภทของฟิล์มบริโภาคได้.....	31
รูปที่ 2.17	แสดงระบบการทำงานของวิธีหล่อละลายของแผ่นฟิล์ม	35
รูปที่ 2.18	แสดงระบบการทำงานของวิธีอัดผ่านเกลียวของแผ่นฟิล์ม	35
รูปที่ 2.19	โครงสร้างซินนามาลดีไฮด์.....	42
รูปที่ 3.1	การแปรผลตามตัวแปร 3 แกนตามหลัก CIELAB color	56
รูปที่ 4.1	การตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอล (ก) ตะกอนเซลล์ <i>A. pullulans</i> YTP6-14 (ข) ส่วนใสที่แยกเซลล์ออกแล้ว (ค) ส่วนใสหลังจากเติมเอทานอลเย็นและพอลิแซ็กคาไรด์สีขาว (ง) ตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์สีขาวหลังจากกระเหิดแห้ง.....	62

รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมของผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์
โครมาโทแกรมของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ทดสอบจาก *A. pullulans* YTP6-14 63

รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โคร
มาโทแกรมของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ทดสอบจาก *A. pullulans* YTP6-14 หลังจากทำ
ปฏิกิริยากับเอนไซม์พุลูลาเนสพบ RT ที่ 4.783 นาที 65

รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ และพุลูลาเนสมาตรฐาน
หลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์พุลูลาเนส ผสมกับสารละลายน้ำตาลกลูโคสและมอลโทโทรโอ
สมาตรฐาน พบ RT ของกลูโคสที่ 3.966 นาที และสารละลายผสมที่ 4.766 นาที..... 66

รูปที่ 4.5 สารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ 7% โดยน้ำหนักและกลีเซอรอลที่เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
(ก) สารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่และซินนามาลดีไฮด์ที่จับก่อนเป็นหยดน้ำมัน (ข)
สารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์หลังจากปั่นผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน (ค)..... 68

รูปที่ 4.6 ผลโซนใสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมูลเลอร์ฮินตัน ทดสอบยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลาย
ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมกับซินนามาลดีไฮด์ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) ถึง 48 mg/ml ของ *B.*
subtilis พบว่าที่ความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์สูงๆ มีหยดสีเหลืองเกาะค้างที่ก้นหลุม 68

รูปที่ 4.7 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสายพันธุ์ต่างๆของสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่มี
ความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์ตั้งแต่ 0-48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี agar well diffusion โดย
แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (0 mg/ml คือชุด
ควบคุม)..... 70

รูปที่ 4.8 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสายพันธุ์ต่างๆของซินนามาลดีไฮด์มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-
30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี agar well diffusion โดยแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่าน
ศูนย์กลางโซนใส และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ชุดควบคุม คือ DMSO)..... 71

รูปที่ 4.9 ลักษณะของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อ *A. pullulans* YTP6-14 (ก) แผ่นฟิล์ม
ควบคุม (ไม่เติมซินนามาลดีไฮด์) (ข) แผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 mg/ml
(ค) แผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 mg/ml..... 72

รูปที่ 4.10 ผลค่าความหนาเฉลี่ยของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซิน
นามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน..... 75

รูปที่ 4.11 ผลค่าเฉลี่ยความสว่าง (Lightness; L*) ของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และ
แผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 77

รูปที่ 4.12 ผลค่าเฉลี่ยความแดง (Redness; a*) ของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 77

รูปที่ 4.13 ผลเฉลี่ยค่าความเหลือง (Yellowness; b*) ของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน... 78

รูปที่ 4.14 ผลค่าเฉลี่ยความแตกต่างของสีฟิล์มตัวอย่างกับแผ่นมาตรฐาน (ΔE^*) ของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 78

รูปที่ 4.15 ผลค่าเฉลี่ยค่าการซึมผ่านไอน้ำ (WVP) ของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 79

รูปที่ 4.16 ค่าเฉลี่ยของร้อยละซินนามาลดีไฮด์ที่เหลือของแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์..... 81

รูปที่ 4.17 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแผ่นฟิล์มควบคุม ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตรต่อการเจริญของแบคทีเรียและราทดสอบโดยวิธี disc diffusion โดยแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน..... 83

รูปที่ 4.18 จำนวน *S. aureus* ATCC 6538P ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมูลเลอร์ฮินตัน หลังจากเติมแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แผ่นฟิล์มควบคุม และชุดควบคุมบวกที่ไม่เติมแผ่นฟิล์ม ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 84

รูปที่ 4.19 จำนวน *B. subtilis* ATCC 16643 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมูลเลอร์ฮินตัน หลังจากเติมแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แผ่นฟิล์มควบคุม และชุดควบคุมบวกที่ไม่เติมแผ่นฟิล์ม ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 85

รูปที่ 4.20 จำนวน *E. coli* ATCC 8739 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมูลเลอร์ฮินตัน หลังจากเติมแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แผ่นฟิล์มควบคุม และชุดควบคุมบวกที่ไม่เติมแผ่นฟิล์ม ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 86

รูปที่ 4.21 จำนวน *S. typhimurium* MSCU 0492 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมูลเลอร์ฮินตัน หลังจากเติมแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แผ่นฟิล์มควบคุม และชุดควบคุมบวกที่ไม่เติมแผ่นฟิล์ม ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 88

รูปที่ 5.1 แสดงรูปแบบการออกฤทธิ์ของซินนามาลดีไฮด์ต่อการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (Shreaz และคณะ, 2016)..... 91

รูปที่ 5.2 กลไกสันนิษฐานของการเปลี่ยนโครงสร้างซินนามาลดีไฮด์ไปเป็นเบนซาลดีไฮด์และไกลออกซอล (Balaguer และคณะ, 2013)..... 95

รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-1 กรัม แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร..... 127

รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของซินนามาลดีไฮด์ในช่วงความเข้มข้น 5-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี..... 128

รูปที่ ง.1 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (เฟสเคลื่อนที่อะซีโทไนไตรล์ 80% โดยปริมาตร) 129

รูปที่ ง.2 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (เฟสเคลื่อนที่อะซีโทไนไตรล์ 60% โดยปริมาตร) 130

รูปที่ ง.3 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (เฟสเคลื่อนที่อะซีโทไนไตรล์ 60% โดยปริมาตร) 130

รูปที่ ง.4 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลมอลโทโทรโอสมมาตรฐาน (เฟสเคลื่อนที่อะซีโทไนไตรล์ 60% โดยปริมาตร)..... 131

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนและภาวะการผลิตที่เหมาะสม.....	13
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ สภาพขั้ว มวลโมเลกุล ราคาในท้องตลาด และการนำไปประยุกต์ใช้.....	28
ตารางที่ 2.3 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร กลุ่มอาการเมื่อเกิดการติดเชื้อ ชนิดของอาหารและผลิตภัณฑ์ที่พบการปนเปื้อน.....	41
ตารางที่ 3.1 การเตรียมการทดลองสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์กับเอนไซม์พุลลูลานเนสเพื่อเปรียบเทียบกับพุลลูแลนมาตรฐาน.....	51
ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ที่คำนวณจากค่าความขุ่นเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ (EPS) ที่ผลิตได้เทียบกับพุลลูแลนมาตรฐานหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนส.....	64
ตารางที่ 4.2 ผลค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดของซินนามาลดีไฮด์ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ (MIC).....	67
ตารางที่ 4.3 ลักษณะภายนอกของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ชุดควบคุม และที่ซินนามาลดีไฮด์บริเวณพื้นผิวและบริเวณตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด.....	74
ตารางที่ 4.4 ปริมาณของซินนามาลดีไฮด์ที่ก่อนอบและเหลืออยู่หลังจากอบแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในระยะเวลาต่างๆ.....	80
ตารางที่ จ.1 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสายพันธุ์ต่างๆของสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์ตั้งแต่ 0-48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี agar well diffusion โดยแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....	132
ตารางที่ จ.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสายพันธุ์ต่างๆของซินนามาลดีไฮด์มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี agar well diffusion โดยแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....	133
ตารางที่ จ.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแผ่นฟิล์มควบคุม ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตรต่อการ	

เจริญของแบคทีเรียและราทดสอบโดยวิธี disc diffusion โดยแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 134

ตารางที่ ง.4 การยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแผ่นฟิล์มควบคุม ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ตารางเซนติเมตรต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในหน่วย log CFU/ml และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน 135



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีอุตสาหกรรมทางการเกษตรและอาหารเป็นตัวกระตุ้นและขับเคลื่อนทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ โดยมีความสัมพันธ์กับหลายภาคส่วน เช่น อุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ การส่งสินค้าออก การจ้างแรงงาน การรับซื้อวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งปัญหาการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษาหรือการขนส่งเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โดยการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเน่าเสียของสินค้าอาหาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่ไม่พึงประสงค์ และอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีการคิดค้นพัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ทั้งยังสามารถยับยั้งและป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ฟิล์มชีวภาพ เป็นบรรจุภัณฑ์ประเภทหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ฟิล์มชนิดนี้ถูกคิดค้นขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคที่ใส่ใจทางด้านสุขภาพ หรือกำลังมองหาทางเลือกของผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติ และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมมากยิ่งขึ้น เนื่องจากกระบวนการผลิตที่เป็นเทคโนโลยีสีเขียว สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการชีวภาพ ทั้งยังสามารถช่วยคงคุณภาพ ความเสถียร และความปลอดภัยของอาหารไว้ได้อีกด้วย (Valencia-Chamorro และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังสามารถทำหน้าที่เป็นตัวพา (carrier) สำหรับสารเติมแต่งอาหารได้ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ วัตถุปรุงแต่งกลิ่นรส สารให้สี และสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น (Zoebel และ Stephen, 2006) โดยฟิล์มชีวภาพได้สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มสารไฮโดรคอลลอยด์ ที่ประกอบด้วยโปรตีน และพอลิแซ็กคาไรด์ กลุ่มลิพิด (lipid) ประกอบด้วย ไขมัน เอซิลกลีเซอรอล และกรดไขมัน กลุ่มสุดท้ายคือ สารประกอบ ที่มีองค์ประกอบทั้งสารไฮโดรคอลลอยด์ และลิพิด นอกจากนี้ยังอาจเติมอิมัลซิไฟเออร์ และพลาทิสเซอร์ (plasticizer) เพื่อปรับปรุงสมบัติทางกายภาพและความเสถียรของฟิล์ม (Han และ Aristippos, 2005)

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) ของคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาเชื่อมต่อกันตั้งแต่ 10 โมเลกุลไปจนถึงหลายร้อยโมเลกุล สามารถจัดจำแนกได้ 2 ประเภท ตามชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ หากประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก คือ ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ และหากมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาเชื่อมต่อกันมากกว่าหนึ่งชนิดเรียกว่า เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ พอลิแซ็กคาไรด์มีโครงสร้างพื้นฐาน ที่พบได้บ่อยคือ กลูแคน แมนแนน กาแล็กแทน ไคแลน และอื่นๆ แต่โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นกิ่งเป็นตัวทำให้พอลิแซ็กคาไรด์มีความหลากหลายสูง ซึ่งสามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตหลายจำพวก

เช่น พีช เห็ดรา สาหร่าย แบคทีเรีย และอื่นๆ (Shi, 2016) ในระดับเซลล์พอลิแซ็กคาไรด์สามารถพบได้ทั้งในไซโทพลาสซึมในรูปของแป้ง เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างต่างๆของเซลล์ เช่น ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์อาจมีการส่งออกนอกเซลล์ เรียกว่า เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS) อาจพบอยู่ในลักษณะเมือกล้อมรอบเซลล์หรืออยู่ในรูปของแคปซูลติดอยู่กับเซลล์

ราที่สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ *Aureobasidium pullulans* เป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) หรือมีอีกหนึ่งชื่อเรียกที่รู้จักกันดีคือ ยีสต์ดำ เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดสีเข้มคล้ายเมลานินได้ ราชนิดนี้มีรูปแบบการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันออกไป 3 แบบคือ เส้นใยที่มีผนังกันคลาไมโดสปอร์ และเซลล์รูปไข่คล้ายยีสต์ นอกจากนี้ยังมีสีที่แตกต่างกันตามช่วงอายุคือ แรกเริ่มจะมีสีเหลืองครีม จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน หรือน้ำตาลอ่อน สุดท้ายจะกลายเป็นสีดำเมื่อมีอายุมากขึ้น *A. pullulans* มีบทบาทสำคัญทางอุตสาหกรรมคือ สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์คือ พูลูลแลน (pullulan) การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์นี้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ อาหาร แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน สายพันธุ์ของ *A. pullulans* ความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และอื่นๆ (Singh และคณะ, 2008) โครงสร้างของพูลูลแลนประกอบด้วย มอลโทโทไรโอส (maltotriose) คือมีน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,4-ไกลโคไซด์ และระหว่างมอลโทโทไรโอสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6-ไกลโคไซด์ (α -(1,6)-linked-(1,4)- α -D-triglucosides) (Gniewosz และคณะ, 2014)

จากโครงการวิจัยของ Thaniyavarn และคณะ (2013) เกี่ยวกับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์และราคล้ายยีสต์ในบริเวณเกาะสี่ซัง อำเภอสรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยมีจุดการศึกษาเก็บตัวอย่าง 5 จุด ได้แก่ ท่าเรือภาณุรังสี (ท่าบน) ท่าเรือเทววงษ์ (ท่าล่าง) หาดถ้ำพัง หาดท่าวัง และหาดท่ายายทิม ได้จัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยใช้ลักษณะสัณฐาน และวิธีการทางอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular technique) โดยสามารถคัดแยกยีสต์และราคล้ายยีสต์ได้ 246 ไอโซเลต หลังจากศึกษาในระดับโมเลกุลแล้วจึงได้ *A. pullulans* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *A. pullulans* YTP11-61, *A. pullulans* YTP11-62 และ *A. pullulans* YTP6-14 ซึ่งทุกสายพันธุ์มีร้อยละความเหมือนของอัตลักษณ์ (% identity) เท่ากับ 100 เมื่อเทียบกับ *A. pullulans* เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารยีสต์มอลต์ (yeast malt) พบว่ามีเซลล์รูปไข่ โคลินีสิมฟู ผลิตเม็ดสีน้ำตาล และทั้ง 3 สายพันธุ์พบที่จุดเดียวกัน คือที่หาดถ้ำพัง เนื่องจากเป็นบริเวณที่ไม่ค่อยมีประชากรอาศัยอยู่ ทำให้มีความสมบูรณ์ของระบบนิเวศจึงมีโอกาสพบยีสต์และราคล้ายยีสต์มากกว่าจุดอื่นๆที่ทำการเก็บตัวอย่าง ซึ่งจากการรายงานของสุภารัตน์ ลือพงษ์พัฒนา (2557) พบว่า *A. pullulans* YTP6-14 สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพได้ดีและโดดเด่นกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น จึงได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพของเชื้อชนิดนี้ พบว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ร้อยละที่เหมาะสมของกลูโคสคือ ร้อยละ 5 เพปโตน (peptone) เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่า

ความเป็นกรดเบสที่ 6.5 อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส เป็นปริมาณและภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของเชื้อและการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้อีกด้วย จึงได้ติดตามการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์และการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพควบคู่กันโดยใช้ภาวะการเลี้ยงเชื้อเดียวกันกับการที่กล่าวไว้ข้างต้น เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน พบว่า พบว่า *A. pullulans* YTP6-14 สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยง และจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ไปจนถึงวันที่ 5 โดยให้ผลผลิตสูงสุดที่ 5.036 กรัมต่อลิตร และเริ่มลดปริมาณลงในวันที่ 7 ซึ่งมีแนวโน้มการผลิตเช่นเดียวกันกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ แต่สารลดแรงตึงผิวจะผลิตสูงสุดในวันที่ 7

สำหรับภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง พบว่า *A. pullulans* YTP6-14 และการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ ศุภิศา เอกเผ่าพันธุ์ (2558) ได้ระบุว่า ใช้อาหารยีสต์มอลต์ ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ และปริมาณคือร้อยละ 5 ใช้เพปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ปริมาณเท่ากับกับซูโครส ปรับค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จะให้ปริมาณเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงสุดเท่ากับ 12.33 ± 0.32 กรัมต่อลิตร และยังพบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ YTP6-14 นี้ ไม่ผลิตเม็ดสีในระหว่างการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ จึงสามารถลดขั้นตอนในการกำจัดเม็ดสีในขั้นตอนที่ทำให้พอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ เหลือเพียงจากตกตะกอนด้วยเอทานอลปริมาตร 2 เท่าของส่วนใสเท่านั้น จึงสามารถลดค่าใช้จ่ายและเวลาสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ลงได้ สมบัติที่ดีของพอลิแซ็กคาไรด์สำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมคือ ไม่มีสี ไม่มีรสชาติ ไม่มีกลิ่น มีความยืดหยุ่น ทนความร้อน สามารถก่อฟิล์มได้ ละลายน้ำ เป็นต้น จึงสนใจจะนำมาประยุกต์เป็นฟิล์มชีวภาพในทางอาหาร เพื่อจุดประสงค์ในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานยิ่งขึ้น

เนื่องจากเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ไม่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Ravella และคณะ, 2010, Gniewosz และคณะ, 2014) ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงประสิทธิภาพของฟิล์มโดยเลือกสารที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มาจากธรรมชาติ ซินนามาลดีไฮด์ (C_9H_8O) เป็นสารประกอบอะโรมาติกแอลดีไฮด์ เป็นสารออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หลักในน้ำมันอบเชย มีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองใส มีกลิ่นอบเชย มีจุดเดือดสูงถึง 246 องศาเซลเซียส มีการนำมาเป็นสารเติมแต่งสีและกลิ่นในอาหารหลากหลายชนิด ทั้งยังได้รับการยอมรับด้านความปลอดภัยและสามารถบริโภคได้ (Al-Bayati และ Mohammed, 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานหลายฉบับเกี่ยวกับคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพของซินนามาลดีไฮด์ เช่น รายงานของ (Shen และคณะ, 2015) ที่ได้ศึกษาผลของซินนามาลดีไฮด์ต่อการยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าสารชนิดนี้มีกลไกการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายรูปแบบ เช่น ส่งผลให้เซลล์มีรูปร่างผิดปกติ มีผลต่อผนังเซลล์ที่มีลักษณะขรุขระขึ้น เกิดความผิดปกติที่ไซโทซอล คือพบว่าแยกตัวออกมา

จากเยื่อหุ้มเซลล์ หรือเกิดการรื้อ และแตกของเซลล์ Balaguer และคณะ (2013) ได้รายงานผลของ ซินนามาลดีไฮด์ต่อการเจริญเติบโตของรา ในการประยุกต์ใช้กับบรรจุภัณฑ์เอกทิฟ (active food packaging) ของขนมปังและชีส พบว่าสารชนิดนี้มีประสิทธิภาพการยับยั้งและชะลอการเจริญของรา *Penicillium expansum* และ *Aspergillus niger* ที่เป็นปัญหาสำคัญของการเน่าเสียอาหารและช่วย ยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารเหล่านี้ได้นานยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อนำสารมาผสมกับฟิล์ม จากไคโตซาน ในการเคลือบเมล็ดน หลังจากเคลือบพบว่า สามารถรักษาคุณภาพตัวอย่างเมล็ดน ใน ด้านสี ความแน่นเนื้อ ปริมาณวิตามินซี แคโรทีนอยด์ ไว้ได้นานยิ่งขึ้น และสารชนิดนี้ยังทำหน้าที่เป็น ตัวดักจับอนุมูลอิสระ ตัวยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) และช่วยลดอัตราการหายใจของผลไม้ลง ด้วย ทำให้ช่วยยืดอายุการเป็นรักษาผลไม้ได้ยาวนานยิ่งขึ้น (Carvalho และคณะ, 2016)

ในงานวิจัยฉบับนี้มุ่งเน้นที่จะผลิตแผ่นฟิล์มเอกทิฟจากเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* YTP6-14 ผสมซินนามาลดีไฮด์เป็นสารเติมแต่งซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและติดตามประสิทธิภาพของแผ่นฟิล์ม ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาสมบัติของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ฟิล์มที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ผสม กับซินนามาลดีไฮด์ และการนำไปประยุกต์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร

1.3 ขั้นตอนการวิจัย

- 1.3.1 ผลิตและสกัดพอลิแซ็กคาไรด์
- 1.3.2 ศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์
- 1.3.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของซินนามาลดีไฮด์
- 1.3.4 ศึกษาผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลายฟิล์ม
- 1.3.5 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ประยุกต์
- 1.3.6 ติดตามปริมาณสารและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์มประยุกต์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 และนำมาเป็นวัตถุดิบใน การทำแผ่นฟิล์มชีวภาพ และเป็นแผ่นฟิล์มเอกทิฟ รวมทั้งทราบอิทธิพลของซินนามาลดีไฮด์ต่อ แผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์หลังจากนำมาผสมรวมกันในแง่ต่างๆ เช่น สี ความหนา และประสิทธิภาพ การยับยั้งจุลินทรีย์ เป็นต้น

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

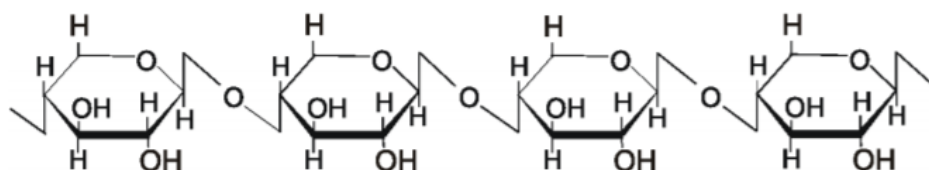
2.1 พอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตขนาดใหญ่ ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก จัดเป็นสารประกอบที่มีความหลากหลายชีวภาพสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดอื่น เช่น โพรตีน และ กรดนิวคลีอิก เป็นต้น (Shi, 2016) เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์มีโครงสร้างที่ผันแปรได้ สามารถพบได้ทั้งโครงสร้างที่เป็นเส้นตรง และเป็นกิ่ง มีความหลากหลายทางองค์ประกอบทางเคมีและมวลโมเลกุลที่แตกต่างกัน ซึ่งโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นตัวกำหนดสมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมีของพอลิแซ็กคาไรด์ (Prabaharan และ Jayakumar, 2009) ในขณะที่นิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนไม่สามารถสร้างรูปแบบโครงสร้างที่หลากหลายได้ โครงสร้างหลักของพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยกลูแคน ฟรุคแทน ไสแลน แมนแนน กาแล็กแทน และอื่นๆ (Wasser, 2002) ในระดับเซลล์ พอลิแซ็กคาไรด์มีหน้าที่สำคัญคือ เป็นสารสะสม (เม็ดแป้ง) อยู่ในไซโทพลาสซึม หรือทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของเซลล์ ได้แก่ เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ หรือผนังเซลล์ในสิ่งมีชีวิต (เซลล์ลูโลส) (Thombare และคณะ, 2016) พอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) ที่เพิ่งได้รับความสนใจศึกษา ซึ่งจัดว่าช้าเมื่อเปรียบเทียบกับโพรตีน หรือไขมันเป็นอย่างมาก แต่เมื่อได้ศึกษาทำความเข้าใจเกี่ยวกับพอลิแซ็กคาไรด์แล้วกลับพบว่า เป็นสารที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นทางด้านกิจกรรมทางชีวภาพ (biological activity) ของสิ่งมีชีวิต และมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Wang และคณะ, 2016) นอกจากนี้ยังสามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์มาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น ด้านสุขภาพ ยา ด้านอาหาร และอื่นๆ เป็นต้น แหล่งที่มาของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตได้แก่ แบคทีเรีย รา สาหร่าย พืช และสัตว์ ซึ่งอาจมีหน้าที่เหมือนหรือแตกต่างกันไป (Shi, 2016)

2.1.1 ประเภทของพอลิแซ็กคาไรด์ จำแนกตามองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท

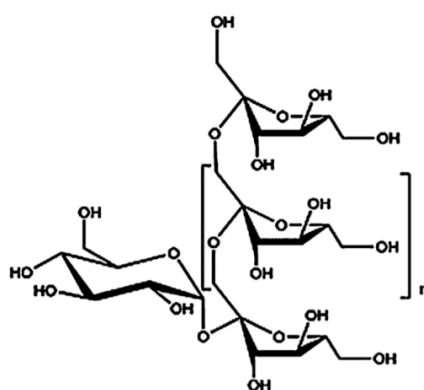
2.1.1.1 ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharide) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกเพียงชนิดเดียว (Monsan และคณะ, 2001) ตัวอย่างพอลิเมอร์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ

เพนโทซาน (pentosan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างประกอบไปด้วยน้ำตาลที่มีปริมาณคาร์บอน 5 อะตอม ($C_5H_8O_4$) ที่เรียกว่า น้ำตาลเพนโทส (pentose) เช่น ไซโลส (xylose) และ อะราบิโนส (arabinose) เป็นหน่วยย่อยชนิดเดียว (Zhang และ Runge, 2011) ตัวอย่างเช่น ไซแลน (xylan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) มีโครงสร้างเป็นไซโลสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -(1,4) ไกลโคซิดิก (Held, 2012) ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 โครงสร้างไซแลน (Held, 2012)

เฮกโซซาน (hexosan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างประกอบไปด้วยน้ำตาลที่มีปริมาณคาร์บอน 6 อะตอม ($C_6H_{10}O_5$) ที่เรียกว่า น้ำตาลเฮกโซส (hexose) ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส กาแลกโตส แมนโนส เป็นต้น (Zhang และ Runge, 2011) ตัวอย่างพอลิเมอร์ เช่น แป้ง เซลลูโลส ที่มีหน่วยย่อยคือน้ำตาลกลูโคส และ อินูลิน (inulin) ที่มีองค์ประกอบเป็นฟรุคโตสเป็นมอนอเมอร์ มีโครงสร้างคือ β -(2,1)-D-fructosyl-fructose ดังที่แสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งพันธะ β -(2,1) นี้ทำให้อินูลินไม่ถูกย่อยเหมือนคาร์โบไฮเดรตทั่วไป จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในทางอาหาร คือนำมาใช้สารให้ความหวานพลังงานต่ำ (Apolinario และคณะ, 2014, Shoaib และคณะ, 2016)

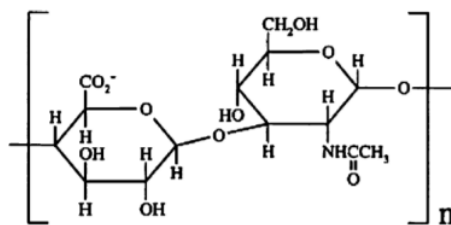


รูปที่ 2.2 โครงสร้างอินูลิน (Shoaib และคณะ, 2016)

หมายเหตุ : โดยทั่วไปอาจพบกลูโคสเป็นมอนอเมอร์ตัวสุดท้ายเพียงหนึ่งโมเลกุล (terminal glucose unit) ในโครงสร้างอินูลินด้วยพันธะ α -(1,2) (Apolinario และคณะ, 2014)

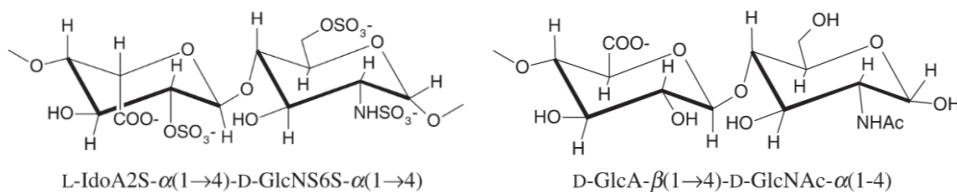
2.1.1.2 เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Heteropolysaccharide) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปเป็นองค์ประกอบ และเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ตัวอย่างพอลิเมอร์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ

ไฮยาลูโรแนน (Hyaluronic acid, sodium hyaluronate) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นเส้นตรงจัดอยู่ในกลุ่มของ non sulfated glycosaminoglycan ประกอบด้วย β -1,4-D-glucosamine และ β -1,3-N-acetyl-D-glucosamine เป็นหน่วยย่อย (Kogan และคณะ, 2007) ดังรูปที่ 2.3 ไฮยาลูโรแนน เป็นสารประกอบที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์มีกระดูกสันหลังในสายสะตือ ไขข้อ ลูกตา (eye's vitreous humor) ผิวหนัง และในหงอนไก่ (rooster comb) เป็นต้น (de Oliveira และคณะ, 2017)



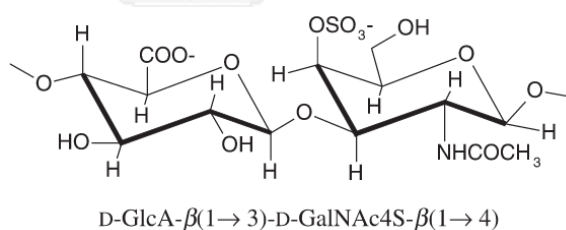
รูปที่ 2.3 โครงสร้างไฮยาลูโรแนน (Kogan และคณะ, 2007)

เฮพาริน (Heparin) หรือ เฮพารันซัลเฟต (Heparan sulphate) เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบไปด้วยหน่วยของ pyranosyluronic acid และ กลูโคซามีน (glucosamine) ดังรูปที่ 2.4 จัดอยู่ในกลุ่มของ sulfated glycosaminoglycan (Krichen และคณะ, 2017) เป็นกลุ่มพอลิเมอร์ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีสมบัติป้องกันการเกิดการแข็งตัวของเลือด (anticoagulation) โดยไปจับที่ thrombin) ยับยั้งไม่ให้เกิดการจับตัวเป็นก้อน โดยที่เฮพารันซัลเฟตจะสังเคราะห์ภายในเซลล์มาสต์ (Mast cell) ในตับ ปอด และผิวหนัง ในขณะที่เฮพารินจะสังเคราะห์ภายนอกที่บริเวณเยื่อฐาน (basement membrane) (Gandhi และ Mancera, 2008)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างฮีพาริน (ซ้าย) โครงสร้างฮีพาแรนซัลเฟต (ขวา) (Gandhi และ Mancera, 2008)

คอนดรอยทินซัลเฟต (Chondroitin sulfate) เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ sulfated glycosaminoglycan (Krichen และคณะ, 2017) พบในผิวหนัง เอ็น และกระดูกอ่อน ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับความยืดหยุ่น ความทนแรงดึง (tensile strength) นอกจากนี้ยังมีส่วนสำคัญในการรับส่งสัญญาณของสารเคมีภายในร่างกาย เช่น Growth factor และ Chemokine เป็นต้น (Liang และคณะ, 2010) โครงสร้างของคอนดรอยทินซัลเฟต ประกอบด้วย (β-1,4)-N-acetyl-galactosamine และ (β-1,3) glucuronic acid เป็นมอนอเมอร์ (da Silva และคณะ, 2017) ดังรูปที่ 2.5



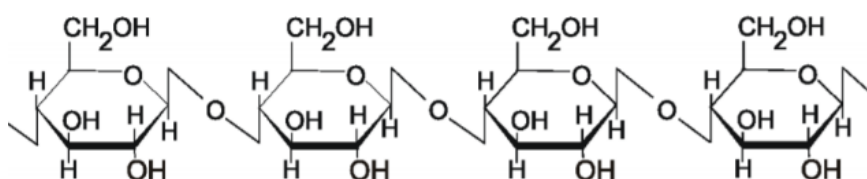
รูปที่ 2.5 โครงสร้างคอนดรอยทินซัลเฟต (Gandhi และ Mancera, 2008)

2.1.2 จำแนกตามหน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (Hu และคณะ, 2015)

2.1.2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ประเภทโครงสร้าง (structural polysaccharide) คือเป็นองค์ประกอบของโครงสร้างหลัก ทำหน้าที่สร้างความแข็งแรงให้แก่เซลล์สิ่งมีชีวิต (Shmoop Editorial Team, 2008) ตัวอย่าง

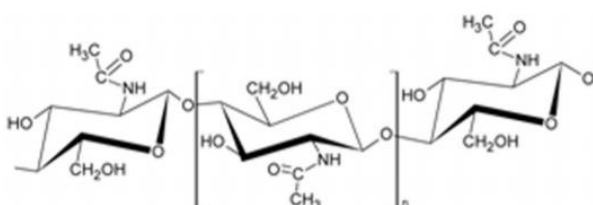
เซลลูโลส (cellulose) ประกอบด้วย β-D-glucopyranose เพียงชนิดเดียวที่เชื่อมต่อกันด้วย พันธะ 1,4 ไกลโคซิดิก ดังรูปที่ 2.6 มีลักษณะเป็นเส้นใย เหนียว ไม่ละลายน้ำ เป็นองค์ประกอบในส่วนต่างๆ ของพืช และยังพบในสิ่งมีชีวิตประเภทอื่น

(Siró และ Plackett, 2010) ได้แก่ แบคทีเรีย ในสกุล *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* และ *Sarcina* เป็นต้น ที่พบการคัดหลังเซลลูโลสออกมาภายนอกเซลล์ (El-Saied และคณะ, 2004) รวมไปถึงสาหร่ายบางชนิดอีกด้วย เป็นต้น ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างเพื่อความแข็งแรง เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่งที่พบมากที่สุด ในธรรมชาติ ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญให้กับกลุ่มสิ่งมีชีวิตบางจำพวกที่มีเอนไซม์เซลลูเลส (O'sullivan, 1997)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างเซลลูโลส (Held, 2012)

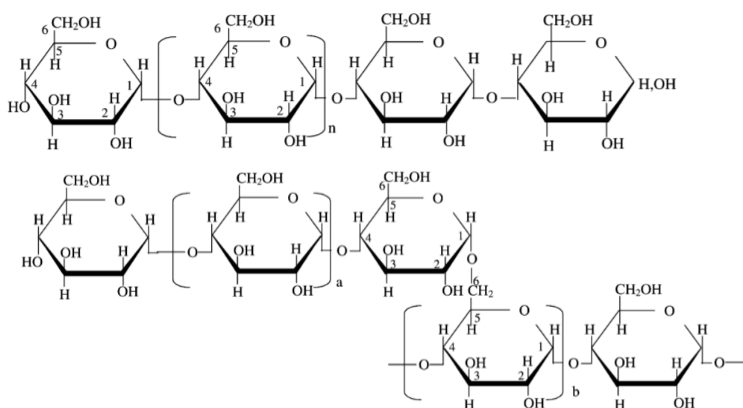
ไคติน (chitin) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์จากธรรมชาติ ที่ส่วนมากมีองค์ประกอบคือ (β -1,4)-2-deoxy-2-acetamido-D-glucopyranose หรือบางส่วนมีโครงสร้างเป็น (β -1,4)-2-deoxy-2-amino-D-glucopyranose (Ramaprasad และคณะ, 2017) ดังรูปที่ 2.7 เป็นพอลิเมอร์ที่มีความหลากหลายมากที่สุดเป็นอันดับสองในธรรมชาติรองจากเซลลูโลส พบในโครงสร้างเปลือกแข็งภายนอก (exoskeleton) ผิวชั้นนอก (cuticle) ของสัตว์บางจำพวก เช่น สัตว์จำพวกข้อปล้อง (arthropod) ในกระดอง และเปลือกของกุ้ง ปู และพบในผนังเซลล์ของพวกเห็ด สาหร่ายบางจำพวก (Rao และ Ramaprasad, 2007) สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างแพร่หลายเนื่องจากมีคุณสมบัติที่น่าสนใจหลายประการเช่น ย่อยสลายได้เองในธรรมชาติ ไม่เป็นพิษ มีความแข็งแรง มีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต (Louvier-Hernández และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างไคติน (Ramaprasad และคณะ, 2017)

2.1.2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ประเภทพลังงานสะสม (energy storage polysaccharide) สิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิดมีการกระบวนการสะสมพลังงานไว้ใช้ภายหลังไว้หลายรูปแบบ ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ก็เป็นหนึ่งในรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาเอาไว้ภายในเซลล์ เพื่อจุดประสงค์ต่างๆ เช่น สำรองพลังงานไว้ในภาวะขาดแคลนอาหาร หรือเพื่อการสืบพันธุ์ (reproduction) (Fischer และคณะ, 2011)

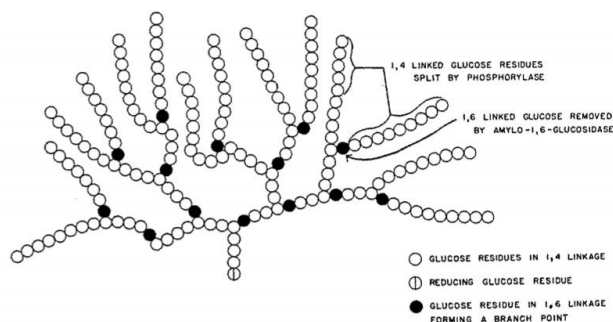
แป้ง (starch) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีความหลากหลายสูงสุดในธรรมชาติ เป็นพอลิเมอร์ที่ไม่มีประจุ (Pavlovic และ Brandão, 2003) ประกอบไปด้วยโมเลกุลที่แตกต่างกัน 2 ชนิด ได้แก่ อะไมโลส (amylose) เป็นพอลิเมอร์เส้นตรงมีกลูโคสเป็นมอนอเมอร์ เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4 ไกลโคซิดิก อีกชนิดคือ อะไมโลเพกติน (amylopectin) มีลักษณะเป็นกิ่งสาขา ประกอบด้วยกลูโคสเป็นมอนอเมอร์ ระหว่างโมเลกุลของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ พันธะ 1,4 ไกลโคซิดิก ในส่วนกิ่งจะเชื่อมด้วยพันธะ 1,6 ไกลโคซิดิก (Peres และ Correa, 1996) ดังแสดงในรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 โครงสร้างอะไมโลส (บน) และ อะไมโลเพกติน (ล่าง) (Tester และคณะ, 2004)

ไกลโคเจน (glycogen) มีโครงสร้างคล้ายกับอะไมโลเพกติน คือมีกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียวและมีพันธะแบบเดียวกัน แตกต่างตรงที่มีการแตกกิ่งมากกว่า โดยใน 1 กิ่งอาจจะประกอบไปด้วยกลูโคสจำนวน 8-12 โมเลกุล (Manners, 1991) ดังรูปที่ 2.9 เป็นสารประกอบขนาดใหญ่ที่น้ำหนักมาก (10^6 - 10^9) ทำหน้าที่กักเก็บคาร์โบไฮเดรตไว้ในเซลล์สัตว์ และเซลล์จุลินทรีย์ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนพบนุภาคทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-40 นาโนเมตร ทำปฏิกิริยากับไอโอดีนได้สีน้ำตาลแดง (Takata และคณะ, 2009)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างไกลโคเจน (Forbes, 1953)

2.2 พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์

ในทางอุตสาหกรรมได้มีการนำพอลิแซ็กคาไรด์มาใช้ประโยชน์ในหลายด้านไม่ว่าจะเป็นด้านอาหาร เช่น เป็นสารให้ความข้นหนืด (thickener) สารก่อเจล (gelling agent) หรือสารให้ความหวานทดแทน ด้านการแพทย์ เช่น สารยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (antitumor) 프리ไบโอติก (prebiotic) เป็นต้น (Liu และคณะ, 2010) ดังที่กล่าวไว้ข้างต้นว่าพอลิแซ็กคาไรด์สามารถพบได้จากหลายแหล่งที่มา ไม่ว่าจะเป็นสาหร่าย พืชชั้นสูง สัตว์ รวมไปถึงจุลินทรีย์ (Shi, 2016) แต่แหล่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์หลักในทางอุตสาหกรรมคือ พืชชั้นสูง ผลิตภัณฑ์หลักจากพืชได้แก่ แป้ง ในแต่ละปีจะมีการสกัดแป้งจากพืชแต่ละชนิด เช่น ธัญพืช ข้าวสาลี ข้าวโพด มันฝรั่ง ฯลฯ ปีละประมาณ 60 ล้านตัน (Donot และคณะ, 2012) ในส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่าย ส่วนมากได้จากสาหร่ายสีแดง (red algae, Rhodophyceae) และสาหร่ายสีน้ำตาล (brown algae, Phaeophyceae) ตัวอย่าง คาร์ราจีแนน (carrageenan) ได้จาก *Kappaphycus alvarezii* และ *Euchechemia denticulum* อัลจิเนท ได้จาก *Laminaria sp.*, *Sargassum sp.*, *Undaria sp.* และอื่นๆ วุ้น (agar) ได้จาก *Gelidium sp.* และ *Gracilaria sp.* พูแคน ได้จาก *Stichopus sp.* และ *Laminaria sp.* (Li และคณะ, 2010) จากการรายงานของ Nagahama (2006) พบว่ามีการนำพอลิแซ็กคาไรด์จากทะเลมาใช้ประโยชน์จากทั่วโลกประมาณ 25000-30000 ตันต่อปี

ในปัจจุบันทางอุตสาหกรรมเริ่มหันมาให้ความสนใจพอลิแซ็กคาไรด์ที่มาจากจุลินทรีย์ เนื่องจากมีข้อได้เปรียบหลายประการคือ ใช้เวลาในการผลิตที่สั้นกว่า และให้ผลผลิตที่สูงกว่าเมื่อเปรียบกับการปลูกพืชหรือเลี้ยงสาหร่าย ไม่มีเชื้อปนเปื้อนทางด้านสภาพอากาศและภูมิประเทศ สามารถใช้ทรัพยากรที่เหลือใช้มาก่อนประโยชน์ เช่น ของเสียจากอุตสาหกรรมและการเกษตรนำมาเป็นอาหาร

ของจุลินทรีย์ เช่น การนำเอาไฮโดรคาร์บอนหรือคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (López และคณะ, 2009) นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังไม่ต้องการเนื้อที่ในการเจริญเติบโตมาก ในส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมนำมาศึกษาและใช้ประโยชน์ สามารถแบ่งกลุ่มตามบริเวณที่พบพอลิแซ็กคาไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม (Donot และคณะ, 2012) คือ

1. พอลิแซ็กคาไรด์ภายในเซลล์ (cytosolic polysaccharide) ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอนให้แก่เซลล์
2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผนังเซลล์ เช่น ลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) เพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan)
3. เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide; EPS) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีการคัดหลั่งออกมาจากเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำหน้าที่สร้างเป็นแคปซูล หรือผลิตไบโอฟิล์ม (biofilm)

เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ พอลิเมอร์ชนิดนี้มีองค์ประกอบหลักคือ คาร์โบไฮเดรต หน่วยย่อยที่พบบ่อยได้แก่ น้ำตาลโมลกุลเดี่ยวจะพวกกลูโคส กาแล็กโทส หรือ แมนโนส อาจพบพวกน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) กรดยูโรนิก (uronic acid) ส่วนมากคือพวก กรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) และ กรดกาแล็กทูโรนิก (galacturonic acid) รวมไปถึงน้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน (amino sugar) เช่น พวก N-acetyl amino acid (Ullrich, 2009) จึงทำให้เกิดความหลากหลายของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดยสามารถแบ่งเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มที่ประจุเป็นกลาง (neutral) เช่น พุลลูแลน (pullulan) เดกซ์แทน (dextran) เป็นต้น และ เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ส่วนมากจะมีประจุลบ (polyanion) เช่น แซนแทน (xanthans) เจลแลน (gellans) เป็นต้น ขั้นตอนการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนหลัก (Vandamme และคณะ, 2002) คือ

1. รวบรวมปริมาณคาร์บอนให้มากพอ
2. สังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์จากภายในเซลล์
3. ส่งพอลิแซ็กคาไรด์ออกมาภายนอก

เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์มีความสำคัญในหลายด้านต่อเซลล์ เช่น ป้องกันเซลล์จากสิ่งมีชีวิต (biotic stress) ยกตัวอย่างเช่น การแข่งขันกันระหว่างจุลินทรีย์ (growth competition) เป็นต้น ป้องกันเซลล์จากปัจจัยที่ไม่มีชีวิต (abiotic stress) เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้น ความเป็นกรดเบส ความแห้งแล้ง ทั้งนี้ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของแบคทีเรียที่อยู่ในภาวะแวดล้อมสุดขีดอีกด้วย (Donot และคณะ, 2012) จากการรายงานของ Cerning และคณะ (1994) ระบุว่า เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกักเก็บ หรือสำรองพลังงานสำหรับเซลล์ โดยพบว่าจุลินทรีย์ไม่สามารถย่อยเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตออกมาได้ ดังนั้นหน้าที่หลักที่สำคัญของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์คือ

การป้องกันเซลล์จากภาวะแวดล้อมภายนอก การที่เซลล์ถูกล้อมไปด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีปริมาณน้ำสูง ส่งผลให้เซลล์สามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ดี และรอดพ้นจากการถูกกินโดยโปรโตซัว นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ล้อมรอบเซลล์จะช่วยให้เซลล์ดักจับสารอาหารและแร่ธาตุได้ดียิ่งขึ้น (Beech และ Tapper, 1999, Ozturk และคณะ, 2009) โดยลักษณะที่กายภาพของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จะขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ รวมไปถึงสภาพแวดล้อมของเซลล์ที่อยู่ในระหว่างการผลิต ตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนและภาวะการผลิตที่เหมาะสม

ประเภทจุลินทรีย์	สายพันธุ์จุลินทรีย์	ชนิดเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์	แหล่งคาร์บอน	ภาวะที่เหมาะสมในการผลิต
ยีสต์และรา (Yeast and mould)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	พุลลูแลน	ซูโครส	pH = 4–4.5; 30 °C; 100 ชั่วโมง
	<i>Slerotium sp.</i>	สเคลอโรกลูแคน	ซูโครส, กลูโคส	pH = 4.5; 28 °C; 48–120 ชั่วโมง
	<i>Schizophyllum commune</i>	ซีโซฟิลแลน	กลูโคส, ซูโครส	28 °C; 168 ชั่วโมง
	<i>Sporobolomyces sp.</i>	กาแล็คแทน	ซูโครส	pH = 5.3; 22 °C; 168 ชั่วโมง
	<i>Rhodoturula sp.</i>	กลูแคน	กลูโคส, ซูโครส	pH = 5.5; 22–26 °C; 3–4 วัน
	<i>Cryptococcus sp.</i>	กลูแคน	ซูโครส	pH = 5,3; 24 °C; 6 วัน
	<i>Tremella mesenterica</i>	กลูแคน	กลูโคส	25 °C; 1 bar; 7 วัน
	<i>Ganoderma lucidum</i>	กลูแคน	กลูโคส	pH = 3.5; 30 °C; 21 วัน
สาหร่ายขนาดเล็ก (Microalgae)	<i>Porphyridium cruentum</i>	กลูแคน	คาร์บอนไดออกไซด์	pH = 7.5; 20 °C
	<i>Botryococcus braunii</i>	กลูแคน	คาร์บอนไดออกไซด์	pH = 7; 25 °C; 14 วัน

ไดอะตอม (Diatoms)	<i>Amphora holsatica</i>	กลูแคน	คาร์บอนไดออกไซด์	19 วัน
	<i>Navicula directa</i>	กลูแคน	คาร์บอนไดออกไซด์	9 วัน
	<i>Melosira nummuloïdes</i>	กลูแคน	คาร์บอนไดออกไซด์	9 วัน
แบคทีเรีย (Bacteria)	<i>Acetobacter xylinum</i>	เซลลูโลส	ฟรุคโตส, กลูโคส	pH = 4–5; 30 °C; 40 ชั่วโมง
	<i>Acinetobacter sp.</i>	เซลลูโลส	เอทานอล, ดีเซล	pH = 7; 30 °C; 1 bar
	<i>Pseudomonas aerugina</i>	แอลจินต	ไซโลส	30–37 °C; 1 bar; 72 ชั่วโมง
	<i>Azobacter sp.</i>	แอลจินต	กลูโคส, ฟรุคโตส	pH = 7; 35 °C; 1 bar; 72 ชั่วโมง
	<i>Leuconostoc sp.</i>	เดกแทรน	ซูโครส	pH = 5.5; 35 °C; 1 bar
	<i>Alcaligenes faecalis</i>	เคิร์ดแลน	กลูโคส	pH = 7; 30 °C; 120 ชั่วโมง
	<i>Shingomonas sp.</i>	เจลแลน	แป้ง	pH = 7–7.5; 30–32 °C
	<i>Sreptococcus sp.</i>	กรดไฮยารุนิก	กลูโคส	pH = 7; 37 °C
	<i>Xanthomonas campestris</i>	แซนแทน	โมลาส	pH = 7; 28 °C; 1 bar; 24 ชั่วโมง
	<i>Bacillus spp.</i>	ลิวาน	กลูโคส, ซูโครส	pH = 5.6–5.8; 37 °C; 1 bar; 3 วัน
	<i>Zymonas mobilis</i>	ลิวาน	ซูโครส	30 °C; 120 ชั่วโมง
	<i>Enterobacter sp.</i>	EPS อื่นๆ	กลีเซอรอล, กลูโคส	pH = 7; 30 °C, 4 วัน
	<i>Halomonas sp</i>	EPS อื่นๆ	ซูโครส, กลูโคส	pH = 7; 32–37 °C

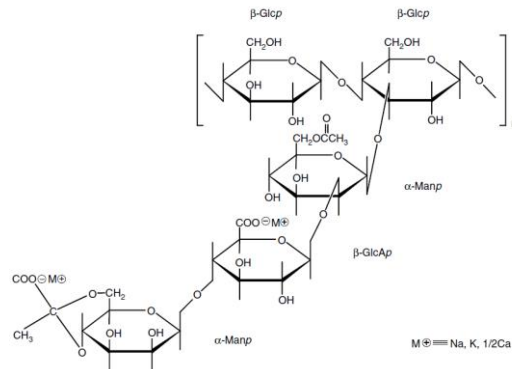
สาหร่ายสีเขียว แกมน้ำเงิน (cyanobacteria)	<i>Synechocystis</i> <i>sp.</i>	EPS อื่นๆ	คาร์บอนไดออก ไซด์	pH = 6.8; 25 °C; 20 วัน
---	------------------------------------	-----------	----------------------	----------------------------

ที่มา : Donot และคณะ (2012)

ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญและได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย
แซนแทน หรือ แซนแทนกัม (Xanthan gum) เป็นเอ็กโซพอลิคาไรด์จากแบคทีเรีย
Xanthomonas campestris ได้รับการทดสอบและยอมรับจากองค์การอาหารและยาแห่ง
สหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration; FDA) ว่ามีความปลอดภัย สามารถ
นำมาใช้กับอาหารได้ในสหรัฐอเมริกา ในปี 1969 (Izydorczyk และคณะ, 2005) ในปัจจุบัน
แซนแทนได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายทั่วโลกมีการนำมาใช้ประโยชน์ในทางอาหาร ยา
เครื่องสำอาง พลาสติกชีวภาพ เป็นต้น (Freitas และคณะ, 2011) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์
ชนิดหนึ่งที่ได้รับการศึกษามากที่สุด แซนแทนเป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ ขั้นตอนการสร้าง
แซนแทนสามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน (Whitfield และ Valvano, 1993) คือ

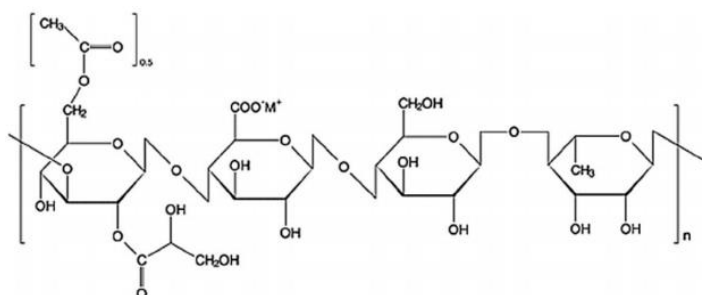
1. รวบรวมน้ำตาลและเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์ของนิวคลีโอไทด์
2. รวมหน่วยย่อยของเพนตะแซ็กคาไรด์ (pentasaccharide) จากนั้นติดกับ
ไขมันที่เป็นตัวขนส่ง (lipid transporter)
3. เกิดกระบวนการต่อสายพอลิเมอร์ของเพนตะแซ็กคาไรด์ และส่งออก
ภายนอกเซลล์

โครงสร้างพื้นฐานของแซนแทนคล้ายกับเซลลูโลส คือ β -(1-4)-D-glucose ดังรูปที่ 2.10
นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วย D-glucosyl D-mannosyl และ D-glucuronyl acid (Becker
และคณะ, 1998) แซนแทนเป็นสารประกอบที่มีความซับซ้อนสูง มีมวลโมเลกุลมาก (3×10^5 -
 8×10^6 ดาลตัน) มีโครงสร้างเป็นเกลียว (helical structure) โดยจะมีกิ่งด้านข้าง มีความ
เสถียรสูง สามารถละลายได้ดี มีความข้นหนืดสูง ทนความร้อนได้ดี (Garcia-Ochoa และ
คณะ, 2000)



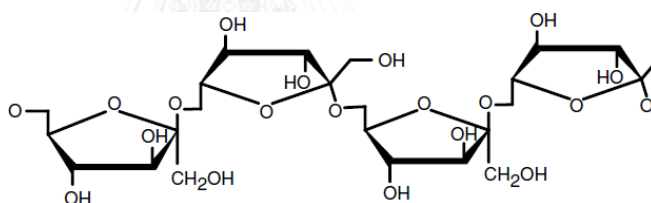
รูปที่ 2.10 โครงสร้างแขนแทน (Izydorczyk และคณะ, 2005)

เจลแลน (gellan) เป็นเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียในสกุล *Sphingomonas* เช่น *Sphingomonas elodea* โครงสร้างหลักของเจลแลนคือ เตตระแซ็กคาไรด์ (tetrasaccharide) มีหน่วยย่อยคือ กลูโคส กรดกลูโคโรนิก และแรมโนส เป็นองค์ประกอบ (Coleman และคณะ, 2008) โดยจะอยู่ในรูปแบบน้ำตาลหน่วยย่อยต่อกัน 4 โมเลกุลซ้ำๆ ติดต่อกัน (Gong และคณะ, 2009) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 โดยที่ส่วนของโครงสร้างหลักนี้จะมีในทุกพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Sphingomonas* (conserved region) แต่จะแตกต่างกันในส่วนของพันธะของสายข้าง (side chain linkage) ซึ่งเป็นตัวกำหนดสมบัติทางรีโอโลยี (rheological property) ได้แก่ ความหนืดและการไหล (Coleman และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความยาวของสายพอลิแซ็กคาไรด์ ปฏิกริยาภายในระหว่างโมเลกุล (intramolecular interaction) และปฏิกริยาระหว่างโมเลกุลกับแวดล้อมภายนอก (Campana และคณะ, 1992) เจลแลนมีข้อได้เปรียบคือ เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เตรียมง่าย ใช้สะดวก มีความเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต จึงมีการนำไปประยุกต์กันอย่างแพร่หลายในทางอุตสาหกรรมอาหารและยา



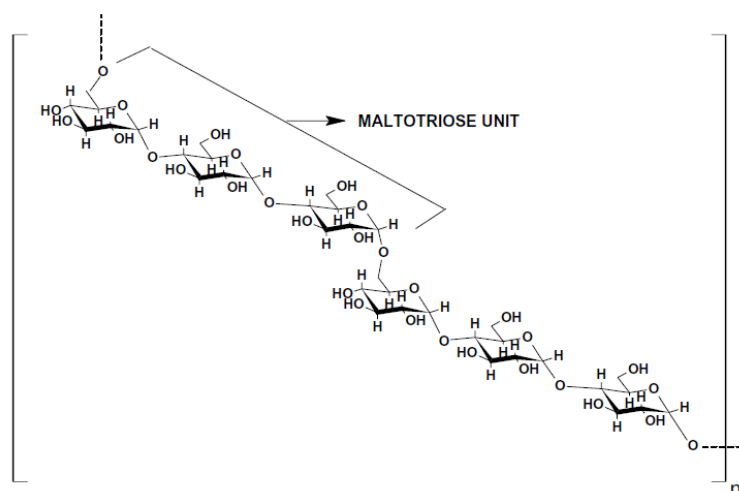
รูปที่ 2.11 โครงสร้างเจลแลน (Gong และคณะ, 2009)

ลีแวน (levan) เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย จัดเป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีกิ่งมาก สังเคราะห์มาจากซูโครสโดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus*, *Rahnella*, *Aerobacter*, *Erwinia*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* และ *Zymomonas* (de Oliveira และคณะ, 2007) โครงสร้างของลีแวนประกอบด้วย D-fructofuranosyl เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -(2-6) ดังรูปที่ 2.12 การสังเคราะห์ลีแวนจะเกิดขึ้นที่ภายนอกเซลล์ โดยใช้ เอนไซม์ภายนอกเซลล์ คือ sucrose 6-fructosyltransferase, β -(2-6)-fructosyltransferase และ β -(2-6)-fructan ลีแวนได้ถูกนำมาใช้ในทางการค้าเพื่อใช้เป็น อิมัลซิไฟเออร์ สารเพิ่มความข้นเหนียว สารเพิ่มความเสถียร สารช่วยเติมแต่งสีและกลิ่น สารเคลือบผิวในขั้นตอนสุดท้าย (surface-finishing agent) หรือนำมาใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มสารในกระบวนการเอนแคปซูลชัน (encapsulating agent) (Senthilkumar และ Gunasekaran, 2005)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

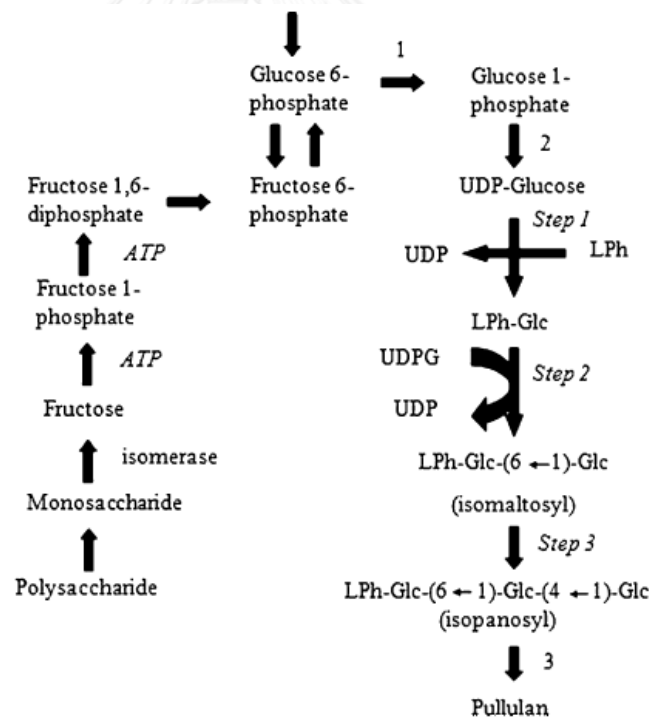
รูปที่ 2.12 โครงสร้างลีแวน (Izydorczyk และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.13 โครงสร้างพุลลูแลน (Singh และคณะ, 2008)

พุลลูแลน (pullulan) เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่ง ที่มีองค์ประกอบคือ น้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกัน 3 โมเลกุล ด้วยพันธะ α -(1,4) ไกลโคซิดิก เรียกว่า มอลโทไตรโอส (maltotriose) และระหว่างมอลโทไตรโอสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,6) ไกลโคซิดิกเข้าไปเรื่อยๆ (Cheng และคณะ, 2011) ดังรูปที่ 2.13 โดยพุลลูแลนมีอีกชื่อว่า พอลิมอลโทไตรโอส (polymaltotriose) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง ซึ่งผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Tremella mesenterica*, *Cytaria hariatii*, *Cytaria darwinii*, *Teloschistes flavicans*, *Rhodototula bacarum*, *Cryphomectria parasitica* และ *Aureobasidium pullulans* เป็นต้น (Singh และคณะ, 2008) โดยพุลลูแลนมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 4.5×10^4 - 6×10^5 ดาลตัน (Lee และ Yoo, 1993) ขึ้นอยู่กับภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยที่ Shu และคณะ (2007) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลจะส่งผลต่อการแสดงออกทางชีวภาพ (bioactivity) อีกด้วย จากลักษณะโครงสร้างดังกล่าวทำให้พุลลูแลนมีคุณสมบัติที่ดีคือ เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ มีความยืดหยุ่น ชื้นเหนียว มีความสามารถในการยึดเกาะ (adhesive ability) มีความเสถียรที่ช่วงอุณหภูมิและความเป็นกรดเบสกว้าง สามารถนำมาทำเส้นใยหรือทำแผ่นฟิล์มชีวภาพได้ (biodegradable film) (Yuen, 1974, Duan และคณะ, 2008) ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 250-280 องศาเซลเซียส (Leathers, 2003) จึงมีการนำพุลลูแลนมาประยุกต์ในหลายด้านไม่ว่าจะเป็นทางอาหาร ยา ทางการแพทย์ เครื่องสำอาง และอื่นๆ การสังเคราะห์พุลลูแลนเกิดขึ้นภายในเซลล์จากนั้นจึงมีการส่งออกนอกเซลล์ (Simon และคณะ, 1993) แต่ขั้นตอนการสังเคราะห์พุลลูแลนทั้งหมดยังคงไม่เป็นที่กระจ่าง แต่ Duan และคณะ (2008) ได้กล่าวถึงขั้นตอนการสังเคราะห์พุลลูแลนที่มีความเป็นไปได้ว่ามีเอนไซม์สำคัญ 3 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนกลูโคสให้กลายเป็นพุลลูแลน คือ α -

phosphoglucose mutase, uridine diphosphoglucose pyrophosphorylas (UDPG-pyrophosphorylase) และ glucosyltransferase โดยเริ่มจากที่สารตั้งต้นในการผลิตพุลลูแลน (pullulan precursor; UDPG) โดยติดโมเลกุลของกลูโคสกับโมเลกุลของไขมัน (lipid-linked glucose) เมื่อต่อกลูโคสอีกโมเลกุลจะเกิดเป็น lipid-linked isomaltose จากนั้น isomaltosyl จะทำปฏิกิริยากับ lipid-linked glucose แล้วได้ isopanoyl จึงเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) กลายเป็นพุลลูแลน Ono และคณะ (1977) ได้ทดลองสังเคราะห์พุลลูแลนจากน้ำตาลซูโครส โดยใช้เอนไซม์จาก *A. pullulans* พบว่าสามารถทำได้เมื่อองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยามี ATP และ UDPG ในขณะที่ McCormick และคณะ (1989) ได้เสนอว่า *A. pullulans* ไม่ได้เปลี่ยนกลูโคสไปเป็นพอลิเมอร์โดยตรง แต่เกี่ยวกับการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชันกับคาร์โบไฮเดรตที่สะสมอยู่ภายในเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 2.14 เริ่มจากเชื่อมีการสะสมน้ำตาลไว้สำหรับการผลิตพุลลูแลนในช่วงระยะท้ายๆของวงจรชีวิต (late stage of life cycle) ซึ่งคาดว่าเป็นไปได้เนื่องจากมีความสอดคล้องกันของปริมาณไกลโคเจนภายในเซลล์และผลผลิตพุลลูแลน (Simon และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.14 กระบวนการสังเคราะห์พุลลูแลน (Cheng และคณะ, 2011)

หมายเหตุ : เอนไซม์หมายเลข 1 คือ α -phosphoglucose mutase เอนไซม์หมายเลข 2 คือ UDPG-pyrophosphorylase และ เอนไซม์หมายเลข 3 คือ glucosyltransferase

2.3 *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans หรือเคยเป็นที่รู้จักในชื่อของ *Pullularia pullulans* ตั้งเดิมเป็นราที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Imperfect fungi (Wynne และ Gott, 1956) แต่ในปัจจุบัน *A. pullulans* จัดว่าอยู่ใน Class Ascomycota, Order Dothideales, Family Dothideaceae (Kurtzman และคณะ, 2011) และสามารถจำแนกราชชนิดนี้ออกเป็นอีก 3 ชนิด (varieties) คือ *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum* และ *A. pullulans* var. *aubasidani* Yurlova (Yurlova และ De Hoog, 1997) เนื่องจาก *A. pullulans* สามารถผลิตเม็ดสีดำคล้ายเมลานิน (melanin-like pigment) ได้ทำให้มีอีกชื่อเรียกคือ ยีสต์ดำ (black yeast) นอกจากนี้สีดำแล้ว ราชนิดนี้ยังมีอีกหลายสายพันธุ์ที่ให้สีแตกต่างกันออกไป ซึ่งอาจพบสีแดง เหลือง ชมพู หรือสีม่วง (Leathers และคณะ, 1984) สามารถพบราชนิดนี้ได้หลากหลายแหล่งในธรรมชาติ ทั้งจากในดิน น้ำ ใบไม้ วัสดุจากไม้ ก้อนหิน ฯลฯ (Urzi และคณะ, 1999) นอกจากนี้ Nagahama (2006) ได้รายงานว่าพบ *A. pullulans* ในสถานที่ที่มีความเค็มมาก เช่น ในน้ำทะเลลึก และตามน่านน้ำชายฝั่ง (coastal water) เป็นราที่มีลักษณะการเจริญหลายรูปแบบ (polymorphic fungus) โดยจะมี 3 ลักษณะเด่น (Singh และคณะ, 2008) คือ

1. เส้นใยที่มีเส้นแบ่งผนังเซลล์ (septate filament)
2. คลาไมโดสปอร์ขนาดใหญ่ (chlamydospore)
3. เซลล์เดี่ยวลักษณะกลมเหมือนเซลล์ยีสต์

2.3.1 ผลผลิตชีวภาพจาก *A. pullulans*

ในช่วงหลายปีมานี้ *A. pullulans* เป็นราคล้ายยีสต์ที่กำลังได้รับความสนใจในวงกว้าง เรียกได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำผลิตภัณฑ์ของราชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ได้ในหลายด้าน (Chi และคณะ, 2009) เช่น นำมาผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (single-cell proteins) ผลิตเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ได้หลากหลายชนิด เช่น อะไมเลส ไลเปส โปติเอส ฯลฯ สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ หรือ พูลลูแลน นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (biocontrol) ได้อีกด้วย ตัวอย่างการนำผลิตภัณฑ์จาก *A. pullulans* ไปใช้ประโยชน์

1. โปรตีนเซลล์เดี่ยว นำมาเป็นอาหารให้แก่มนุษย์และสัตว์ เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับการผลิตไบโอแอคทีฟเพปไทด์ (bioactive peptide) (Chi และคณะ, 2009)
2. อะไมเลส มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรมขนมอบ ใช้ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงให้กลายเป็นน้ำตาล และเป็นของเหลว (liquefaction) ใช้ใน

อุตสาหกรรมสิ่งทอ การผลิตกระดาษ สารเติมแต่งในน้ำยาทำความสะอาด ในการผลิตเอทานอล ในการทดสอบทางคลินิกทางด้านอาหารและยา ในการผลิตจุลินทรีย์ (Chi และคณะ, 2001, Gupta และคณะ, 2003)

3. โปรติเอส ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ใช้ทางการแพทย์ อุตสาหกรรมฟอกหนัง การบำบัดน้ำเสีย หรือในทางอุตสาหกรรมสารเคมี (Kumar และ Takagi, 1999)
4. ไลเปส ใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยา (catalyze) ได้ในหลายปฏิกิริยา เช่น hydrolysis, inter-esterification, alcoholysis, acidolysis, esterification และ aminolysis เป็นต้น (Hasan และคณะ, 2006)
5. เซลลูเลส ใช้ในการปรับปรุงเส้นใยเซลลูโลส (Improvement of cellulosic fibres) สารเติมแต่งในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว การบำบัดของเสีย ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตพลังงานทางเลือกหรือ พลังงานชีวภาพ (Zhang และ CHI, 2007)
6. ไซลานเนส (xylanase) ใช้หลักๆ ในอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ เนื่องจากเอมิเซลลูโลส มีองค์ประกอบหลักคือไซแลน (xylan) อุตสาหกรรมอาหาร การบำบัดของเสีย (Li และคณะ, 1993)
7. แมนนาเนส (Mannanase) ในอุตสาหกรรมผลิตกระดาษ ใช้ในกระบวนการเปลี่ยนสารโดยชีวภาพ (bioconversion) เช่น เศษของเหลือจากการเกษตรให้กลายเป็นน้ำตาล (fermentable sugar) เป็นสารลดความหนืดในการสกัดกาแฟ (Lin และ Chen, 2004)
8. การควบคุมทางชีวภาพ ในปัจจุบันมีความต้องการที่จะลดการใช้ยาฆ่ารา (fungicide) สำหรับในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยว (post-harvest) ในพืชผัก ผลไม้ต่างๆ เพื่อป้องกันปัญหาการดื้อยา ปลอดภัยแก่ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม เนื่องจาก *A. pullulans* เป็นราที่มีความสามารถในการปรับตัวดี (well-adapted) สามารถทนกับความแห้งแล้งได้ดี (Mounir และคณะ, 2007)
9. พูลูลูแลน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ นำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมเกษตรและอาหาร คือนำมาผลิตแผ่นฟิล์มชีวภาพ และเส้นใยชีวภาพ (Singh และคณะ, 2008)

2.3.2 พอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans*

Beuer (1938) เป็นผู้ริเริ่มสังเกต และศึกษาการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* จากนั้น Bernier (1958) ได้เป็นผู้ทำการคัดแยกและศึกษาสมบัติเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์นี้ได้ถูกเรียกว่า พูลลูแลน ตามชื่อของสายพันธุ์ โดยในภายหลังมีงานวิจัยหลายโครงการให้ความสนใจพูลลูแลนมากยิ่งขึ้น เนื่องจาก *A. pullulans* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นกลูโคส ซูโครส มอลโตส ฟรุคโตส และรวมไปถึงของเหลือจากทางการเกษตร (Leathers, 2003) พูลลูแลนได้เข้ามาสู่ในระดับอุตสาหกรรมในปี 1976 โดยบริษัท Hayashibara company limited ในจังหวัดโอคายาม่า ประเทศญี่ปุ่น โดยมีการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ และนำมาทำเป็นแผ่นฟิล์มจำหน่ายในปี 1982 (BeMiller และ Whistler, 1973) สามารถผลิตพูลลูแลนของ *A. pullulans* มีความแปรผันอยู่ในช่วงกว้างตั้งแต่ในช่วง 1.3-52.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่นำมาผลิต (BeMiller และ Whistler, 1973, Duan และคณะ, 2008, Ravella และคณะ, 2010) *A. pullulans* สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์และส่งออกมาที่อาหารเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ให้อากาศ โดยที่สามารถสังเกตเห็นได้จากความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มมากขึ้น หรืออาจจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีอาหารที่มาจากเม็ดสีที่ผลิตจากตัวเชื้อ (Singh และคณะ, 2008) มีงานวิจัยหลายฉบับระบุว่า การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* เกี่ยวข้องกับลักษณะของเซลล์ และจะผลิตได้ที่สุดในรูปแบบลักษณะเซลล์เหมือนเซลล์ยีสต์ในการเลี้ยงเชื้อแบบแบช (batch culture) แต่ยังไม่สามารถหาความสัมพันธ์ของทั้งสองส่วนนี้ได้ (Catley, 1980, McNeil และคณะ, 1989) พบว่าเซลล์คล้ายยีสต์ที่บวม (swollen cell) และคลาไมโดสปอร์เกี่ยวข้องกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (Simon และคณะ, 1998) การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จะเกิดขึ้นในช่วงท้ายของระยะแบ่งตัวแบบทวีคูณ (exponential phase) และช่วงต้นของระยะคงตัวของจำนวนเซลล์ (stationary phase) (Catley, 1971) โดยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จัดเป็น สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) (Bulmer และคณะ, 1987) ภาวะการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อจะแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ โดยพบว่ามีหลายปัจจัยที่ส่งผลการผลิตไม่ว่าจะเป็นด้านของสารอาหาร แร่ธาตุ ความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ การเลี้ยงเชื้อ และกระบวนการผลิต *A. pullulans* สามารถใช้กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส มอลโตส แป้ง และมอลโทโอลิแซ็กคาไรด์ (malto-oligosaccharide) เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการส่งเสริมการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (Singh และคณะ, 2008) ในขณะที่ LeDuy และคณะ (1983) ได้รายงานว่า *A. pullulans* สามารถใช้ไซแลน อะราบิโนส แมนโนส กาแล็คโตส แรมโนส และแล็คโตส เป็นแหล่งคาร์บอน

แต่จะให้ผลผลิตที่ลดลงเมื่อเทียบกับน้ำตาลในกลุ่มแรก นอกจากนี้ยังพบการใช้แหล่งคาร์บอนที่ซับซ้อน และของเหลือจากทางการเกษตร เช่น โมลาส (molass) น้ำเชื่อมข้าวโพด ผิวเปลือกองุ่น น้ำมันมะกอก คอร์นมิลไฮโดรไลเซต (cornmeal hydrolysate) กากข้าว (spent grain) พีทไฮโดรไลเซต (peat hydrolysate) ฯลฯ (West และ Reed-Hamer, 1991, Youssef และคณะ, 1998, Roukas, 1999) จากการรายงานของ Seo และคณะ (2004) พบว่าการเติมการสกัดจากยีสต์ (yeast extract) หรือ กากถั่วเหลือง เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนจะช่วยส่งเสริมการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อชนิดนี้ และยังพบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส หรือ ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนจะส่งเสริมการผลิตได้ดีที่สุด

Madi และคณะ (1996) รายงานว่า ค่าความเป็นกรดเบสส่งผลต่ออัตราการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ และช่วงความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการผลิตสำหรับ *A. pullulans* คือ 4.5 ในขณะที่ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมแต่การเจริญของเซลล์จะอยู่ที่ 6.5 สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จะอยู่ในช่วง 24-30 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ (BeMiller และ Whistler, 1973, McNeil และคณะ, 1989, West และ Reed-Hamer, 1993) ปัญหาที่สำคัญของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* คือ เม็ดสี ซึ่งอาจมีการผลิตควบคู่ไปกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิถีการสังเคราะห์เพนตะคีไทด์ (pentaketide pathway) ที่จะให้เม็ดสีเขียวเข้มไปจนถึงสีดำ โดยจะผลิตในช่วงระยะสุดท้ายของการหมักในขณะที่เซลล์ที่บวมกำลังจะพัฒนาไปเป็นคลาไมโดสปอร์โดยสมบูรณ์ (Siehr, 1981) จึงต้องมีการแยกตัวเม็ดสีออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงมากขึ้น ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) การใช้สารสกัดประเภทต่างๆ เป็นต้น (Singh และคณะ, 2008) ในขณะที่หากเลือกใช้สายพันธุ์ที่ไม่มีการผลิตเม็ดสีในระหว่างการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (melanin free production) จะสามารถตกตะกอนและทำให้บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนเดียว โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสม เช่น อะซิโตน และ แอลกอฮอล์ (Siehr, 1981) โดยทั่วไปจะนิยมใช้แอลกอฮอล์ที่ใช้สำหรับการตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ โดยจะเลือกใช้เอทานอล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาณของส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาจทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยการปั่นเหวี่ยงการกรองด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) หรือ การคัดแยกสารด้วยวิธีการกรองเรซิน (ion-exchange resin) (Youssef และคณะ, 1998, Kachhawa และคณะ, 2003)

2.3.3 การตรวจวิเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์พอลูลูแลน

2.3.3.1 การวิเคราะห์ด้วยการย่อยด้วยกรด

การย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis) เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับและมีการใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์มาอย่างยาวนาน เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และสะดวกสำหรับการดำเนินงาน กรดที่นิยมนำมาใช้พื้นฐานได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก (HCl), กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4), กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid; TFA) เป็นต้น (Liu และคณะ, 2016) โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ออกมาเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส สามารถหาปริมาณน้ำตาลผลิตภัณฑ์ได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดนั้นๆ และเนื่องจากการย่อยด้วยกรดเป็นการตัดแบบสุ่ม โดยไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพันธะภายในของพอลิแซ็กคาไรด์ จึงนิยมใช้วิธีการย่อยด้วยกรดควบคู่ไปกับวิธีการอื่นเพื่อยืนยันผลการทดสอบเช่น วิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีด้วยเครื่อง HPLC, Gas chromatography-Mass Spectrometer (GC-MS) หรือ Thin-layer chromatography (TLC) หรือวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีการทางเอนไซม์ (enzyme assay) ที่มีความจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น เป็นต้น (Stephen, 1995, Wang และคณะ, 2015)

2.3.3.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) เป็นเครื่องมือวิเคราะห์สาร ประกอบไปด้วย 2 ส่วนหลักคือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสคงที่ (stationary phase) ที่ใช้หลักการในการคัดแยกสารผ่านคอลัมน์โดยสารต่างชนิดกัน จะมีขนาดโมเลกุล โครงสร้างของสาร สภาพขั้ว ที่แตกต่างกัน จึงทำให้สามารถแยกความแตกต่างของช่วงเวลา (retention time) ที่สารถูกคัดแยกออกมา ซึ่งความหลากหลายของเครื่อง HPLC นี้อยู่ตรงที่สภาพขั้วของเฟสเคลื่อนที่ และชนิดของเฟสคงที่ เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารอินทรีย์ที่ไม่ระเหย หรือระเหยได้ไม่มาก (semi-volatile organic compound) เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ (Aitzetmüller, 1978) HPLC สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1. แบบธรรมดา (normal-phase HPLC) ภายในคอลัมน์ที่เป็นเฟสคงที่ที่มีสภาพขั้ว คือบรรจุพวกซิลิกา อะมิโนโพรพิล (aminopropyl) ไดออล (diol) ฯลฯ ในส่วนของเฟสเคลื่อนที่จะไม่มีขั้ว ได้แก่ เฮกเซน (hexane) ลำดับการคัดแยกคือ สารที่ไม่มีขั้วจะออกมาเป็นอันดับแรก

2. แบบย้อนกลับ (reversed-phase HPLC) HPLC ชนิดนี้จะได้รับความนิยมกว่าประเภทแรก หลักการทำงานตรงกันข้ามคือ เฟสคงที่จะมีสภาพขี้ผึ้งได้แก่ ออกตะดีซิลซิลเลน (octadecylsilane) หรือซิลิลาตดัดแปลงทำให้ไม่มีสภาพขี้ผึ้ง คือนำมาติดสารไฮโดรคาร์บอนสายยาว ในส่วนของเฟสเคลื่อนที่จะเป็น สารละลายมีขี้ผึ้ง เช่น น้ำ เมทานอล หรือ อะซิโทไนไตรล์ (acetonitrile)

Retention time (RT) คือ เวลาที่สารใช้เพื่อเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ออกมาสู่ เครื่องวัดสัญญาณโดยวัดตั้งแต่เริ่มฉีดตัวอย่างเข้าไปในเครื่อง สารต่างๆ จะมี retention time เป็นเวลาเฉพาะของตัวเอง ซึ่ง RT อาจแตกต่างกันหากปัจจัยเหล่านี้ต่างกัน ได้แก่ ความดันและอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์ ลักษณะของเฟสคงที่ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ ฯลฯ นอกจาก RT จะบอกเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่แล้ว ยังสามารถบอก ปริมาณสารที่มีอยู่ในตัวอย่างได้อีกด้วย โดยสามารถนำพื้นที่ใต้พีคมาคำนวณเทียบกับ กราฟมาตรฐานของสารตัวอย่างนั้นๆ (Barnes, 1992)

เครื่องรับสัญญาณ (detector) ใช้รูปแบบการรับสัญญาณโดยวัดค่าดูดกลืน คลื่นแสงในช่วงแสง UV โดยอาศัยหลักการว่า สารประกอบอินทรีย์มีความสามารถในการดูดกลืนแสง UV ที่แตกต่างกันออกไป โดยตัวรับสัญญาณ UV จะแสดงถึงปริมาณที่ แสงถูกดูดกลืนไป ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณของสารตัวอย่างที่ตรวจหาว่ามีปริมาณมากน้อย แตกต่างกันอย่างใด แต่ต้องระวังการเลือกใช้สารละลายอินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นเฟส เคลื่อนที่ไม่ให้เกิดความสับสนในการแปลผล (Aitzetmüller, 1978, Barnes, 1992)

2.3.3.3 การใช้เอนไซม์ในการย่อย (enzyme hydrolysis)

เอนไซม์เป็นสารประกอบประเภทโปรตีน เป็นพอลิเพปไทด์ที่มีหน้าที่พิเศษใน การทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆ เช่น การย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ การ สังเคราะห์สาร เป็นต้น (Fersht, 1985) ข้อดีของการใช้เอนไซม์ในการทำปฏิกิริยา (Segel, 1975) คือ

1. การทำงานของเอนไซม์มีความจำเพาะสูง คือ มีความจำเพาะต่อซับสเตรต หรือโมเลกุลที่จะทำปฏิกิริยาด้วย
2. ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่รุนแรง เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาทางเคมี อื่นๆ
3. เอนไซม์สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก สามารถคงสภาพและคุณสมบัติไว้ตามเดิม และมีความไวปฏิกิริยาสูงจึงไม่จำเป็นต้องใช้ปริมาณมาก

4. ช่วยเพิ่มความเร็วในปฏิกิริยาให้เกิดไวขึ้น และยังช่วยลดพลังงานกระตุ้น (activation) ที่ต้องใช้ในการเกิดปฏิกิริยา

การใช้เอนไซม์ยังคงมีข้อจำกัดในหลายๆด้าน เช่น ด้านของราคาเอนไซม์ที่สูง ไม่เหมาะสำหรับสารตั้งต้นที่หลายชนิดอยู่รวมกัน ควบคุมและติดตามการทำงานค่อนข้างยาก มีภาวะการทำงานที่ค่อนข้างแคบและจำเพาะเจาะจง เช่น อุณหภูมิ เวลา ความเป็นกรดเบส และเนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประกอบประเภทโปรตีน จึงสามารถเสียดสภาพได้ง่าย (Kirk และคณะ, 2002)

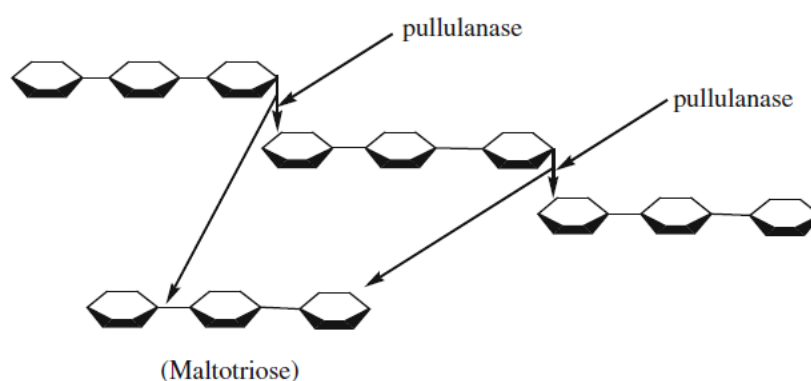
สำหรับเอนไซม์ที่สามารถย่อยพุลลูแลนได้แบ่งออกเป็น 4 ชนิด (Sakano และคณะ, 1982) ได้แก่ กลูโคสอะไมเลส (glucoamylase, EC 3.2.1.1) โดยที่บริเวณพันธะ α -D-1,4 ไกลโคซิดิกของพอลิแซ็กคาไรด์ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคส พุลลูลานเนส (pullulanase, EC 3.2.1.41) ตัดบริเวณพันธะ α -1,6 ไกลโคซิดิกของพุลลูแลนได้เป็นมอลโทไทรออส สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Klesiella pneumoniae* หรือ *Aerobacter aerogenes* ไอโซพุลลูลานเนส (isopullulanase, EC 3.2.1.57) ซึ่งไม่ทำปฏิกิริยากับแป้ง โดยตัดที่ α -D-1,4 ไกลโคซิดิก และให้ผลิตภัณฑ์เป็นไอโซพานอส (isopanose) และ นีโอพุลลูลานเนส (neopullulanase) ผลิตได้จาก *Bacillus stearothermophilus* จะตัดพุลลูแลนตรงพันธะ α -D-1,4 ไกลโคซิดิก และให้พานอส (panose) เป็นผลิตภัณฑ์ (Linder และคณะ, 1976, Ara และคณะ, 1995)

เอนไซม์พุลลูลานเนส เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในภาคอุตสาหกรรมคือ ในขั้นตอนการแปรรูปแป้ง ใช้เป็นเอนไซม์ย่อยแป้ง (starch-debranching enzyme) (Norman, 1982) ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตมอลโตสไซรัป (maltose syrup) หรือการผลิตกลูโคส และฟรุคโตสความบริสุทธิ์สูง (Hyun และ Zeikus, 1985) อาจรู้จักในชื่อ **limit dextrinase, amylopectin 6-gluconohydrolase, debranching enzyme หรือ pullulan 6-gluconohydrolase** (Ara และคณะ, 1995) สามารถตัดบริเวณพันธะ α -1,6 ไกลโคซิดิก พุลลูลานเนสสามารถจัดจำแนกออกเป็น 2 ประเภทโดยจะแบ่งประเภทตามความสามารถในการตัดพันธะ α -D-1,4 ไกลโคซิดิกในแป้ง อะไมโลเพกติน พุลลูแลน และโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เกี่ยวข้อง (related oligosaccharide) (Zareian และคณะ, 2010) คือ

1. พุลลูลานเนส ชนิดที่ 1 คือ สามารถตัดได้เฉพาะพันธะ α -D-1,6 ไกลโคซิดิก

2. พูลูลูซานเนส ชนิดที่ 2 สามารถตัดพันธะ α -D-1,6 ไกลโคซิดิก และพันธะ α -D-1,4 ไกลโคซิดิก

เมื่อทำปฏิกิริยากับพูลูลูแลนเอนไซม์พูลูลูซานเนสจะสามารถตัดบริเวณพันธะ α -D-1,6 ไกลโคซิดิกภายในพูลูลูแลน ให้ผลิตภัณฑ์คือน้ำตาลมอลโทโทรโอสเพียงชนิดเดียว ดังรูปที่ 2.15 ที่แสดงให้เห็นถึงการทำงานของเอนไซม์ต่อพูลูลูแลน



รูปที่ 2.15 ปฏิกิริยาของเอนไซม์พูลูลูซานเอสต่อพูลูลูแลนและผลิตภัณฑ์ (มอลโทโทรโอส) (Wu และคณะ, 2010)

2.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์

ในปัจจุบันมีการหลีกเลี่ยงการใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นสารสังเคราะห์จากปฏิกิริยาเคมี เนื่องจากการควบคุมรูปแบบโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ซับซ้อนทำได้ยาก และมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม และมนุษย์โดยตรง (Perugino และคณะ, 2004) ดังนั้นภาคอุตสาหกรรมจึงหันมาสนใจพอลิแซ็กคาไรด์จากธรรมชาติ แหล่งผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากธรรมชาติหลักคือ พืช สาหร่าย และจุลินทรีย์ เนื่องจากความได้เปรียบของการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องใช้พื้นที่ และระยะเวลา และไม่ขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ ทำให้อุตสาหกรรมหลายชนิดได้นำพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ไปประยุกต์ให้เกิดประโยชน์ (Khan และคณะ, 2007) โดยการนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปใช้ประโยชน์หลักทางด้านอาหาร ยา การแพทย์ ด้านความงาม และอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยจะเห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์เกือบทุกชนิดจะมีการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านอาหาร คือนำมาใช้เป็นสารเติม

แต่งเพื่อให้ลักษณะของอาหารเป็นไปตามต้องการ เช่น เป็นสารให้ความข้นเหนียว สารเพิ่มความเสถียร (stabilizer) สารก่ออิมัลชัน สารก่อเจล หรือ การนำมาทำเป็นแผ่นฟิล์มห่อหุ้มอาหาร

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์ สภาพขี้ว มวลโมเลกุล ราคาในท้องตลาด และการนำไปประยุกต์ใช้

พอลิแซ็กคาไรด์	ประจุ	มวลโมเลกุล	ราคา (ดอลลาร์/ กิโลกรัม)	การประยุกต์ใช้
แซนแทน	ลบ	$(2.0-50) \times 10^6$	3-5	<ul style="list-style-type: none"> - อาหาร - อุตสาหกรรมปิโตรเลียม - เภสัชกรรม - เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์ด้านความงาม - การเกษตร
เจลาแลน	ลบ	5.0×10^5	55-66	<ul style="list-style-type: none"> - อาหาร - อาหารสัตว์ - เภสัชกรรม - งานวิจัย เช่น การทำเจลรีเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)
อัลจินต	ลบ	$(0.3-1.3) \times 10^6$	5-20	<ul style="list-style-type: none"> - อาหาร - ด้านการแพทย์ เช่น การควบคุมการปลดปล่อยยา (control release), ศัลยกรรม, การจัดการกับบาดแผล (wound management)
เซลลูโลส	กลาง	ประมาณ 10^6	5.8-12	<ul style="list-style-type: none"> - อาหาร (ไฟเบอร์ที่ไม่ให้พลังงาน) - ด้านการแพทย์ เช่น การรักษาบาดแผล

				เนื้อเยื่อปลอมสำหรับ หลอกเลือด
แต้กแทรน	กลาง	10^6 - 10^9	-	- อาหาร - การขยายหลดเลือด - Chromatographic media
เคิร์ดแลน	กลาง	5×10^4 - 2×10^6	55	- อาหาร - อุตสาหกรรมยา - การเติมแต่งใน คอนกรีต - ด้านสิ่งแวดล้อม เช่น การดูดซับโลหะ
ไฮยาลูโรแนน (hyaluronan)	ลบ	2.0×10^6	100,000	- ทางด้านการแพทย์ - อาหารเลี้ยงเชื้อ
ซัคซิโนไกลแคน (succinoglycan)	ลบ	5×10^3 - 1×10^6	-	- อาหาร - ในกระบวนการเก็บ เกี่ยวน้ำมัน (Oil recovery)
ลีแวน	กลาง	3.0×10^6	-	- อาหาร เช่น เป็นพรีไบ โอติก - อาหารสัตว์ - ด้านการแพทย์ - เครื่องสำอาง ความ งาม
พูลูแลน	กลาง	1.5×10^5 - 2×10^6	20-300	- อาหาร เช่น फिल्म ชีวภาพ สารเติมแต่งใน อาหาร สารเคลือบเงา ในอาหาร ใช้เป็นวัสดุ ทดแทนในอาหาร พลังงานต่ำ ฯลฯ - ด้านการแพทย์และยา - ในอุตสาหกรรมผลิต เช่นกระดาษเคลือบเงา (gross paper) นำมา ผลิตเป็นเส้นใย - สีทาบ้าน สีเคลือบ

				- อุตสาหกรรมสิ่งพิมพ์ และภาพถ่าย
--	--	--	--	-------------------------------------

ที่มา : ดัดแปลงจาก Freitas และคณะ (2011)

2.5. บรรจุกัณฑ์

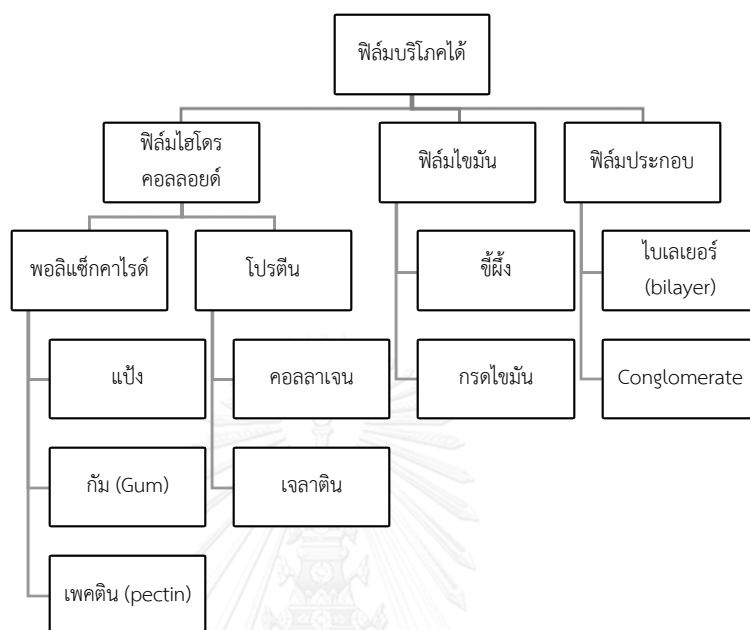
คุณภาพของอาหารขึ้นอยู่กับคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส (organoleptic) สารอาหาร ความสะอาดและสุขอนามัยในกระบวนการผลิต ทั้งยังขึ้นอยู่กับกระบวนการเก็บรักษาอาหารและใน ระหว่างการขนส่ง มีการนำกระบวนการทางเคมี วิธีการทำให้ปราศจากเชื้อในขั้นตอนลดการบรรจุ สินค้าเข้ามาช่วยในการรักษาคุณภาพของอาหารในภาคอุตสาหกรรม (Debeaufort และคณะ, 1998) แต่อย่างไรก็ตามก็ยังคงต้องอาศัยบรรจุกัณฑ์ เป็นตัวหลักในการทำหน้าที่ป้องกันและรักษาคุณภาพ ของผลิตภัณฑ์อาหาร บรรจุกัณฑ์สามารถทำได้จากหลายวัสดุและหลากหลายรูปแบบ เช่น ขวด พลาสติก แก้ว โลหะกระป๋อง กล่องหรือลังกระดาษ แผ่นฟิล์มสังเคราะห์ หรือแผ่นฟิล์มจากพอลิ แอซีทคาไรด์ เป็นต้น โดย Lee และคณะ (2008) ได้แบ่งหน้าที่ของบรรจุกัณฑ์ออกเป็นหัวข้อหลัก 4 ข้อ ได้แก่ การบรรจุ การป้องกัน เพื่อความสะดวก และเพื่อสื่อสารแก่ผู้บริโภค

2.5.1 แผ่นฟิล์มรับประทานได้

แผ่นฟิล์มรับประทานได้ (edible film) เป็นบรรจุกัณฑ์ทางเลือกใหม่ที่มาแทนที่ แผ่นฟิล์มสังเคราะห์สำหรับอาหาร ซึ่งในปัจจุบันได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากมีข้อ ได้เปรียบหลายประการ ที่สำคัญคือ สามารถรับประทานได้ร่วมกับผลิตภัณฑ์ จึงช่วยลดปัญหา สิ่งแวดล้อมเนื่องจากย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ และสามารถลดปริมาณขยะลงได้ (Dhanapal และคณะ, 2012) แผ่นฟิล์มบริโภคได้นี้ผลิตได้จากสิ่งที่สามารถบริโภคได้และ สามารถผลิตได้ไม่มีวันหมด โดยสามารถช่วยปรับปรุงลักษณะของแผ่นฟิล์มได้โดยการเติมสาร ประเภทต่างๆ เช่น สารเติมแต่งสีและกลิ่น สารให้ความหวาน เป็นต้น และสารที่เติมลงไปนั้นก็ จัดอยู่ในเกรดของอาหาร นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มชนิดนี้ได้รับการยอมรับว่าไม่เป็นอันตรายต่อ มนุษย์ ไม่มีสารพิษ ใช้เทคโนโลยีต่ำ มีค่าใช้จ่ายสำหรับการดำเนินการและค่าวัตถุดิบต่ำ (Sakellariou และคณะ, 1986) โดยองค์ประกอบหลักของฟิล์มบริโภคคือ พอลิแอซีทคาไรด์ โพรตีน และไขมัน ดังที่แสดงในรูปที่ 2.16 และได้ถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Zoebel และ Stephen, 2006) ได้แก่

1. ไฮโดรคอลลอยด์ ประกอบด้วยพอลิแอซีทคาไรด์ และโปรตีน

2. ไขมัน ได้แก่ กรดไขมัน ชี้ผึ้ง (wax) เอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol)
3. फिल्मประกอบ คือมีส่วนประกอบทั้งพอลิแซ็กคาไรด์และไขมัน



รูปที่ 2.16 การจัดจำแนกประเภทของฟิล์มบริโภคนได้ (Han และ Aristippos, 2005)

นอกจากองค์ประกอบหลักของฟิล์มแล้วอาจมีการเติมสารอื่นๆลงไปในฟิล์มหรือสารละลายฟิล์มเช่น พลาสติกไซเซอร์ หรือพวกสารก่ออิมัลชัน เพื่อให้แผ่นฟิล์มหรือสารเคลือบผิว (coating) มีสมบัติทางกายภาพที่ดียิ่งขึ้น (Han และ Aristippos, 2005)

พลาติไซเซอร์ (plasticizer) เป็นสารมวลโมเลกุลต่ำ เมื่อเข้าไปอยู่ร่วมกับสารประกอบภายในสารละลายฟิล์มแล้วจะลดแรงระหว่างโมเลกุล (intermolecular force) ของสายพอลิเมอร์ ส่งผลให้แผ่นฟิล์มมีความยืดหยุ่นที่ดีขึ้น ความต้านแรงดึง และสามารถยืดยาวได้ดี นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการเลือกผ่านของฟิล์มให้เพิ่มสูงขึ้นด้วย (Han และ Aristippos, 2005) พลาติไซเซอร์ที่ใช้ในฟิล์มบริโภคนได้ เช่น ซูโครส กลีเซอรอล ซอร์บิทอล กรดไขมัน มอนอกลิเซอไรด์ (monoglyceride) พอลิเอทิลีนไกลคอล (polyethylene glycol) จากการรายงานของ Marsh (1997) พบว่าน้ำสามารถทำหน้าที่เป็นพลาติไซเซอร์สำหรับฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์และฟิล์มจากโปรตีน

สารก่ออิมัลชัน (emulsifier) หรือสารลดแรงตึงผิว เป็นสารที่มีผลต่อบริเวณผิวหน้าของสาร ด้วยธรรมชาติมีสมบัติมีทั้งส่วนที่ชอบและไม่ชอบน้ำ (amphiphilic) จึงเป็นตัวกลาง

ระหว่างน้ำและไขมัน สามารถลดแรงตึงผิว (surface tension) ก่อให้เกิดความเสถียรในการเกิดอิมัลชัน (Han และ Aristippos, 2005) การใช้สารก่ออิมัลชันเพื่อช่วยให้ฟิล์มเกาะติด และช่วยในการเคลือบที่บริเวณผิวของผลิตภัณฑ์ได้ดียิ่งขึ้น ตัวอย่างสารก่ออิมัลชันที่ใช้กันโดยทั่วไป ได้แก่ กรดไขมัน เอทิลีนไกลคอลมอนอสเตียเรต (ethylene glycol monostearate) เลซิทีน (lecithin) ซูโครสเอสเทอร์ พอลิซอร์เบต หรือทวิน (tween) เป็นต้น (Valencia-Chamorro และคณะ, 2011)

สารไฮโดรคอลลอยด์ (Hydrocolloid) เป็นกลุ่มของพอลิเมอร์ที่ชอบน้ำ ได้จากพืช สัตว์ จุลินทรีย์ หรือสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล พอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีนจัดอยู่ในกลุ่มของสารไฮโดรคอลลอยด์ ในปัจจุบันสารกลุ่มนี้ได้รับความนิยมนำมาทำเป็นสารละลายแผ่นฟิล์ม (film forming solution) เพื่อที่จะใช้ในทางอาหาร ทั้งนี้ยังสามารถควบคุมเนื้อสัมผัส สี กลิ่น และยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย (Skurtys และคณะ, 2010) ซึ่งสารไฮโดรคอลลอยด์นี้สามารถละลายน้ำได้ทั้งหมด หรือเกือบทั้งหมด จึงนำมาใช้ทำประโยชน์ในด้านการเพิ่มความข้นเหนียวในสารละลาย และยังสามารถนำสารประเภทนี้มาทำเป็นสารก่ออิมัลชัน และสารเพิ่มความเสถียรได้อีกด้วย (Baldwin และคณะ, 1995)

แผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ฟิล์มชนิดนี้เกิดจากสายของพอลิเมอร์เชื่อมต่อกันทำให้มีสมบัติการต้านการซึมผ่านแก๊ส ทั้งออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และไอน้ำได้ดี (Olivas และ Barbosa-Cánovas, 2005) จึงเหมาะที่จะนำมาเป็นบรรจุภัณฑ์ที่ปรับสภาพบรรยากาศภายใน โดยที่เป็นภาวะไร้อากาศ เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ยาวนานยิ่งขึ้น (Baldwin และคณะ, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า เหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการบรรจุภัณฑ์ที่สามารถลดการสูญเสียน้ำ การหมิ่นหืนจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) นอกจากนี้ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติการซึมผ่านไอน้ำที่ต่ำ มีความเหนียว สามารถเกาะติดกับพื้นผิวได้ดี ชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์หลักที่นิยมนำมาทำแผ่นฟิล์มหรือสารละลายฟิล์มบริโภคได้ ได้แก่ ไคโตซาน (chitosan) แป้ง คาร์ราจีแนน เพกทิน พูลูลูแลน เจลแลน แชนแทนกัม เป็นต้น (Han และ Aristippos, 2005)

2.5.2 การขึ้นรูปฟิล์มรับประทานได้

2.5.2.1 การจุ่ม

การจุ่ม (dipping) คือการเตรียมสารละลายฟิล์มแล้วนำผลิตภัณฑ์มาเคลือบที่บริเวณหน้าโดยการจุ่มลงไปในสารละลายฟิล์มโดยตรงจากนั้นทิ้งไว้ให้สารละลายแห้ง และจะเปลี่ยนมาเป็นแผ่นฟิล์มเคลือบอยู่ที่ผิวหน้าออก เป็นวิธีที่ง่ายและใช้ทั่วไปสำหรับผักและผลไม้ ซึ่งปริมาณ ความหนาของฟิล์มที่เคลือบจะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของ

สารละลายฟิล์ม ระยะเวลาในการจุ่ม จำนวนครั้งในการจุ่ม และแรงตึงผิวของสารละลาย (Dhanapal และคณะ, 2012)

ตัวอย่างงานวิจัยของ Kraśniewska และคณะ (2014) ที่ศึกษาผลของฟิล์มพุลลูแลนที่ผลิตจาก *Aureobasidium pullulans* B-1 ผสมกับสารสกัดจากสมุนไพรมะขาม *Satureja hortensis* (SH) ด้วยวิธีสกัดด้วยน้ำและเอทานอลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ เตรียมสารละลายฟิล์มโดยละลายพุลลูแลนปริมาณ 10% ของน้ำหนักต่อปริมาตรลงในน้ำ แล้วผสมกับกลีเซอรอล 1% จากนั้นเติมสารสกัดจากสมุนไพรมะขามลงไป 20% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการผสมสารทั้งหมดด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วจึงนำพริกไทย และผลแอปเปิ้ล มาจุ่มลงสารละลายฟิล์มจากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 55-60% เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆ จากผลการทดสอบพบว่า ฟิล์มพุลลูแลนผสมสารจาก SH มีสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมถึง *Penicillium expansum* โดยผลของการยับยั้งเป็นผลโดยตรงจากสารสกัดจากสมุนไพรมะขามที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่สารจำพวกสารประกอบฟีนอล (phenolic compound) ทั้งนี้ฟิล์มพุลลูแลนผสมสารสกัด SH ยังช่วยรักษาน้ำหนัก ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา และยังคงความสดใหม่ของพริกไทยและผลแอปเปิ้ลอีกด้วย

2.5.2.2 การใช้แปรงทา

การทา (Brushing) เป็นวิธีการเคลือบฟิล์มลงบนผิวหน้าของผลิตภัณฑ์อีกรูปแบบหนึ่ง ซึ่งมีหลักการเตรียมสารละลายฟิล์มเหมือนกับการจุ่ม เหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะนำไปจุ่มในสารละลายฟิล์มได้อย่างทั่วถึง นอกจากนี้ยังนิยมใช้ในสตรอเบอร์รี่ และผักกาด พบว่าวิธีการใช้แปรงปิดสารละลายฟิล์มนี้จะช่วยลดการสูญเสียความชื้น (moisture loss) ได้ดีกว่าวิธีการจุ่มหรือห่อฟิล์ม (Han และ Aristippos, 2005)

2.5.2.3 การพ่น

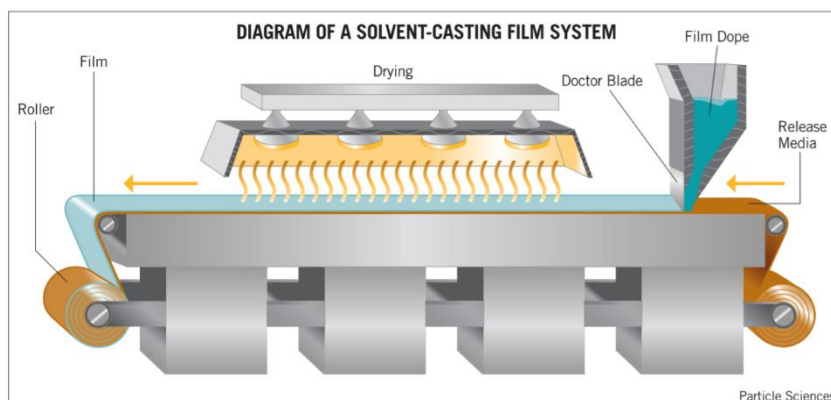
การพ่น หรือการฉีดสเปรย์ เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก ไม่สิ้นเปลืองสารละลายฟิล์ม โดยใช้กันทั่วไปในโรงงานอุตสาหกรรม แต่สารละลายฟิล์มที่ใช้จะต้องไม่มีความชื้นหนืดสูง เนื่องจากจะทำให้การฉีดพ่นได้ยากและก่อให้เกิดการอุดตัน วิธีการสเปรย์นี้สามารถควบคุมความหนาของแผ่นฟิล์มเคลือบได้จากหัวฉีด โดยกำหนดขนาดหยดของสารละลายที่พ่นออกมา ในปัจจุบันในโรงงานอุตสาหกรรมใช้ขนาดประมาณ 20

ไมโครเมตรต่อหยด (Shinji และคณะ, 1994) ลักษณะของแผ่นฟิล์มที่ได้อาจแตกต่างกัน จาก อัตราการไหลของสารละลายฟิล์ม ความชื้นของสภาพอากาศภายนอก ระยะเวลาที่ ฟ้น จำนวนครั้งที่ฟ้น และอุณหภูมิที่รอให้ฟิล์มเคลือบแห้ง เป็นต้น

การศึกษาของ Synowiec และคณะ (2014) ได้ทำการสกัดสารจากพืชคือ ใบ โหระพามาผสมเข้ากับฟิล์มชีวภาพที่มาจากพอลิแซ็กคาไรด์ คือพุลลูแลน เพื่อนำมา ประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาผลแอปเปิ้ล เตรียมสารละลายฟิล์มโดยการนำพุลลูแลนมา ปริมาณ 7.5 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมกลีเซอรอลที่ทำหน้าที่เป็นพลาสติกไซเซอ์ลงไป 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นเติมสารสกัดจากใบโหระพาปริมาณ 12 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร เมื่อผสมสารละลายเข้ากันดีแล้วก็บรรจุสารละลายฟิล์มลงใน เครื่องพ่นสีเค้ก (airbrush cake decorating device) ที่มีขนาดหัวฉีด 0.5 มิลลิเมตร ฟ้นลงบนผิวของแอปเปิ้ลทั่วทั้งลูก จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทิ้งให้แห้งแล้วนำแอปเปิ้ลไป เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดจากใบโหระพาส่งผลต่อ ความหนาของแผ่นฟิล์มพุลลูแลน ในส่วนของการยับยั้งจุลินทรีย์พบว่า แผ่นฟิล์มชีวภาพ ประยุกต์นี้มีผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี แต่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Rhizopus arrhizus* ได้ดีที่ความเข้มข้น 24 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตร ทั้งยังช่วยชะลอการ เปลี่ยนแปลงของสีผลแอปเปิ้ล และลดการสูญหายของน้ำหนักผลไม้

2.5.2.4 การหล่อในสารละลาย

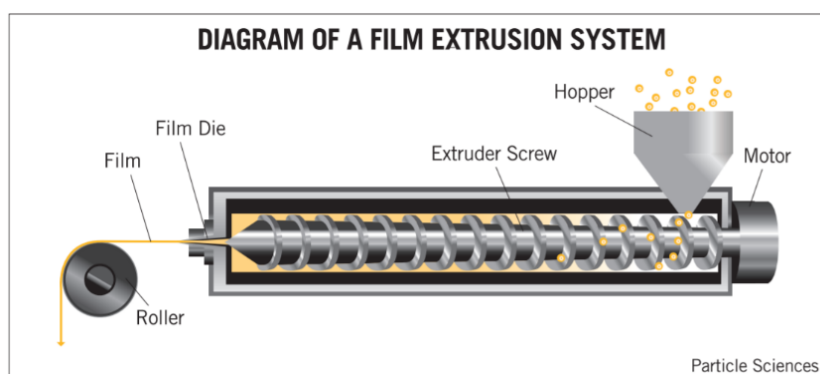
การหล่อในสารละลาย (solvent casting) โดยสามารถเตรียมได้ในรูปแบบของ แผ่นเรียบ (flat sheet) และแบบท่อ (hollow sheet) เป็นวิธีที่ใช้มากที่สุดสำหรับการ เตรียมฟิล์มบริโกลด์ชนิดไฮโดรคอลลอยด์ โดยนำผงสารก่อฟิล์ม และส่วนประกอบอื่น ในฟิล์มมาละลายในตัวทำละลายที่สามารถระเหยได้ เช่น น้ำ หรือ เอทานอล (Siemann, 2005) จากนั้นจะปล่อยให้แผ่นฟิล์มไหลไปตามรางแล้วทำให้แห้งด้วยความ ร้อน เช่น ผ่านเตาอบ ผ่านเครื่องอบลมร้อน (convectio chamber) เพื่อจะกำจัดตัวทำ ละลายออกไป จากนั้นแผ่นฟิล์มที่ได้ก็จะถูกม้วนพับ หรือตัดเพื่อเก็บรักษาต่อไป วิธีหล่อ ละลายนี้เหมาะสำหรับพอลิเมอร์ที่ทนความร้อนได้ เนื่องจากความร้อนเป็นสิ่งจำเป็นใน ขั้นตอนการทำให้แผ่นฟิล์มแห้ง (Films, 2010) ดังแสดงในรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 แสดงระบบการทำงานของวิธีหล่อละลายของแผ่นฟิล์ม (Films, 2010)

2.5.2.5 การอัดผ่านเกลียว

การอัดผ่านเกลียว (extrusion) เป็นวิธีการทางเลือกใหม่สำหรับการผลิตฟิล์มบริโภคได้ กระบวนการอัดผ่านเกลียวใช้หลักการใช้ความร้อนจนสารก่อฟิล์มและองค์ประกอบอื่นละลายและผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องอัดเกลียว (extruder screw) จากนั้นจะถูกล่อยผ่านเครื่องที่สามารถปรับแต่งลักษณะของฟิล์มให้เป็นไปตามรูปแบบ และมีความหนาตามต้องการได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.18 (Films, 2010) ซึ่งวิธีการนี้ไม่จำเป็นต้องละลายสารก่อฟิล์มด้วยสารละลายละลาย จึงไม่มีขั้นตอนสำหรับการระเหยตัวทำละลาย แต่มีข้อเสียคือสารก่อฟิล์มที่นำมาใช้ต้องทนความร้อนได้สูง และต้องใช้พลาสติกไซเซอร์เป็นจำนวนมากประมาณ 10-60% โดยน้ำหนัก (DesMarais, 1982)



รูปที่ 2.18 แสดงระบบการทำงานของวิธีอัดผ่านเกลียวของแผ่นฟิล์ม (Films, 2010)

2.6 บรรจุภัณฑ์แบบเอกทิฟ

บรรจุภัณฑ์เอกทิฟ (active packaging) เป็นบรรจุภัณฑ์ที่มีการตัดแปลง หรือการเติมแต่ง สารบางชนิด เพื่อจุดประสงค์ในการยืดอายุการเก็บรักษา คงคุณภาพ และความปลอดภัยของ ผลิตภัณฑ์ให้นานยิ่งขึ้น (Han, 2003) บรรจุภัณฑ์เอกทิฟอาจจะมีปฏิสัมพันธ์กับผลิตภัณฑ์โดยตรงหรือ โดยอ้อม สามารถจัดกลุ่มเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ระบบดูดซับ ระบบปลดปล่อย และระบบอื่นๆ (Lee และคณะ, 2008)

ระบบดูดซับ (Absorbing system) เป็นระบบที่ฟิล์มหรือบรรจุภัณฑ์ดึงเอาแก๊สที่ไม่พึง ประสงค์ เช่น ออกซิเจน คาร์บอนไดออกไซด์ เอทิลีน (ethylene) หรือสารประเภทอื่น เช่น ความชื้น ออกจากระบบในบรรจุภัณฑ์ ซึ่งทำให้เกิดภาวะที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Lee และคณะ, 2008)

ระบบปลดปล่อย (Release system) เป็นเทคโนโลยีของบรรจุภัณฑ์ที่สามารถเติม หรือ ปล่อยสารที่ต้องการ หรือสารประกอบเอกทิฟ เช่น สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ สารต้านอนุมูล อิศระ (antioxidant) เอทานอล เป็นต้น เพื่อที่จะป้องกันและควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารใน ระหว่างการเก็บรักษา (Lee และคณะ, 2008)

2.6.1 บรรจุภัณฑ์ฟิล์มยับยั้งจุลินทรีย์

บรรจุภัณฑ์ฟิล์มยับยั้งจุลินทรีย์ เป็นบรรจุภัณฑ์เอกทิฟประเภทหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญ หรือฆ่าจุลินทรีย์ได้ (antimicrobial properties) บรรจุภัณฑ์สามารถ แบ่งองค์ประกอบออกเป็น 3 ส่วนหลัก ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ ส่วนของช่องว่างระหว่างผลิตภัณฑ์กับ บรรจุภัณฑ์ และ ส่วนของบรรจุภัณฑ์ ซึ่งอาจมีการเติมสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลงไป ใน ส่วนใดส่วนหนึ่งขององค์ประกอบของบรรจุภัณฑ์ (Han, 2003) สามารถพบบรรจุภัณฑ์แบบ ฟิล์มยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายรูปแบบ ได้แก่

1. การผสม (Incorporation) สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลงไปในพอลิเมอร์ ของฟิล์มโดยตรง สารที่เติมอาจจะเป็นสารระเหยหรือไม่ระเหยก็ได้ โดยทำการ ละลายผสมลงไปพอลิเมอร์หรือ เติมเข้าไปภายหลังในส่วนของสารละลายพอลิเมอร์ สำหรับสารยับยั้งที่ไม่ใช่สารระเหย การนำไปใช้ควรต้องสัมผัสผิวหน้า ของผลิตภัณฑ์โดยตรง เพื่อทำให้เกิดการซึมผ่านสารไปสู่ผลิตภัณฑ์ (Ouattara และคณะ, 2000) แต่ไม่จำเป็นสำหรับสารยับยั้งประเภทสารระเหย
2. การเคลือบ (Coating) สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลงไปที่ผิวหน้าของพอลิเมอร์ เทคนิคชนิดนี้เหมาะสำหรับสารยับยั้งการเจริญที่มีความไวต่ออุณหภูมิสูง

หรือความร้อน เช่น เอนไซม์ จึงไม่สามารถใช้วิธีการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มแบบใช้ความร้อนทั่วไปได้ (Guillard และคณะ, 2009)

3. การตรึง (Immobilization) เป็นการใช้อนุภาคเป็นตัวตรึงสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เอาไว้ในพอลิเมอร์ รูปแบบของฟิล์มชนิดนี้สามารถเกิดขึ้นเมื่อทั้งตัวสารและพอลิเมอร์มีหมู่ฟังก์ชัน (functional group) โดยจะทำพันธะกันชนิดไอออนิก หรือ โควาเลนต์ (Kaewprachu และ Rawdkuen, 2016)
4. การใช้พอลิเมอร์เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยตัวเอง ส่วนใหญ่จะเป็นพอลิเมอร์ที่มีประจุบวก เช่น โคโทซาน และ พอลิแอลไลซีน (poly-L-lysine) เมื่อนำมาทำเป็นแผ่นฟิล์มตัวประจุจากแผ่นฟิล์มทำปฏิกิริยากับประจุลบที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้เกิดการรั่วซึมขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกมาภายนอก ทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Appendini และ Hotchkiss, 2002)

2.6.2 สารยับยั้งจุลินทรีย์

สารยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ อาจเป็นได้ทั้งสารเคมีและสารที่มาจากธรรมชาติ ที่สามารถทำหน้าที่ทำลาย หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคหันมานิยมสินค้าที่มาจากธรรมชาติมากยิ่งขึ้น ทำให้สารสกัดจากพืชได้รับความนิยมนำมาทำเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่าสารเคมีในอุตสาหกรรมอาหาร (Gniewosz และคณะ, 2014)

น้ำมันหอมระเหย (essential oils) เป็นสารสกัดจากพืชที่มีสมบัติทางชีวภาพ หลายประการเช่น เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และรา เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันน้ำมันหอมระเหยกำลังเป็นที่นิยมในภาคอุตสาหกรรมทั้งอาหารและยา เนื่องจากมีความปลอดภัย และเป็นสารสกัดที่มาจากธรรมชาติ (Baratta และคณะ, 1998) มีการนำมาใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไม่เพียงแต่การใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพ (bio-preservative) ในอาหารเท่านั้น ยังมีการนำมาใช้เป็นสารควบคุมโรคในพืช และใช้เป็นยารักษาโรคในมนุษย์ เนื่องจากแบคทีเรียและราก่อให้เกิดความเสียหายทางด้านสุขภาพ และเศรษฐกิจ จึงมีความต้องการหาสารจากธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพและราคาไม่แพงสำหรับการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (Damien Dorman และคณะ, 1995)

จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร เป็นปัญหาที่อยู่คู่กับอาหารและก่อให้เกิดความเสียหายมาอย่างยาวนาน จึงทำให้มนุษย์ต้องคิดค้นแนวทางการป้องกันและแก้ไขปัญหาด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะถนอมรักษาอาหารจากการเน่าเสีย เช่น การทำให้แห้ง การดอง การหมัก การทำให้

เค็ม (salting) การแช่แข็ง เป็นต้น (Logue และคณะ, 2017) ตัวอย่างจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่สำคัญ

1. แซลโมเนลลา (*Salmonella*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่ง (bacilli) อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ในปัจจุบันมีมากถึง 2600 ซีโรวาร์ (serovars) *S. Enteritidis* และ *S. typhimurium* เป็น 2 ซีโรไทป์ (serotype) ที่พบเกี่ยวข้องกับการก่อโรคในมนุษย์มากที่สุด โดยคิดเป็นร้อยละ 15.1 และ 12.8 ของซีโรวาร์ทั้งหมด ตามลำดับ (CDC, 2013) โดยซาลโมเนลลาสามารถจัดจำแนกออกเป็นชนิดที่ก่อให้เกิดไข้ไทฟอยด์ และไม่ก่อให้เกิดไข้ไทฟอยด์ โดยที่ซาลโมเนลลาเป็นปัญหาหลักเกี่ยวกับอาหาร เนื่องจากก่อให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินอาหาร 93.8 ล้านคน และมีผู้เสียชีวิตประมาณ 155,000 คน ในแต่ละปี (Majowicz และคณะ, 2010)

จากการรายงานของ Threlfall (2000) พบว่า *S. typhimurium* DT104 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด ได้แก่ แอมพิซิลิน คลอแรมเฟนิคอล เทตราไซคลิน สเตรปโทมัยซิน และ ซัลโฟนาไมด์ ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์เป็นอย่างมากหากเกิดการติดเชื้อจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อเข้าไป

2. อีโคไล (*Escherichia coli*) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีลักษณะเป็นแท่งสั้น สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีอากาศ เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น (Clermont และคณะ, 2013) สามารถจัดกลุ่มตามการก่อโรคออกเป็นหลักๆ 5 กลุ่ม คือ

1. เอนเทอโรฮีโมราจิกอีโคไล (Enterohemorrhagic *E. coli*; EHEC) เป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดอาการเม็ดเลือดแดงแตก ทำให้มีลักษณะการถ่ายเป็นเลือด และก่อให้เกิดการไตวายเฉียบพลันได้ ซึ่ง *E. coli* ที่ก่อให้เกิดอาการแบบนี้เป็นที่รู้จักกันดีคือ สายพันธุ์ O157:H7 ซึ่งก่อให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์ในทั่วโลก (Doyle และ Buchanan, 2012) ซึ่งมีปริมาณของเชื้อที่จะก่อให้เกิดอาการของโรคต่ำ (ต่ำกว่า 100 เซลล์) และยังสามารถผลิตสารพิษซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์
2. เอนเทอโรทอกซิเจนิกอีโคไล (Enterotoxigenic *E. coli*; ETEC) เป็นอีโคไลที่สามารถผลิตสารพิษที่ทนต่อความร้อน (heat-stable toxins; ST) และไม่ทนต่อความร้อน (heat-labile toxins; LT) ซึ่งเป็นพิษต่อ

ระบบทางเดินอาหาร ก่อให้เกิดโรคท้องเสียที่เรียกว่า traveler's diarrhea ในทุกปี ETEC จะทำให้เกิดการเสียชีวิตในเด็กอายุต่ำกว่า 5 ปี ประมาณ 380,000 คน (Steffen และคณะ, 2005)

3. เอนเทอโรพาโทเจนิคอีโคไล (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC) เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดอาการท้องร่วงอย่างรุนแรงในทารก สร้างสารพิษคล้ายสารพิษชิกกา (Shiga like toxin) จะพบการก่อโรคบ่อยในเด็กและทารก (Donnenberg และ Finlay, 2013)
 4. เอนเทอโรเอกกริเกทีฟอีโคไล (Enterohemorrhagic *E. coli*, EAEC) สามารถเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) สามารถก่อไบโอฟิล์มได้ (biofilm) ทำให้มีอาการถ่ายเป็นน้ำ หรือเป็นมูก สามารถก่อให้เกิดโรคอุจจาระเรื้อรังในเด็กทารกได้ (Sobieszczańska และคณะ, 2007)
 5. เอนเทอโรอินเวซิฟอีโคไล (Enteroinvasive *E. coli*, EIEC) เป็นสายพันธุ์ก่อโรคที่ทำให้มีอาการเหมือนบิดจาก *Shigella* spp. สามารถเข้าสู่เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ได้ ทำให้เกิดอาการท้องเสียอย่างรุนแรง บางสายพันธุ์ของ EIEC มีความใกล้เคียงกับซิเจลลาทำให้การตรวจวินิจฉัยโรคยาก เนื่องจากทำให้เกิดความสับสน (Doyle และ Buchanan, 2012)
3. สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) อยู่ในวงศ์ *Micrococcaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ไม่มีการสร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีอากาศ เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคสำคัญชนิดหนึ่งในมนุษย์ สามารถผลิตสารพิษได้ เป็นสารพิษในกลุ่มเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) คือมีสมบัติในการทนความร้อน จัดเป็นเชื้อก่อโรคที่สามารถทำให้เกิดอาการได้หลายรูปแบบ เช่น เยื่อหูหัวใจอักเสบ (endocarditis) ภาวะเลือดมีแบคทีเรีย (bacteremia) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ อาการช็อกซิกซ็อก (toxic shock syndrome) โรคอาหารเป็นพิษ (Tong และคณะ, 2015) จากการรายงานของ Chaibenjawong และ Foster (2011) พบว่า *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงกว้าง คือสามารถทนความแห้งแล้งได้ดี เจริญบนผิวหนัง หรือเสื้อผ้าที่แห้งได้ ทนต่อช่วงอุณหภูมิ ความเค็ม และความเป็นกรดเบสได้กว้าง ที่สำคัญคือทนต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด

4. บาซิลลัส (*Bacillus*) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นแท่งยาว (rod shape) จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลล่า สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ปัญหาที่สำคัญของบาซิลลัสคือ สามารถผลิตสปอร์ได้ ซึ่งสปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้มีความทนทานความร้อน ความแห้งแล้ง และสารเคมี ซึ่งการกำจัดให้หมดเป็นไปได้ยาก และอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค จึงเป็นปัญหาที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหาร (Logue และคณะ, 2017) *Bacillus subtilis*, *B. cerues* และ *B. licheniformis* เป็นตัวการสำคัญในการทำให้เกิดการเน่าเสียในขนมปัง (rope spoilage) โดยเกิดเป็นเมือกในเนื้อขนมปัง ซึ่งส่วนใหญ่มักพบว่ามีสปอร์ปนเปื้อนของสปอร์บาซิลลัสมาตั้งแต่ในวัตถุดิบ จึงมีการแก้ไขโดยการใส่สารเติมแต่งที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลงไปในการแทน (Katina และคณะ, 2002)
5. รา (moulds) เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเจริญอยู่ในอาหารหลากหลายประเภท ทั้งที่มีปริมาณน้ำสูง และที่มีปริมาณน้ำน้อย เป็นปัญหาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารไปในทิศทางที่ไม่พึงประสงค์ เช่น สีและกลิ่นผิดเพี้ยน สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยอาหารได้หลายชนิด ทำให้เกิดการเน่าเสีย และที่สำคัญคือ ราบางชนิดสามารถสร้างสารพิษ (mycotoxins) ที่เป็นอันตรายแก่มนุษย์ได้ (Filtenborg และคณะ, 1996) โดยที่สารพิษเหล่านี้จัดเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ สารพิษที่เป็นปัญหาสำคัญแก่มนุษย์ได้แก่
1. อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) เป็นสารพิษที่ผลิตได้จากราในกลุ่ม *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* เป็นหลัก เป็นสารพิษที่มี 4 ชนิดย่อย (Filtenborg และคณะ, 1996) ได้แก่ B1 B2 G1 และ G2 แต่ชนิดที่เป็นที่รู้จักมากที่สุดคือ อะฟลาทอกซิน B1 นอกจากนี้ยังมี อะฟลาทอกซิน M ที่พบในน้ำนมสัตว์ที่เกิดจากที่สัตว์กินอาหารปนเปื้อนอะฟลาทอกซินชนิด B เข้าไป เป็นสารพิษที่ไม่ละลายน้ำ ทนความร้อนได้สูง สามารถทำลายได้ด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่สุขภาพอย่างเฉียบพลัน แต่จะส่งผลในระยะยาว เมื่อเกิดการสะสมในปริมาณมากต่อให้เกิดโรคมะเร็งตับ (Goldblatt, 2012)
 2. โอคราทอกซิน (Ochratoxin) เป็นสารพิษที่ผลิตจากราได้หลากหลายสกุล เช่น *Petromyces alliaceus*, *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraseus* และ *A. niger* เป็นต้น แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

คือ ชนิด A และ B โดยในธรรมชาติมักพบโอคราทอกซินเอามากกว่า (Filtenborg และคณะ, 1996) พบการรายงานของสารพิษชนิดนี้อยู่ในเกือบทุกกลุ่มของอาหาร ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์จากพืชหรือสัตว์ เป็นสารที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์โดยเป็นพิษต่อไต และสารก่อมะเร็งที่มีฤทธิ์รุนแรง (Abarca และคณะ, 1994)

ตารางที่ 2.3 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร กลุ่มอาการเมื่อเกิดการติดเชื้อ ชนิดของอาหาร และผลิตภัณฑ์ที่พบการปนเปื้อน

จุลินทรีย์	อาการ, โรค	ชนิดของอาหารและผลิตภัณฑ์
<i>Salmonella</i>	กระเพาะอาหารและลำไส้ อักเสบ ถ่ายเป็นน้ำ ไข้ อาเจียน เจ็บในช่องท้อง	เนื้อหมู เนื้อไก่ สัตว์ปีก วัว กุ้ง หอย ฯลฯ
EHEC	กระเพาะอาหารและลำไส้ อักเสบ ลำไส้ใหญ่อักเสบมีเลือดออก (hemorrhagic colitis) อาการเม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic uremic syndrome) ภาวะเกร็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia purpura)	ผลิตภัณฑ์เนื้อ
ETEC	โรคท้องร่วงในนักเดินทาง ไข้ คลื่นไส้ อาเจียน	เนื้อวัว เนื้อหมู สัตว์ปีก กุ้ง หอย
EPEC	ท้องร่วง	เนื้อวัว เนื้อหมู
EAEC	ท้องร่วง ไข้ ถ่ายเป็นน้ำ ถ่ายเป็นมูก	ชีส นมดิบ
EIEC	โรคบิด (dysentery) ถ่ายมีมูก เลือด ท้องร่วง มีไข้ อาการหนาวสั่น เจ็บในช่องท้อง	เนื้อวัว นมดิบ
<i>Staphylococcus aureus</i>	ติดเชื้อที่เนื้อเยื่อ อาการช็อค เหตุพิษ โรคติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ	นม หมู ผลิตภัณฑ์จากหมู วัว ควาย
<i>Bacillus</i>	คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง	อาหารกระป๋อง อาหารหมักดอง ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

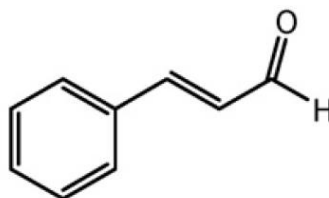
<i>Aspergillus flavus</i>	เป็นพิษต่อตับ มะเร็งตับ	ธัญพืช ข้าวโพด สมุนไพร ของแห้ง ฯลฯ
<i>Aspergillus ochraceus</i>	พิษต่อตับ และไต	ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด กาแฟ เบียร์ โกโก้ ถั่ว ฯลฯ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Logue และคณะ (2017), Filtenborg และคณะ (1996)

2.7 ซินนามาลดีไฮด์

ซินนามอน หรืออบเชย เป็นเครื่องเทศชนิดหนึ่งที่ได้จากพืชในสกุล *Cinnamomum* สปีชีส์ที่เป็นที่รู้จักทั่วไปได้แก่ *C. cassia* (อบเชยจีน) และ *C. verum* (*C. zeylanicum*, อบเชยแท้) โดยที่ทั้งสองสายพันธุ์เป็นแหล่งผลิตเปลือก และน้ำมันอบเชยเป็นที่สินค้าใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งมีการใช้ออบเชยและสารสกัดจากอบเชยมาอย่างยาวนานโดยไม่มีผลข้างเคียง ไม่ว่าจะเป็นการใช้เป็นเครื่องหอมในอียิปต์ หลักฐานทางประวัติศาสตร์ของจีนที่ใช้ออบเชยเป็นเครื่องปรุงและน้ำมันนวด (Shreaz และคณะ, 2016) มีรายงานทางวิชาการหลายฉบับพบว่า ในน้ำมันอบเชยมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหลัก 2 สาร ได้แก่ ยูจีนอล (eugenol) เป็นสารส่วนมากที่พบ และซินนามาลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) (Carvalho และคณะ, 2016)

ซินนามาลดีไฮด์ หรืออาจเรียกว่า ซินนามอล, cassia aldehyde, 3-phenenal-2-propenal, cinnamic aldehyde และอื่นๆ เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโครงสร้างคือ $C_6H_5CH=CHCHO$ ดังแสดงในรูปที่ 2.19 เป็นสารประกอบประเภทแอลดีไฮด์ สามารถสกัดได้จากธรรมชาติ และสังเคราะห์ขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการ เป็นสารสีเหลืองใส คล้ายน้ำมัน มีกลิ่นอบเชย มีรสหวาน ละลายน้ำได้ไม่ดี มีมวลโมเลกุล 132.15 กรัมต่อโมล จุดเยือกแข็ง -7.5 องศาเซลเซียส จุดเดือดเท่ากับ 246.0 องศาเซลเซียสที่ 760 มิลลิเมตรปรอท (Weast และคณะ, 1988)



รูปที่ 2.19 โครงสร้างซินนามาลดีไฮด์ (Shreaz และคณะ, 2016)

การนำมาประยุกต์ใช้ ซินนามาลดีไฮด์จัดเป็นสารที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe) สามารถนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารได้ (number 2286) ตามการยอมรับจากองค์กร FEMA USA (The flavor and extract manufacturers Association of USA) เช่นเดียวกันกับ

องค์กรอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาที่ยอมรับการนำซินนามาลดีไฮด์มาใช้กับอาหาร (section number 121.101) (Association, 1965) มีการนำสารไปประยุกต์ใช้ในหลายบทบาท เนื่องจากมีสมบัติที่หลากหลาย เช่น สมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นปัญหาด้านอาหารได้ในวงกว้าง เป็นยาฆ่าแมลง มีคุณสมบัติโดดเด่นในการต้านเชื้อรา สารต้านมะเร็ง สารต้านการอักเสบเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน เป็นสารกระตุ้นในเซลล์เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptotic cell death) สารยับยั้งการเจริญของก้อนเนื้ออก (anti-tumor growth) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสามารถนำมาใช้เป็นสารลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวาน และลดปริมาณคลอเรสเตอรอลในซีรัมจากเลือดหนู เป็นต้น (Shreaz และคณะ, 2016) ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ซินนามาลดีไฮด์ เช่น นำมาใช้เพิ่มสีกลิ่น และรสชาติในอาหาร ขนม เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมและทางการแพทย์ หรือนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง น้ำหอม และการนำมาเป็นสารเติมแต่งในบรรจุภัณฑ์เอกทิฟ เป็นต้น

ตัวอย่างการนำซินนามาลดีไฮด์มาใช้ในบรรจุภัณฑ์ Balaguer และคณะ (2013) นำซินนามาลดีไฮด์มาผสมกับแผ่นฟิล์มจากเกลียดิน (glutadin film) ที่ความเข้มข้น 1.5, 3 และ 5% โดยน้ำหนัก เพื่อทดสอบสมบัติการยับยั้งการเจริญของ *Penicillium expansum* และ *Aspergillus niger* ที่เป็นจุลินทรีย์ในอาหารที่สำคัญ เมื่อทดสอบบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า แผ่นฟิล์มเกลียดินผสมซินนามาลดีไฮด์สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้หมดที่ความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนัก ต่อมานำแผ่นขนมปังและแผ่นชีสมาเติมสปอร์ของราทดสอบลงไป จากนั้นห่อด้วยแผ่นฟิล์มเอกทิฟ แล้วติดตามการเจริญของรา พบว่าฟิล์มเกลียดินผสมสารความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักสามารถยืดอายุการเก็บรักษาขนมปังและชีสได้ยาวนานขึ้น พบการเจริญของราบนขนมปังในวันที่ 27 หลังจากทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ในขณะที่ขนมปังที่ไม่ได้บรรจุด้วยผลิตภัณฑ์เอกทิฟพบราเจริญในวันที่ 4 ในขณะที่เก็บแผ่นชีสไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบราเจริญในชุดทดสอบวันที่ 26 และวันที่ 16 สำหรับชุดควบคุมที่ไม่ได้ปิดด้วยฟิล์มเกลียดินผสมซินนามาลดีไฮด์

Carvalho และคณะ (2016) ศึกษาการนำฟิล์มเอกทิฟจากโคโทซานผสมซินนามาลดีไฮด์ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีกลีเซอรอลเป็นพลาทิสไซเซอร์ปริมาณ 1.5% โดยปริมาตร มาเป็นสารละลายฟิล์มเคลือบภายนอกชิ้นผลเมลอนที่ตัดเป็นขนาด 30 มิลลิเมตร หรือประมาณ 50 กรัม โดยนำมาจุ่มลงในสารละลายฟิล์มเป็นเวลา 2 นาที แล้วปล่อยให้แห้ง 2 นาที จากนั้นนำไปวางบนถาดแล้วปิดด้วยแผ่นฟิล์มพีวีซี แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน แล้วติดตามการเน่าเสียของชิ้นเมลอน พบว่าชิ้นเมลอนที่เคลือบด้วยแผ่นฟิล์มเอกทิฟสามารถคงความสด ความกรอบ สี

ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (soluble solid) ปริมาณวิตามินซีและแคโรทีนอยด์ทั้งหมดไว้ได้นานถึง 15 วัน ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม การเคลือบช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล ลดระดับของปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระ ทั้งยังช่วยลดอัตราการหายใจ (respiration rate) ของผลไม้ และเป็นตัวกั้นการแลกเปลี่ยนแก๊ส ทำให้ผลไม้ยังคงความสดไว้ได้ โดยที่ซินนามาลดีไฮด์ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) และต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ 2.4 ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ซินนามาลดีไฮด์ในแผ่นฟิล์มเอกทิกพีในการยับยั้งรา

(Van Long และคณะ, 2016)ประเภท/วิธีของฟิล์มเอกทิกพี	ความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์	วัสดุทดลอง	จุลินทรีย์เป้าหมาย
กระดาษเคลือบพาราฟินผสมน้ำมันสกัดจากพืช	2-8% โดยปริมาตร	มะเขือเทศราชินี อาหารเลี้ยงเชื้อ	<i>Alternaria alternata</i>
ฟิล์มไคโทซาน	0.5, 1.5, 3.0, 5.0% โดยปริมาตร	อาหารเลี้ยงเชื้อ	<i>Alternaria solani</i>
ฟิล์มจากพอลิเมอร์แบบร่างแหเกลียดิน (crosslinked gliadin film)	0.5, 1.5, 3.0, 5.0% โดยปริมาตร	ขนมปัง	<i>Alternaria solani</i>
พอลิโพรพิลีน (polypropylene) ฟิล์มเคลือบด้วยน้ำมันสกัดจากพืช	2, 4% โดยปริมาตร	อาหารเลี้ยงเชื้อ	<i>Aspergillus flavus</i>
ฟิล์มจากพอลิเมอร์แบบร่างแหเกลียดิน	1.5, 3.0, 5.0% โดยปริมาตร	ขนมปัง ซีสต์	<i>Aspergillus niger</i>
กระดาษเคลือบโปรตีนถั่วเหลืองและแป้งตัดแปลง	10, 30, 60% โดยปริมาตร	อาหารเลี้ยงเชื้อ	<i>Botrytis cinerea</i>
ฟิล์มจากพอลิเมอร์แบบร่างแหเกลียดิน	1.5, 3.0, 5.0% โดยปริมาตร	ขนมปัง	<i>Collectotrichum acutatum</i>
ฟิล์มไคโทซาน	1.5, 3.0, 5.0% โดยปริมาตร	ปลาแห้ง ขนมปัง อาหารเลี้ยงเชื้อ	<i>Penicillium spp</i>

พอลิพรอฟีลีนฟิล์มเคลือบ ด้วยน้ำมันสกัดจากพืช	2, 4% โดย ปริมาตร	อาหารเลี้ยงเชื้อ	<i>Penicillium roqueforti</i>
ฟิล์มเกลียดิน	1.5, 3.0, 5.0% โดยปริมาตร	ขนมปัง ซีสต์ อาหาร เลี้ยงเชื้อ	<i>Penicillium expansum</i>

ที่มา : ดัดแปลงจาก Balaguer และคณะ (2013), Van Long และคณะ (2016)

2.7.1 ข้อจำกัดในการใช้ซินนามาลดีไฮด์

ในแต่ละปีซินนามาลดีไฮด์ถูกนำมาบริโภคโดยผสมในอาหารประมาณ 180,000 กิโลกรัม โดยอยู่ในรูปของการใช้อบเชยหรือซินนามอน 39,000 กิโลกรัม และอีก 141,000 กิโลกรัมอยู่ในส่วนของสารเติมแต่งรสในอาหาร และมีแนวโน้มการใช้ซินนามาลดีไฮด์ผสมในอาหารเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ (Shreaz และคณะ, 2016) แม้ว่าซินนามาลดีไฮด์จะเป็นสารที่ได้รับ การยอมรับว่ามีความปลอดภัยและสามารถใช้ในอาหารได้ และยังเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำ โดยพบรายงานของ Gowder (2014) ที่ระบุว่า ปริมาณของสารเคมีที่ให้กับสัตว์ทดลองทั้งหมด เพียงครั้งเดียวแล้วทำให้กลุ่มของสัตว์ทดลองร้อยละ 50 ตายลง หรือ Lethal dose (LD₅₀) ของซินนามาลดีไฮด์ในหนูขาวและหนูตะเภาเท่ากับ 3.4 กรัมต่อกิโลกรัมเมื่อให้สารโดยการกิน (oral route) แต่ยังมีพบรายงานทางด้านความเป็นพิษของซินนามาลดีไฮด์ โดยจะมีผลแบบเฉียบพลันเมื่อสารสัมผัสกับตา ที่ผิวหนัง ระบบทางเดินหายใจ และอาจก่อให้เกิดการระคายเคืองในกระเพาะอาหารได้ โดยการสัมผัสกับซินนามาลดีไฮด์ที่ผิวหนังอาจก่อให้เกิดอาการเจ็บปวดเล็กน้อยที่ผิวหนัง อาการคัน เป็นรอยไหม้ (Endo และ Rees, 2006) มีรายงานผู้ป่วยมีอาการปากเป็นแผลร้อนใน (stomatitis) จากการเคี้ยวหมากฝรั่งที่มีส่วนผสมของซินนามาลดีไฮด์ (Isaac-Renton และคณะ, 2015) จึงทำให้ต้องมีการจำกัดปริมาณการเติมซินนามาลดีไฮด์ สูงสุดลงในอาหารแต่ละประเภท (Gowder, 2014) ได้แก่

ผักและผลไม้	6400 ppm
น้ำผลไม้	6400 ppm
ผลิตภัณฑ์อาหาร, ขนมอบ	3500 ppm
อาหารเข้าจากธัญพืช	2200 ppm
อาหารสำหรับเด็ก	2000 ppm
ของหวาน	2000 ppm
หมากฝรั่ง	1100 ppm

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

- เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan
- ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand และ รุ่น 25 Manometer บริษัท Dwyer Instrument, USA
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก รุ่น Spectrafuge บริษัท National Labnet, Co., Edison, USA
- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) บริษัท Alltech, USA
- คอลัมน์ Shodex Sugar SZ5532 (ขนาด 60x150 มิลลิเมตร) บริษัท Showa Denko, Japan
- เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น GC-2010 บริษัท Shimadzu, Japan
- คอลัมน์ STX-5MS (serial number 97137, ความยาว 30 เมตร และความหนา 0.25 ไมโครเมตร)
- ตู้แช่เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของบริษัท Sanyo, Japan
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Forma Scientific, USA
- ตู้อบความร้อนแห้ง รุ่น UE 600 บริษัท Memmert, Germany
- ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Memmert, Germany
- เครื่องระเหิดแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan
- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -80 องศาเซลเซียส บริษัท Forma Scientific, USA
- เครื่องชั่งหยاب รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland

- เครื่องวัดความหนา (Digital micrometer) รุ่น serie 293 บริษัท Mitutoyo, Japan
- เครื่องวัดสี (Digital Chromameter) รุ่น CR-300 บริษัท Minolta Camera Corporation, Japan
- กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิดฟิวอิมิชชันและอุปกรณ์วิเคราะห์ธาตุ (Field Emission Scanning Electron Microscope and Energy Dispersive X-Ray Spectrometer: FE-SEM-EDS) รุ่น JSM-7610F และ X-MaxN 20 บริษัท JEOL, Japan
- เครื่องวัดค่าการซึมผ่านออกซิเจน (oxygen transmission rate) รุ่น 8500 บริษัท Illinois, USA
- กระจกบ่มเหวี่ยง บริษัท NALGENE, USA
- ไมโครปิเปตต์ รุ่น P20, P100, P200, P1000 และ P5000 บริษัท Gilson, France
- ปิเปตต์ทึบ ขนาด 1-200 ไมโครลิตร, 1 ml, 5 ml และ 10 ml บริษัท Axygen Scientific, USA
- หลอด eppendoff ขนาด 1.5 ml บริษัท Axygen Scientific, USA
- กระจกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท นิโปร จำกัด, ประเทศไทย
- หัวกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาด 0.20 ไมครอน รุ่น SF-W13 บริษัท Gat Asia, Ltd., Hongkong
- กระดาษกรอง Whatman บริษัท General Electric, China
- ก้านสำลี บริษัท Thai gauze, ประเทศไทย
- ที่เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ (cork borer) เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร
- แท่งแก้วเลี้ยงเชื้อ
- โถดูดความชื้น (dessicator)
- ภาชนะฟิล์มอะคริลิก
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

3.2 เคมีภัณฑ์

- สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Biospringer, France
- สารสกัดจากข้าวมอลต์ (malt extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
- แบคโตเพปโตน (bactopeptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth บริษัท Difco Laboratories, USA
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth บริษัท Difco Laboratories, USA
- สีนดิเคเตอร์รีซาซูริน
- กลูโคส บริษัท Merck, Germany
- ซูโครส (น้ำตาลทรายขาว) บริษัท น้ำตาลมิตรผล, ประเทศไทย

- ซินนามาลดีไฮด์ (purity >95%, Food Grade, CAS Number: 104-55-2) บริษัท Sigma Aldrich, USA
- พูลลูแลนมาตรฐาน (Pullulan from *Aureobasidium pullulans*, HPLC Grade, CAS Number: 9057-02-7) บริษัท Sigma Aldrich, USA
- เอนไซม์พูลลูลานเนส (Pullulanase microbial, CAS Number: 9075-68-7) บริษัท Sigma Aldrich, USA
- น้ำตาลมอลโทโทรโอส (purity >95%, HPLC Grade, CAS Number: 1109-28-0) บริษัท Sigma Aldrich, USA
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Fisher Chemical
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany
- แมกนีเซียมไนเตรทเฮกซะไฮเดรต (Magnesium Nitrate Hexahydrate, AR Grade) บริษัท Qrec, New Zealand
- เอทานอล บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., ประเทศไทย
- กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany
- สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)
- กรดอะซิติก บริษัท Scharlau chemie, Spain
- กรดซัลฟูริก บริษัท Merck, Germany
- โซเดียมอะซิเตต ไตรไฮเดรต (Sodium acetate trihydrate) บริษัท Merck, Germany
- อะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile) HPLC grade บริษัท RCI Labscan, ประเทศไทย
- น้ำ (HPLC grade) บริษัท Merck, Germany
- DMSO (Dimethyl sulfoxide) บริษัท Fisher Scientific, UK
- ทวีน (tween) 80
- กลีเซอรอล

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 ผลิตและสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

นำเชื้อ *A. pullulans* YPT6-14 มาเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์มอลต์ (Yeast Malt) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 วัน (Ravella และคณะ, 2010) จากนั้นนำลูปเชื้อจากจานอาหารใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์มอลต์ชนิดเหลว ที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรอยู่ในช่วงระหว่าง 0.8-1.0 (Duan และคณะ, 2008).

3.3.1.2 การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

นำหัวเชื้อในข้อ 3.2.1.1 ปริมาณ 10% โดยปริมาตรถ่ายลงใน Production medium หรือ ยีสต์มอลต์ดัดแปลง (ศุภิกา เอกเผ่าพันธุ์, 2558) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Ravella และคณะ, 2010) วิธีสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ดัดแปลงจาก Gniewosz และคณะ (2014) นำอาหารเลี้ยงมาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอลเย็น ด้วยปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที นำพอลิแซ็กคาไรด์เก็บไว้ในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส นำไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (lyophilizer) จากนั้นนำพอลิแซ็กคาไรด์มาเก็บไว้ในเดสลิเคเตอร์เพื่อให้ได้น้ำหนักคงที่และไว้สำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 ศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.2.1 ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่แห้งแล้วปริมาณ 10 กรัม บรรจุลงในหลอดฝาเกลียว เต็มกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรตามวิธีของ Kambourova และคณะ (2009) จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งอบไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ พักจนสารละลายเย็นลงจึงปรับความเป็น

กรดเบสของสารละลายให้ได้เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ 1 โมลาร์ และ 0.1 โมลาร์ นำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนสิ่งแปลกปลอมด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมากรองด้วยหัวกรองที่มีขนาดความกว้าง 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายที่ได้จากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยกรดไปวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วย Sugar column SZ5532 โดยใช้อะซีโทไนโตรล 80% โดยปริมาตรผสมกับน้ำกรด HPLC 20% เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตรเท่ากับ 20 ไมโครลิตร ประมวลผลโดยใช้เครื่องตรวจวัดสารด้วยหลักการกระเจิงแสง (evaporative light scattering detector) จากนั้นนำโครมาโทแกรมที่ได้จากเวลาที่สารละลายตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ (retention time) มาเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาตรฐาน

3.3.2.2 ศึกษาปฏิกิริยาของเอนไซม์พุลลูลานเนส

เตรียมละลายพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 และพุลลูแลนจาก *A. pullulans* มาตรฐาน 0.53 กรัมต่อลิตรด้วยน้ำ DI จากนั้นเจือจางเอนไซม์พุลลูลานเนส (Pullulanase microbial) ด้วยบัฟเฟอร์โซเดียมอะซีเตต 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบส 5.0 ที่ให้ได้เอนไซม์ความเข้มข้น 1 NPUN unit/ml ตามวิธีของ Lee และคณะ (1999) จากนั้นเตรียมสารทดสอบดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำหลอดทดลองไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (DNSA) ลงไปทุกหลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาหยุดปฏิกิริยาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมน้ำปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในทุกหลอด นำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Miller, 1959) จากนั้นนำค่าความขุ่นที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส เพื่อเปรียบเทียบกับพุลลูแลนมาตรฐาน

ตารางที่ 3.1 การเตรียมการทดลองสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์กับเอนไซม์พุลลูลานเนสเพื่อเปรียบเทียบกับพุลลูแลนมาตรฐาน

หลอดทดลอง	บัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)	สารละลายทดสอบ (มิลลิลิตร)	เอนไซม์พุลลูลานเนส (มิลลิลิตร)
Blank	0.50	-	-
ชุดควบคุมพอลิแซ็กคาไรด์	0.45	0.05 (EPS soln.)	-
ชุดทดสอบพอลิแซ็กคาไรด์	0.35	0.05 (EPS soln.)	0.10
ชุดควบคุมพุลลูแลน	0.45	0.05 (พุลลูแลน soln.)	-
ชุดทดสอบพุลลูแลน	0.35	0.05 (พุลลูแลน soln.)	0.10

หมายเหตุ : soln. หมายถึง สารละลาย; EPS หมายถึง เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

3.3.2.3 เปรียบเทียบชนิดของน้ำตาลรีดิวซ์กับสารมาตรฐาน

หลักการการทำงานของเอนไซม์พุลลูลานเนสซึ่งจะตัดบริเวณ α -1,6-ของพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งคาดว่าหากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เป็นพุลลูแลนเช่นเดียวกันก็ควรได้น้ำตาลมอลโตโทรโอสเป็นผลิตภัณฑ์ และให้พีคของกราฟโครมาโทแกรมที่เวลาเท่าหรือใกล้เคียงกัน หลังการเตรียมย่อยสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ และพุลลูแลนมาตรฐานด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสดังวิธีในตารางที่ 3.1 แล้วนำมาทำปฏิกิริยาในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 9 นาที เพื่อให้แน่ใจว่าเอนไซม์จะย่อยพอลิแซ็กคาไรด์จนหมด จากนั้นนำมาหยุดปฏิกิริยาในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที ปรับความเป็นกรดเบสของสารละลายให้ได้เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1 นำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนสิ่งแปลกปลอมที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วย Sugar column SZ5532 โดยใช้โซเซียโทไนไตรล์ 60% ผสมกับน้ำกรด HPLC 40% โดยปริมาตรเป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหลเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยฉีดสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 5 ไมโครลิตร ประมวลผล

โดยใช้เครื่องตรวจวัดสารด้วยหลักการกระเจิงแสง จากนั้นนำโครมาโทแกรมที่ได้จากเวลาที่สารละลายตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ มาเปรียบเทียบกับสารละลาย พูลลูแลนและน้ำตาลมอลโทไทรโอสมมาตรฐาน จากนั้นทดลองฉีดสารละลายตัวอย่างร่วมกับสารละลายมาตรฐานผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1:1 (ผลิตภัณฑ์จากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์: ผลิตภัณฑ์จากการย่อยพูลลูแลน: กลูโคส: มอลโทไทรโอส) เพื่อตรวจสอบการซ้อนทับกันของพีคโครมาโทแกรม

3.3.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของซินนามาลดีไฮด์

ทดสอบหาค่าต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ของซินนามาลดีไฮด์เชิงปริมาณ (Minimum Inhibition concentration: MIC) โดยแบ่งการทดสอบเป็นชุดการทดสอบของราและแบคทีเรีย

3.3.3.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

3.3.3.1.1 การเตรียมแบคทีเรียแขวนลอย

เลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* MSCU 0492 และ *Bacillus subtilis* ATCC 16643) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมูลเลอร์ฮินตัน (Mueller Hinton Agar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นใช้ลูปปราศจากเชื้อแตะบริเวณด้านบนโคโลนีเดียวที่ลักษณะแบบเดียวกัน 3-5 โคโลนีนำมาถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมูลเลอร์ฮินตัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรอยู่ในช่วงระหว่าง 0.8-0.13 หรือเท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarlane โดยปรับความขุ่นของแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ขั้นตอนนี้จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/ml จากนั้นเจือจางหัวเชื้อด้วยอาหารเหลวทีละ 10 เท่า จนได้ปริมาณเชื้อตั้งต้นเพื่อทดสอบเท่ากับ 10^6 CFU/ml เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมจานอาหาร 96 หลุม เท่ากับ 5×10^5 CFU/ml (Wiegand และคณะ, 2008)

3.3.3.1.2 การเตรียมสปอร์ราแขวนลอย

เลี้ยงราทดสอบ (*Aspergillus niger* MSCU 0361 และ *Aspergillus flavus* MSCU 0580) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (Potato Dextrose Agar)

ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจุดสبورลงในน้ำฟิสิโอ (Physio water) ตรวจนับสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยฮีโมไซโทมิเตอร์ (Hemocytometer) ให้ได้จำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^5 CFU/ml เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมจานอาหาร 96 หลุม เท่ากับ 5×10^4 CFU/ml (Wiegand และคณะ, 2008)

3.3.3.2 ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ทำการทดลองโดยทำเจือจาง 2 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ (2-fold dilution, Broth microdilution) ดัดแปลงจาก Wiegand และคณะ (2008) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 96 หลุม โดยใช้อาหารมูลเลอร์ฮินตันเหลวเจือจางซินนามาลดีไฮด์ ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0232-95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3.1.1 ลงไปในแต่ละหลุม จากนั้นเติมสีอินดิเคเตอร์รีซาชูรินเพื่อบ่งชี้การเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบโดยปริมาตรสุทธิคือ 100 ไมโครลิตร หากมีการเจริญของจุลินทรีย์สีอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนเป็นสีชมพู (Ramaprasad และคณะ, 2017) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และอ่านผลภายใน 16-24 ชั่วโมง โดยจุดควบคุมบวกคือหลุมที่มีซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยไม่ได้เติมแบคทีเรีย และจุดควบคุมลบคือที่มีแบคทีเรียโดยไม่เติมซินนามาลดีไฮด์ จากนั้นบันทึกค่าที่ต่ำสุดเป็นค่าที่สามารถยับยั้งการเจริญได้สำหรับหลุมที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย หรือหลุมที่ไม่พบการเปลี่ยนสีของสีอินดิเคเตอร์

3.3.3.3 ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญของรา

ทำการเจือจางซินนามาลดีไฮด์เช่นเดียวกับข้อ 3.3.3.2 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพีดีบี (PDB, Potato Dextrose Broth) ลงในจานอาหาร 96 หลุม จากนั้นนำสปอร์ราแขวนลอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.3.1.2 เติมน้ำลงในหลุมทดสอบแล้วจึงเติมสีอินดิเคเตอร์รีซาชูรินเพื่อเป็นตัวชี้วัดการเจริญของราโดยปริมาตรสุทธิคือ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและอ่านผลภายใน 48-72 ชั่วโมง โดยมีจุดควบคุมลบคือหลุมที่มีสปอร์ราโดยไม่เติมซินนามาลดีไฮด์ และจุดควบคุมบวกคือหลุมที่มีซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆโดยไม่เติมสปอร์รา บันทึกค่าที่ต่ำสุดเป็นค่าที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้

3.3.4 ศึกษาผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมกับซินนามาลดีไฮด์

3.3.4.1 เตรียมสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากข้อ 3.3.1.2 มาละลายในน้ำปราศจากเชื้อ ปริมาณ 7% ของน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร เดิมกลีเซอรอล 1.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงไป (Gniewosz และคณะ, 2014) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (magnetic stirrer) ประมาณ 6 ชั่วโมงหรือจนกว่าพอลิแซ็กคาไรด์จะละลายจนหมด จากนั้นเติมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 1.5, 3, 6, 12, 24, 30, 36, 42 และ 48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันประมาณ 2-3 ชั่วโมง

3.3.4.2 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลายฟิล์มประยุกต์

3.3.4.2.1 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย

การทดสอบดัดแปลงจาก Valgas และคณะ (2007) เตรียมเชื้อแบคทีเรีย ทดสอบแขวนลอยให้ได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml หรือ เท่ากับความขุ่นมาตรฐาน 0.5 McFarlane ตามข้อ 3.3.3.1.1 จากนั้นนำก้านสำลีปราศจากเชื้อ มาจุ่มแล้วป้ายบนผิวหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA (ปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร) จนทั่ว ทั้งไว้ประมาณ 15-20 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง นำที่เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cork borer) เบอร์ 4 มาเจาะลงบริเวณกลางจานอาหาร จากนั้นนำสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.4.1 มาเติมลงไปปริมาตร 160 ไมโครลิตร โดยมีสารละลายฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์เป็นชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และบันทึกผลโซนใส (clear zone) เป็นเซนติเมตรภายในเวลา 16-24 ชั่วโมง

3.3.4.2.2 ความสามารถในการยับยั้งรา

เตรียมสปอร์ราแขวนลอยให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^5 CFU/ml ตามข้อ 3.3.3.1.2 นำปิเปตมาดูดสารละลายสปอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นทำการเกลี่ยกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader) ตั้งทิ้งไว้ 15-20 นาทีหรือจนผิวหน้า

อาหารแห้ง จากนั้นทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.4.2.1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และบันทึกผลโซนไฮเป็นเซนติเมตรภายใน 48-72 ชั่วโมง

3.3.4.3 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลายซินนามาลดีไฮด์

เพื่อทำการเปรียบเทียบกับ การทดสอบในข้อ 3.3.4.2 ว่าผลของการผสมพอลิแซ็กคาไรด์ลงไปจะส่งผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ให้เพิ่มมากขึ้นหรือลดลง โดยนำซินนามาลดีไฮด์มาทำการเจือจางด้วยตัวทำละลายไม่มีขั้ว dimethyl sulfoxide (DMSO) (Al-Bayati และ Mohammed, 2009) ให้ได้ความเข้มข้น 1.5, 3, 6, 12, 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการทดสอบเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.4.2.1 และ 3.3.4.2.2 สำหรับแบคทีเรียและราตามลำดับ โดยมีสารตัวทำละลาย DMSO เป็นชุดการทดลองควบคุม และบันทึกผลค่าโซนไฮในหน่วยเซนติเมตร

3.3.5 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ประยุกต์

3.3.5.1 การขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม

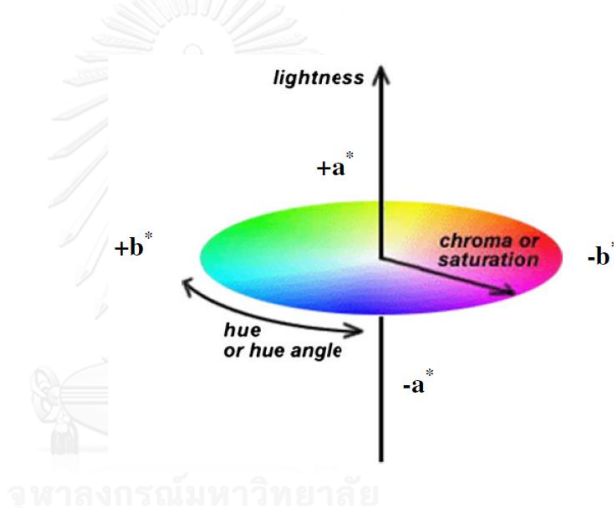
เตรียมสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนผสมเดียวกับข้อ 3.3.4.1 ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นเหมาะสมจากการทดสอบในข้อ 3.3.4.2 มาเทลงภาชนะขึ้นรูปอะคริลิก ขนาดความกว้าง 10 เซนติเมตร และความยาว 15 เซนติเมตร นำไปอบในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง เมื่อแผ่นฟิล์มแห้งจึงลอกแผ่นฟิล์มออกจากแบบ จากนั้นเก็บใส่ดีเคเตอร์ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 53% ด้วยสารละลายอิมัลชันตัวแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ไฮเดรต ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Xu และคณะ, 2001)

3.3.5.2 ศึกษาลักษณะทางกายภาพ

3.3.5.2.1 ลักษณะภายนอก นำฟิล์มมาศึกษาลักษณะบริเวณพื้นผิว และบริเวณตัดขวาง (cross section) โดยการหั่นตัวอย่างแผ่นฟิล์มในไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เห็นลักษณะฟิล์มประยุกต์ภายใน เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มชุดควบคุมที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิดพิวอิมิกซ์ชัน ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.5.2.2 วัดค่าความหนา นำแผ่นฟิล์มที่ได้ในข้อ 3.3.5.1 มาวัดค่าความหนา ด้วยเครื่องวัดความหนา (Thickness gauge) ที่จุดต่างๆบนแผ่นฟิล์ม แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.3.5.2.3 วัดค่าสีด้วยเครื่องโครมามิเตอร์วัดสี (Digital chromameter) ของภาควิชาเทคโนโลยีทางการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เนื่องจากใช้สารเติมแต่งซินนามาลดีไฮด์ที่มีสีเหลืองใสลงในแผ่นฟิล์ม จึงต้องทดสอบผลของสีที่เปลี่ยนแปลงไปของแผ่นฟิล์มประยุกต์เปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มชุดควบคุม โดยรายงานผลในรูปของตัวแปรตาม CIELAB color (International Commission on Illumination) ได้แก่ L^* คือค่าความสว่างถึงความมืด b^* คือค่าสีเหลืองถึงค่าสีน้ำเงิน a^* คือค่าสีแดงถึงค่าสีเขียว



รูปที่ 3.1 การแปรผลตามตัวแปร 3 แกนตามหลัก CIELAB color (Pathare และคณะ, 2013)

โดยวัดแผ่นฟิล์มผ่านฉากสีขาว ที่จุดต่างๆ บนแผ่นฟิล์มแล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำมาคำนวณค่าความแตกต่างของสี (ΔE) ตามสมการด้านล่าง (Pathare และคณะ, 2013)

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

เมื่อ ค่าสีมาตรฐานของฉากมีค่า L^* เท่ากับ 90.298 a^* เท่ากับ -1.332 และ b^* เท่ากับ 1.322

3.3.5.2.4 ค่าการซึมผ่านไอน้ำ ศึกษาอัตราการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์เทียบกับชุดควบคุม ที่ภาควิชาเทคโนโลยีการบรรจุและวัสดุ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยตัดแผ่นฟิล์มรูปวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตรมาปิดบริเวณภาชนะที่บรรจุซิลิกาเจลแล้วชั่งน้ำหนักชุดทดสอบทั้งหมด จากนั้นนำไปไว้ในตู้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% จากนั้นนำภาชนะมาชั่งน้ำหนักที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง นำค่าความสัมพัทธ์ระหว่างน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (ปริมาณน้ำที่ถูกดูดไว้โดยซิลิกาเจล) กับเวลามาหาค่าความชัน จากนั้นนำเข้าสู่สูตรคำนวณหาอัตราการซึมผ่านไอน้ำ (Water vapor transmission rate; WVTR) โดยคำนวณเทียบกับพื้นที่ของแผ่นฟิล์มต่อเวลา และสามารถคำนวณหาค่าการซึมผ่านไอน้ำได้ (Water vapor permeability; WVP) จากค่า WVTR ค่าความหนาของฟิล์ม และค่าคงที่ของความดันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% และค่าความแตกต่างของความชื้นสัมพัทธ์ระหว่างภายนอกและภายในภาชนะ ตามสมการด้านล่าง (McHugh และคณะ, 1993)

$$WVTR = \frac{\Delta w}{A\Delta t}$$

เมื่อ $\Delta w/\Delta t$ คือ ค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อหน่วยเวลาเมื่อเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น (กรัมต่อชั่วโมง)

A คือ พื้นที่ของแผ่นฟิล์มทดสอบ (ตารางเมตร)

$$WVP = WVTR \frac{x}{\Delta p}$$

เมื่อ x คือ ค่าความหนาของแผ่นฟิล์ม (มิลลิเมตร)

Δp คือ ค่าความแตกต่างของความชื้นสัมพัทธ์ระหว่างภายนอกและภายในภาชนะ (r_1 ความชื้นภายใน, r_2 ความชื้นภายนอกภาชนะ) คูณกับค่าคงที่ของความดันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75% มีค่าเท่ากับ 24.8 มิลลิเมตรปรอท

3.3.6 ติดตามปริมาณสารและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์มประยุกต์

3.3.6.1 วัดปริมาณซินนามาลดีไฮด์ในแผ่นฟิล์ม

ติดตามปริมาณซินนามาลดีไฮด์ที่เหลืออยู่ในแผ่นฟิล์มประยุกต์ ตั้งแต่วันแรกที่อบแผ่นฟิล์ม และติดตามทุกสัปดาห์ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 5 โดยนำแผ่นฟิล์มที่ได้มาตัดได้ขนาด 16 ตารางเซนติเมตร จากนั้นนำแผ่นฟิล์มไปละลายใน DMSO ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หรือจนกว่าจะเห็นแผ่นฟิล์มเป็นสีใสทั้งหมด นำสารละลายมากรองผ่านหัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของซินนามาลดีไฮด์ที่เหลือในแผ่นฟิล์มด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Ben Arfa และคณะ, 2007) ด้วยคอลัมน์ RTX-5MS ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นเฟสเคลื่อนที่ อุณหภูมิ 280 องศาเซลเซียส ฉีดสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 1 ไมโครลิตร ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณสารเทียบกับกราฟซินนามาลดีไฮด์มาตรฐาน และรายงานเป็นร้อยละของซินนามาลดีไฮด์ที่เหลืออยู่ในแผ่นฟิล์ม และร้อยละของสารที่หายไป

3.3.6.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์

การทดสอบประสิทธิภาพของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ทำการทดสอบโดยใช้วิธี Disc-diffusion (Nostro และคณะ, 2012, Gniewosz และคณะ, 2014) โดยตัดแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้เป็นวงกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตร (พื้นที่ ~ 1.1 ตารางเซนติเมตร) จากนั้นเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียและสปอร์ราตามวิธีในข้อ 3.3.4.2.1 และ 3.3.4.2.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อมูลเลอร์ฮินตันและพีดีเอ ทั้งไว้จนแห้ง หลังจากนั้นจึงนำแผ่นฟิล์มรูวงกลมมาวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 25 องศาเซลเซียส และบันทึกผลการยับยั้ง (โซนใส) เป็นเซนติเมตรภายใน 16-24 และ 48-72 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียและรา ตามลำดับ

3.3.6.3 ศึกษาการปลดปล่อยซินนามาลดีไฮด์จากแผ่นฟิล์ม

วัดความสามารถในการปลดปล่อยสารในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบ โดยตัดแปลงจากวิธีของ (Nostro และคณะ, 2012) นำแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่เตรียมตามข้อ 3.3.5.1 มาตัดให้ได้ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร แล้วนำมาจุ่มลงในสารละลายเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมตามข้อ 3.3.3.1.1 ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 5×10^5 - 1×10^6

CFU/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำตัวอย่างมาติดตามการลดจำนวนลงของจุลินทรีย์เมื่อเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น ที่เวลา 0, 2, 4, 8, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยทำการเจือจางจุลินทรีย์ทดสอบในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% จากนั้นทำมานับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธีหยดตัวอย่างที่เจือจางความเข้มข้นต่างๆ บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีชุดควบคุม 2 ชุด ได้แก่ ชุดการทดสอบที่ใส่แผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ได้เติมชินนามาลดีไฮด์ และชุดการทดสอบที่ไม่ได้เติมแผ่นฟิล์มเป็นชุดเปรียบเทียบ

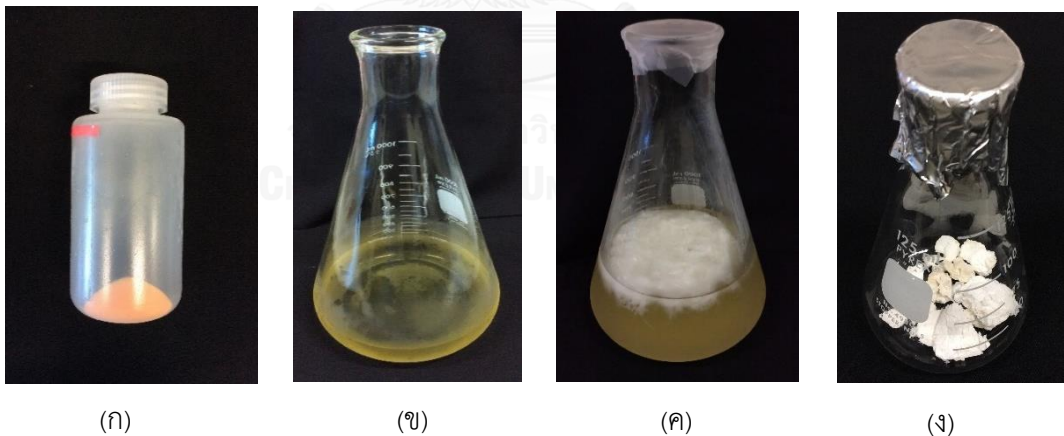


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การผลิตและการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์

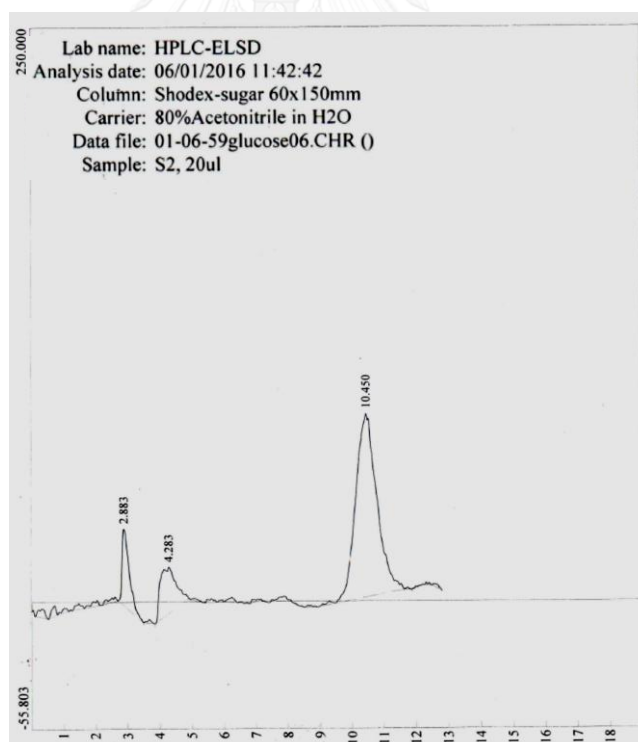
เมื่อเตรียมหัวเชื้อ *A. pullulans* YPT6-14 ที่มีค่าความขุ่นอยู่ในช่วง 0.8-1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลง Production medium แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออก พบว่าตะกอนเซลล์มีสีชมพูอมส้มอ่อน แยกส่วนใสนำมาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอล 95% เย็น ในระหว่างการตกตะกอนจะพบพอลิแซ็กคาไรด์ลอยจับเป็นแพสีขาวฟูอยู่ด้านบนของเอทานอลดังรูปที่ 4.1 หลังจากตกตะกอนข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทเอทานอลทิ้ง แล้วนำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์มาฉีกให้เป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อให้สะดวกในขั้นตอนการทำแห้งและการละลาย พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีลักษณะเหนียวคล้ายหมากฝรั่ง จากนั้นนำมาแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไประเหิดแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งเป็นเวลา 6-7 ชั่วโมง ได้ก้อนพอลิแซ็กคาไรด์ลักษณะเป็นแผ่นสีขาวคงรูปตามที่ฉีกไว้ แข็ง หักได้ ไม่เป็นผง ดังรูปที่ 4.1 (ง) สามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาชั่งน้ำหนักและนำมาละลายเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไปได้



รูปที่ 4.1 การตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอทานอล (ก) ตะกอนเซลล์ *A. pullulans* YTP6-14 (ข) ส่วนใสที่แยกเซลล์ออกแล้ว (ค) ส่วนใสหลังจากเติมเอทานอลเย็นและพอลิแซ็กคาไรด์สีขาว (ง) ตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์สีขาวหลังจากระเหิดแห้ง

4.2 ศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

ในการศึกษาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ นำผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนก่อนหน้า นำมาย่อยด้วยกรดซัลฟูริก 1 โมลาร์ และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้พอลิเมอร์สายยาวถูกย่อยออกเป็นน้ำตาลมอนอเมอร์จนหมด จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายให้ได้ 7 และกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากสารละลายทดสอบด้วยการกรองผ่านหัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร เพื่อป้องกันการอุดตันและได้ค่าความเป็นกรดเบสเหมาะสมต่อการทำงานของ Sugar column SZ5532 แล้วนำไปวิเคราะห์ผลการทดลองด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้อะซิโตนไนไตรล์ 80% เป็นเฟสเคลื่อนที่ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาตรฐานชนิดต่างๆ พบว่าสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ให้ผลกราฟโครมาโทแกรมใกล้เคียงกับโครมาโทแกรมของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานคือ น้ำตาลกลูโคสให้พีคสูงสุดที่ retention time (RT) 10.400 นาที (ภาคผนวก ง) และสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ให้พีคสูงสุดที่ 10.450 นาที ดังรูปที่ 4.2 จึงสามารถระบุได้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* YTP6-14 มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว



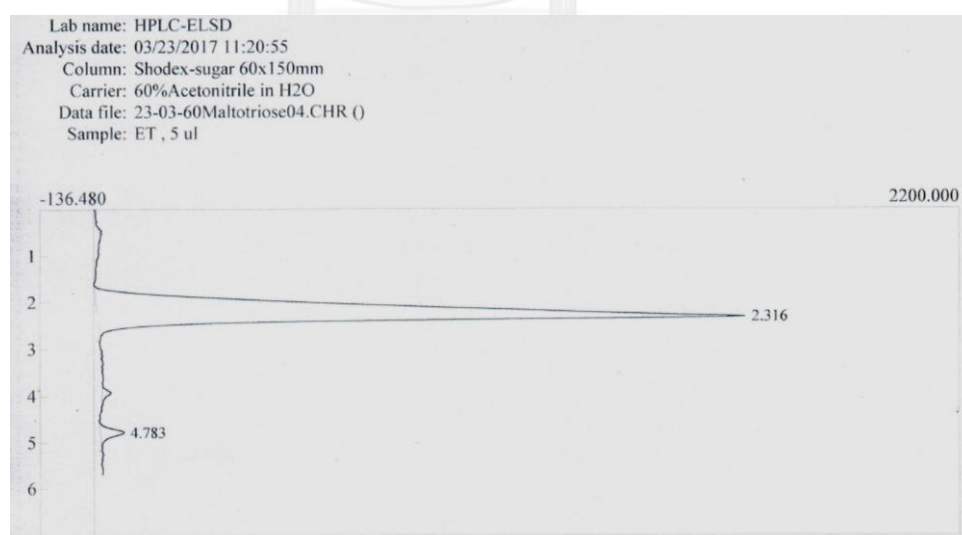
รูปที่ 4.2 โครมาโทแกรมของผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โครมาโทแกรมของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ทดสอบจาก *A. pullulans* YTP6-14

การติดตามปฏิกิริยาเอนไซม์พุลลูลานเนสต่อการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 เทียบกับพุลลูแลนมาตรฐาน ซึ่งโครงสร้างของพุลลูแลนจะมีกลูโคสเป็นมอนอเมอร์เพียงชนิดเดียวต่อกัน 3 โมเลกุล (มอลโทโทรโอส) เชื่อมด้วยพันธะ $\alpha(-1,4-)$ ไกลโคซิดิก ในระหว่างมอลโทโทรโอสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\alpha(-1,6-)$ ไกลโคซิดิก โดยที่เอนไซม์พุลลูลานเนสจะตัดที่พันธะนี้ซึ่งเมื่อหลังจากการตัดพันธะแล้วจะได้น้ำตาลรีดิวซ์เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งหากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้เป็นพุลลูแลน ควรจะให้น้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณที่เท่ากับหรือใกล้เคียงกับพุลลูแลนมาตรฐาน หลังจากทดสอบดังข้อ 3.3.2.2 เมื่อเติม DNSA พบว่าสารละลายมีสีเหลืองใสใกล้เคียงกันทุกหลอด แต่หลังจากที่นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที พบว่าในหลอดทดลองที่เติมเอนไซม์พุลลูลานเนส (1 unit/ml) มีสีเข้มขึ้นจนกลายเป็นสีส้มแดง แต่ในชุดควบคุมของทั้งพอลิแซ็กคาไรด์และพุลลูแลนที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ยังคงมีสีเหลืองใสเช่นเดิม จากนั้นหยุดปฏิกิริยาในน้ำแข็งและเติมน้ำกลั่นแล้วนำไปวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรโดยใช้บัพเฟอร์อะซีเตทเป็น Blank จากนั้นนำค่าความขุ่นที่ได้มาคำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยคำนวณจากกราฟกลูโคสมาตรฐานที่มีค่า R-Square มากกว่าเท่ากับ 0.99 ได้ดังตารางที่ 4.1 โดยพบว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเอนไซม์พุลลูลานเนสทั้งพอลิแซ็กคาไรด์ทดสอบและพุลลูแลนมาตรฐานแทบไม่สามารถตรวจพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.001 ± 0.001 กรัมต่อลิตร สำหรับการทดสอบที่เติมเอนไซม์ลงไปพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ใกล้เคียงกัน ชุดทดสอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่คำนวณได้เฉลี่ยเท่ากับ 0.341 ± 0.002 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับพุลลูแลนมาตรฐานที่ถูกย่อยแล้วมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เฉลี่ยใกล้เคียงกัน คือ 0.348 ± 0.006 กรัมต่อลิตร

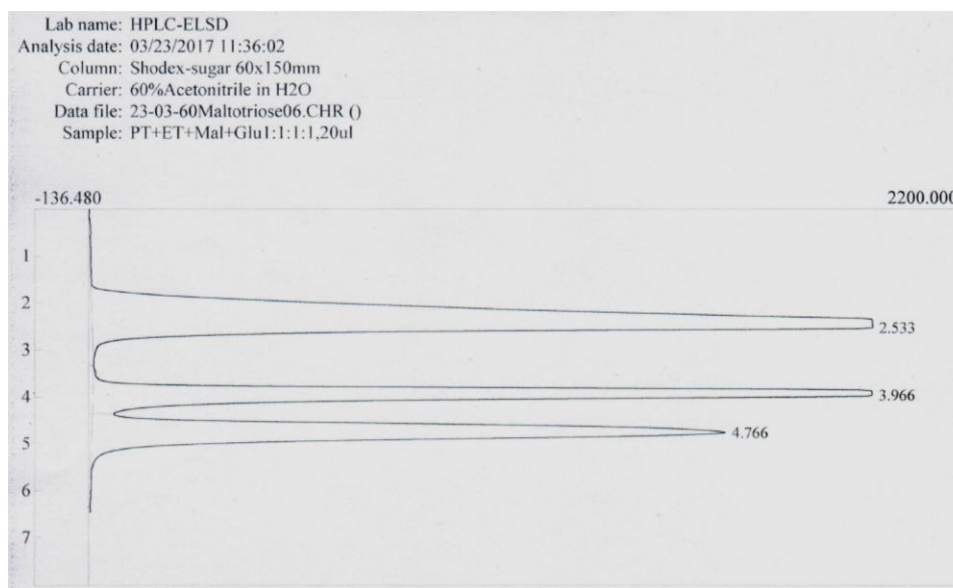
ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ที่คำนวณจากค่าความขุ่นเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ (EPS) ที่ผลิตได้เทียบกับพุลลูแลนมาตรฐานหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนส

ครั้งที่	Blank (บัพเฟอร์)	EPS control	EPS+ pullulanase	pullulan control	pullulan+ pullulanase
1	0.000	0.000	0.342	0.002	0.340
2	0.000	0.000	0.340	0.000	0.350
3	0.000	0.002	0.344	0.002	0.352
4	0.000	0.002	0.340	0.000	0.350
ค่าเฉลี่ย	0.000	0.001	0.341	0.001	0.348
ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน	0.000	0.001	0.002	0.001	0.006

หลังจากพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน จึงต้องการตรวจสอบว่าผลิตภัณฑ์หลังจากที่
 ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์พุลลูแลนสเป็นน้ำตาลชนิดเดียวกันหรือไม่ จึงใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
 ด้วย Sugar column SZ5532 โดยใช้อะซีโทไนไตรล์ 60% เป็นเฟสเคลื่อนที่ เช่นเดียวกันกับการ
 พิสูจน์หาชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในขั้นตอนก่อนหน้า โดยการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อย
 พอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ด้วยเอนไซม์พุลลูแลนส เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้
 จากพุลลูแลนมาตรฐาน และสารละลายน้ำตาลมอลโทโทรโอสมมาตรฐาน จากรูปที่ 4.3 พบว่า
 ผลิตภัณฑ์จากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ให้ผล RT ที่ 4.783 นาที ซึ่งมีค่าใกล้เคียงผลโครมาโทแกรม
 ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยพุลลูแลนมาตรฐานด้วยเอนไซม์ ที่มีค่าเท่ากับ 4.733 นาที (ภาคผนวก
 ง) จึงคาดว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูแลนสจะเป็นชนิดเดียวกัน เมื่อนำสารละลาย
 น้ำตาลมอลโทโทรโอสมมาตรฐานมาวิเคราะห์ พบว่ามีค่า RT เท่ากับ 4.783 นาที (ภาคผนวก ง) ซึ่งมี
 ค่าใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง จึงทำการทดสอบต่อโดยนำสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์
 พุลลูแลนสทั้งสองมาผสมร่วมกับสารละลายน้ำตาลมอลโทโทรโอส และกลูโคสมาตรฐานในอัตราส่วน
 ที่เท่ากัน แล้วนำมาวิเคราะห์ ผลโครมาโทแกรมการฉีควิเคราะห์ในรูปที่ 4.4 พบว่าโครมาโทแกรมของ
 สารละลายผสมมีพีคที่เวลา 4.766 นาที และสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการฉีควิเคราะห์ผลิตภัณฑ์จากการ
 ย่อยเอนไซม์เดี่ยวๆแต่ละชนิด แสดงให้เห็นว่ามีการซ้อนทับกันของพีคและมีการเพิ่มปริมาณของสาร
 ชนิดเดียวกัน ซึ่งก็คือผลิตภัณฑ์ที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์พุลลูแลนสจากตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์กับ
 พุลลูแลนมาตรฐาน และน้ำตาลมอลโทโทรโอส นอกจากนี้ยังพบพีคแยกตัวออกมาที่เวลา 3.966 นาที
 ซึ่งคือเวลาใกล้เคียงกันกับสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่มี RT เท่ากับ 3.916 นาที



รูปที่ 4.3 โครมาโทแกรมผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โครมาโท
 แกรมของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ทดสอบจาก *A. pullulans* YTP6-14 หลังจากทำปฏิกิริยากับ
 เอนไซม์พุลลูแลนสพบ RT ที่ 4.783 นาที



รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ และพอลิกลูแคนมาตรฐานหลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์พอลิกลูแคนเนส ผสมกับสารละลายน้ำตาลกลูโคสและมอลโทโทรไอสมมาตรฐาน พบ RT ของกลูโคสที่ 3.966 นาที และสารละลายผสมที่ 4.766 นาที

4.3 ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของซินนามาลดีไฮด์

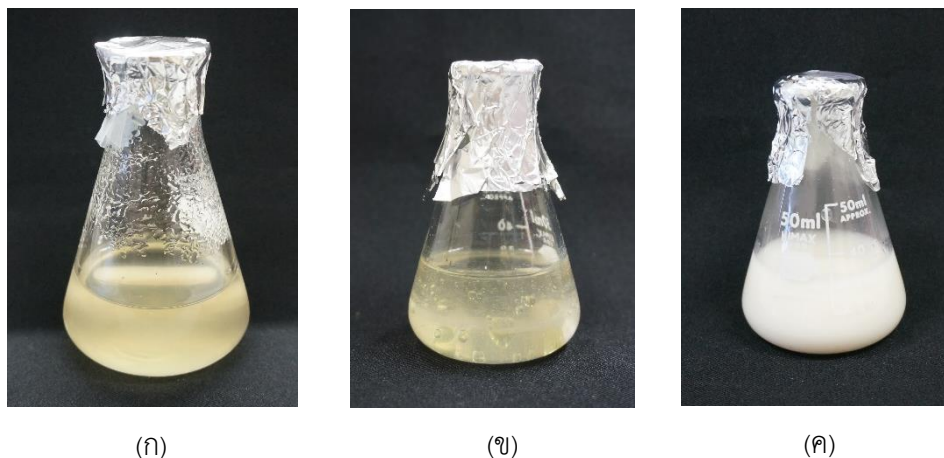
จากวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เป็นการนำพอลิแซ็กคาไรด์มาทำแผ่นฟิล์มชีวภาพ และเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ คือ ซินนามาลดีไฮด์ เพื่อให้ได้ฟิล์มที่นำไปใช้กับอาหารที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ในขั้นต้นจึงต้องหาความเข้มข้นที่ต่ำสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (MIC) จึงนำซินนามาลดีไฮด์มาเจือจางที่ละ 2 เท่าโดยให้สารมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0232-95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมแบคทีเรียและราทดสอบที่เตรียมตามข้อ 3.3.3.1.1 และ 3.3.3.1.2 ตามลำดับ ที่ปรับความเข้มข้นตั้งต้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml และสปอร์ราทดสอบจำนวนเท่ากับ 10^5 CFU/ml จากนั้นจึงเติมสื่ออินดิเคเตอร์รีซาซูริน โดยแปลผลเปรียบเทียบกับสื่ออินดิเคเตอร์ที่เปลี่ยนแปลงไปกับชุดควบคุมบวกที่ไม่เติมจุลินทรีย์ และชุดควบคุมลบที่มีจุลินทรีย์โดยไม่เติมซินนามาลดีไฮด์แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม จากผลการทดสอบในตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่า ซินนามาลดีไฮด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทั้งหมด โดยมีฤทธิ์ยับยั้งได้ดีตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำไม่เกิน 1.484 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่า *B. subtilis* ATCC 16633 มีค่าต่ำที่สุดที่ 0.0928 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วย *A. flavus* MSCU 0580 และ *A. niger* MSCU 0361 ที่มีค่า MIC เท่ากันที่ 0.1855 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร *E. coli* ATCC 8739 และ *S. typhimurium* MSCU 0492 ที่มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งได้ที่ 0.3711 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในส่วนของ *S. aureus* ATCC 6538P พบว่าสามารถทนต่อซินนามาลดีไฮด์ได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยมีค่า MIC สูงสุดที่ 1.4840 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.2 ผลค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดของซินนามาลดีไฮด์ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ (MIC)

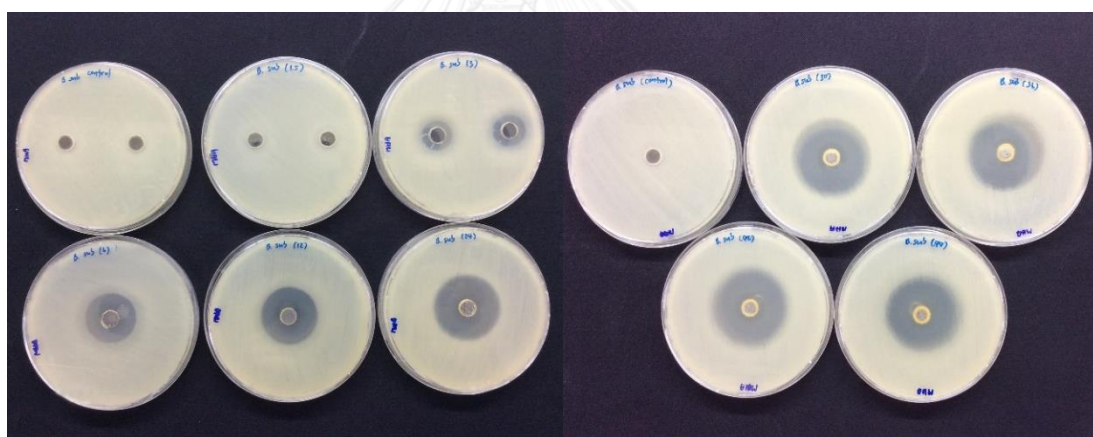
จุลินทรีย์	ค่า MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	1.4840
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 16633	0.0928
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0.3711
<i>Salmonella typhimurium</i> MSCU 0492	0.3711
<i>Aspergillus flavus</i> MSCU 0580	0.1855
<i>Aspergillus niger</i> MSCU 0361	0.1855

4.4 ผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมกับซินนามาลดีไฮด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่แห้งแล้วมาปริมาณ 7% น้ำหนักแห้งต่อปริมาตรมาละลายในน้ำและเติมกลีเซอรอล 1.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมส่วนประกอบด้วยเครื่องผสมสารละลาย รอกนกระทั่งสารละลายกลายเป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์สามารถละลายได้ทั้งหมด สารละลายที่ได้มีลักษณะสีใส มีความทึบแสงเล็กน้อย ไม่มีกลิ่น มีความข้นหนืด จากนั้นจึงแบ่งสารละลายมาเติมซินนามาลดีไฮด์โดยเริ่มใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ครอบคลุมค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ (MIC) ที่ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเพิ่มความเข้มข้นขึ้นเป็น 3, 6, 12, 24, 30, 36, 42 และ 48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมซินนามาลดีไฮด์ลงไปเบื้องต้นพบว่าซินนามาลดีไฮด์แยกตัวออกจากสารละลายฟิล์มมีลักษณะเป็นหยดสารสีเหลืองขนาดใหญ่ แต่เมื่อนำมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารประมาณ 2 ชั่วโมงพบว่าซินนามาลดีไฮด์สามารถรวมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายฟิล์มโดยจะอยู่ในลักษณะเป็นอิมัลชันโดยซินนามาลดีไฮด์จะแตกเป็นหยดเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วสารละลาย และเมื่อตั้งทิ้งไว้ไม่พบการแยกชั้นของสารละลาย โดยรวมเมื่อผสมซินนามาลดีไฮด์ทำให้สารละลายฟิล์มเปลี่ยนจากสีใสกลายเป็นขาวขุ่นดังรูปที่ 4.5 จากนั้นนำมาทดสอบสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion โดยนำสารละลายฟิล์มที่ผสมกับซินนามาลดีไฮด์เติมลงไปในหลุมที่เจาะไว้ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังที่อธิบายในข้อ 3.3.4.2 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมแล้วบันทึกผลค่าโซนใส

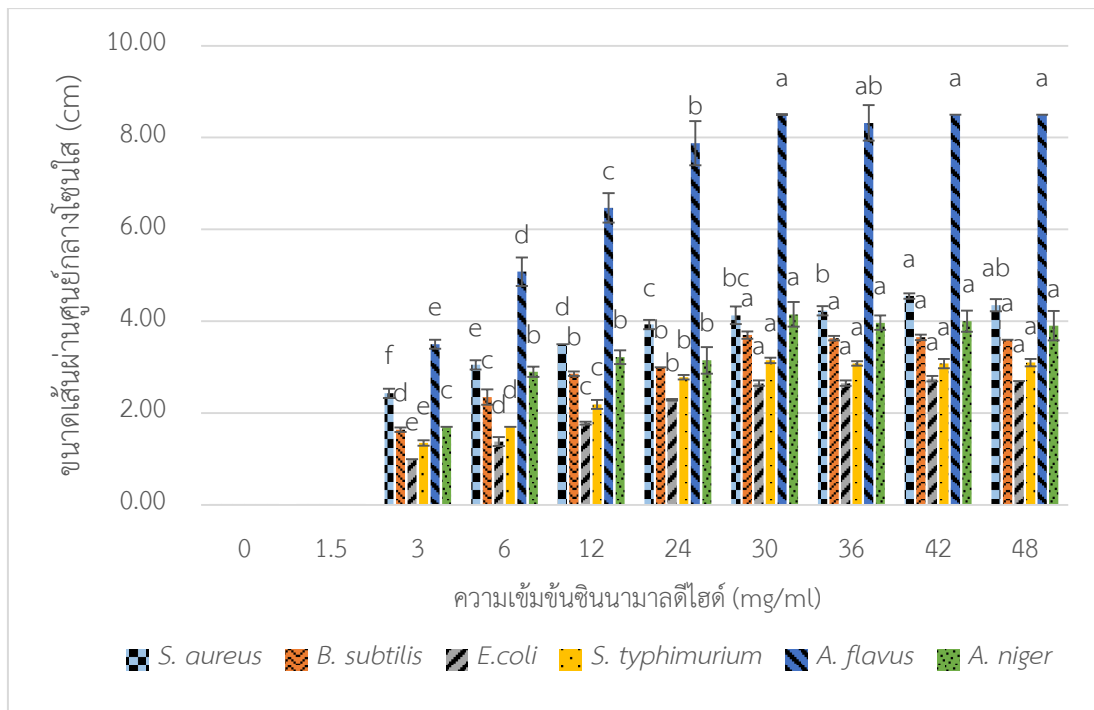


รูปที่ 4.5 สารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ 7% โดยน้ำหนักและกลีเซอรอลที่เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน (ก) สารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่และซินนามาลดีไฮด์ที่จับก้อนเป็นหยดน้ำมัน (ข) สารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์หลังจากปั่นผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน (ค)



รูปที่ 4.6 ผลโซนใสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมูลเลอร์ฮินตัน ทดสอบยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมกับซินนามาลดีไฮด์ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) ถึง 48 mg/ml ของ *B. subtilis* พบว่าที่ความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์สูงๆ มีหยดสีเหลืองเกาะค้างที่ก้นหลุม

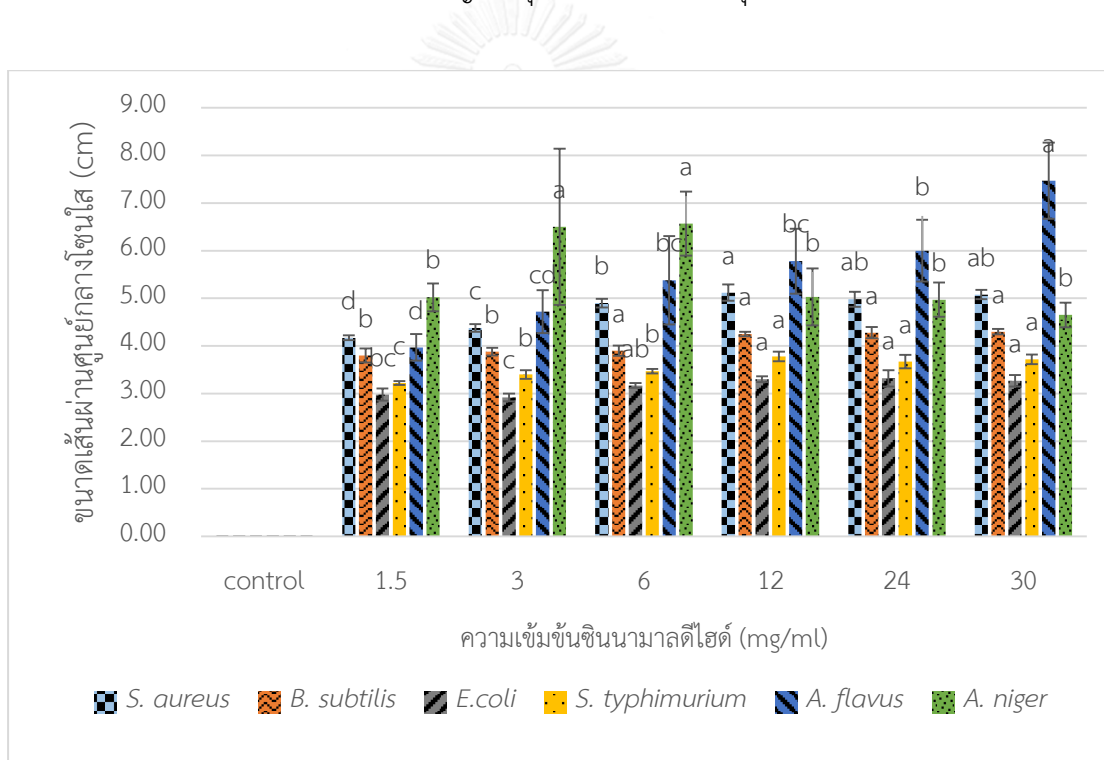
เมื่อนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบมาบันทึกผลการทดลองพบว่าในหลุมที่เติมสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมหรือไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์จะสามารถแพร่ออกไปจากหลุมได้จนหมด ยกเว้นสารละลายฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ความเข้มข้นสูงๆ ตั้งแต่ 30 ถึง 48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ก้นหลุมยังพบหยดสารสีเหลืองใสเกาะค้างอยู่ซึ่งคาดว่าเป็นซินนามาลดีไฮด์จากสารละลายฟิล์มดังรูปที่ 4.6 สามารถสรุปผลการทดสอบได้ดังแสดงในกราฟแท่งในรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าสารละลายฟิล์มที่ไม่ผสมสารซินนามาลดีไฮด์ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ในส่วนของสารละลายฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ เริ่มพบการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่ความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นต้นไป โดยพบว่า *A. flavus* มีค่าศูนย์กลางโซนใสกว้างที่สุดในทุกความเข้มข้นของซินนามาลดีไฮด์ที่ผสมอยู่ในสารละลายฟิล์ม รองลงมาคือ *S. aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ให้โซนใสกว้างที่สุดในจำพวกแบคทีเรีย ตามมาด้วย *A. niger*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* และ *E. coli* ตามลำดับ จะเห็นว่าผลการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของซินนามาลดีไฮด์จะให้ผลการยับยั้งที่ดีต่อราทั้งสองสายพันธุ์ โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งเจริญของเส้นใยและการผลิตสปอร์ ส่งผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่ง *E. coli* สามารถต้านทานต่อซินนามาลดีไฮด์ได้มากที่สุด จากผลการทดลองพบว่าในสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ความเข้มข้นในช่วง 24 จนถึง 48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความกว้างของโซนใสใกล้เคียงกันในแต่ละสายพันธุ์ โดยที่ความกว้างของขนาดโซนใสไม่แปรผันตามปริมาณความเข้มข้นของซินนามาลดีไฮด์ที่สูงขึ้น ต่างจากสารละลายฟิล์มที่มีช่วงความเข้มข้นของสารตั้งแต่ 3 ถึง 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์สูงขึ้นความกว้างของโซนใสก็ยิ่งเพิ่มขึ้นตาม เมื่อพิจารณาผลการทดสอบโดยใช้วิธีการทางสถิติพบว่า การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 3 ถึง 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละความเข้มข้น แต่ผลการยับยั้งการเจริญที่สูงที่สุดในทุกสายพันธุ์พบที่ช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 30 ถึง 48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่พบว่าไม่มีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 4.7 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสายพันธุ์ต่างๆของสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความเข้มข้นชินนามาลดีไฮด์ตั้งแต่ 0-48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี agar well diffusion โดยแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (0 mg/ml คือชุดควบคุม)
หมายเหตุ : ความกว้างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.50 เซนติเมตร ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี one-way ANOVA

เพื่อศึกษาอิทธิพลของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของชินนามาลดีไฮด์ว่าส่งผลต่อการออกฤทธิ์อย่างไร จึงได้ทดสอบการยับยั้งโดยใช้วิธีเดียวกันกับการทดลองก่อนหน้า แต่ไม่ผสมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ลงไป จากนั้นจึงเติมลงไปในหลุมกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เกลี่ยเชื้อทดสอบไว้ที่ผิวหน้าเช่นเดียวกันกับขั้นตอนก่อนหน้า หลังจากการบ่มนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสดังแสดงผลในรูปที่ 4.8 สารละลายชินนามาลดีไฮด์ทดสอบที่ไม่ได้ผสมพอลิแซ็กคาไรด์เริ่มพบโซนใสในทุกเชื้อทดสอบตั้งแต่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่างจากสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทดสอบก่อนหน้าที่ไม่พบการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นของชินนามาลดีไฮด์เดียวกันนี้ ผลของการทดสอบในขั้นนี้แสดงให้เห็นว่า ชินนามาลดีไฮด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำๆ แตกต่างจากผลการทดสอบที่มีสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ผสมด้วย แต่เมื่อเพิ่มเข้มข้นของสารจะพบว่าที่กันหลุมมีชินนามาลดีไฮด์ตกค้างอยู่เช่นเดียวกับการทดลองก่อนหน้า ส่งผลให้ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ทดสอบส่วนใหญ่ไม่ได้แปรผันตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มมากขึ้น ดังผลการทดสอบต่อเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis*, *E.coli* และ *S. typhimurium* ที่พบว่าผลค่าโซนใสยังคงเพิ่มขึ้นในช่วงความเข้มข้นสารในช่วง 1.5 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อที่ความเข้มข้นสารเกิน 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป พบว่าความกว้างของโซนใสไม่มีความแตกต่างกันทางด้านสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้ยังทำให้ผลการยับยั้งการเจริญลดน้อยลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ดังในผลการทดสอบของ *A. niger* ที่พบว่าผลของโซนใสเพิ่มมากขึ้นและสูงที่สุดในช่วง 1.5 ถึง 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นต้นไป สำหรับ *A. flavus* พบว่าผลของการยับยั้งเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของสารเช่นเดิม และยังให้ผลการยับยั้งที่ดีที่สุดที่ความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชุดควบคุมได้เติม DMSO ที่ใช้เป็นสารเจือจางซินนามาลดีไฮด์ พบว่าไม่มีการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด

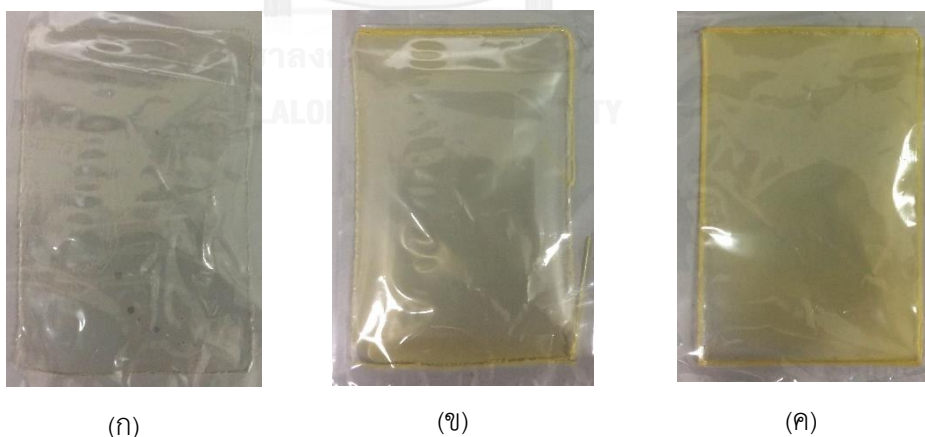


รูปที่ 4.8 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสายพันธุ์ต่างๆของซินนามาลดีไฮด์มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี agar well diffusion โดยแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ชุดควบคุม คือ DMSO)

หมายเหตุ : ความกว้างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.50 เซนติเมตร ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี one-way ANOVA

4.5 การขึ้นแผ่นฟิล์มศึกษาสมบัติทางกายภาพของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ประยุกต์

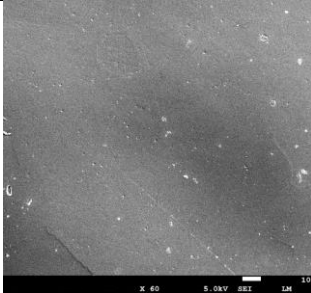
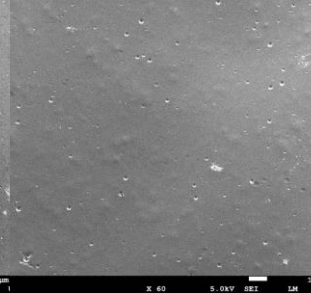
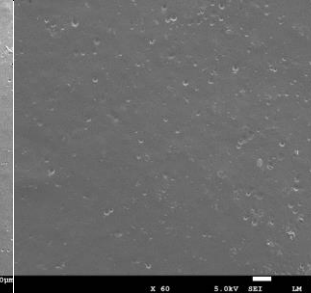
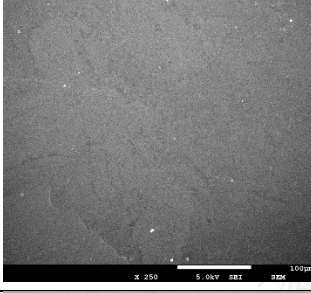
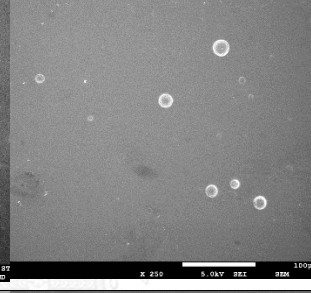
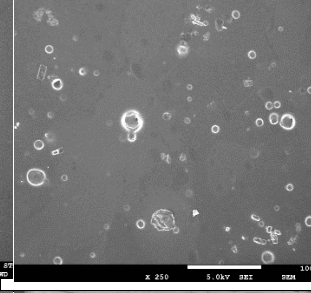
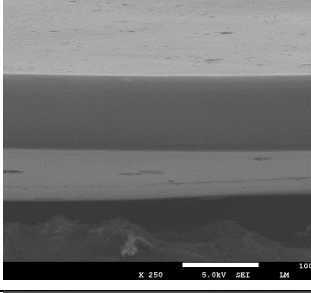
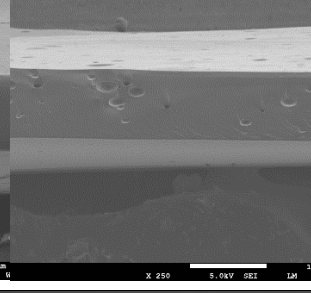
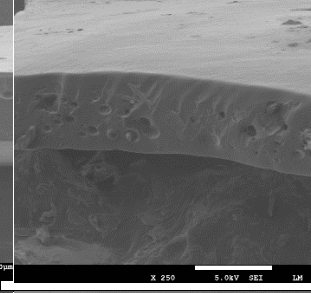
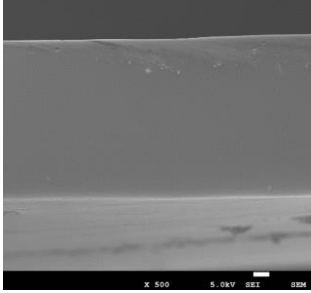
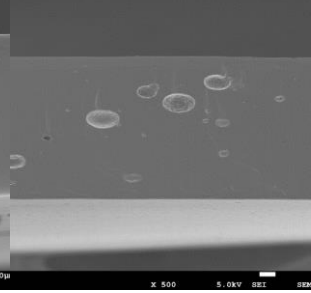
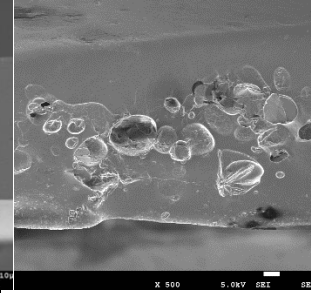
หลังจากเลือกความเข้มข้นของซินนามาลดีไฮด์ที่เหมาะสมสำหรับขึ้นเป็นแผ่นฟิล์มที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงเตรียมสารละลายฟิล์มตามข้อ 3.3.4.1 เมื่อผสมส่วนผสมทั้งหมดให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว จึงนำมาเทลงในแบบขึ้นรูปแผ่นฟิล์มอะคริลิกปริมาตร 30 มิลลิลิตร โดยมีสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์เป็นชุดฟิล์มควบคุม จากนั้นนำไปอบในตู้อบลมร้อน เมื่อแผ่นฟิล์มแห้งสนิทแล้วจึงลอกแผ่นฟิล์มออกจากพิมพ์ พบว่าระยะเวลาในการอบต้องเหมาะสม ไม่ควรทิ้งแผ่นฟิล์มที่แห้งแล้วไว้ในตู้อบลมร้อนนานเกินไป เนื่องจากจะทำให้แผ่นฟิล์มแห้งติดกับถาด และไม่สามารถลอกออกได้ หรืออาจทำให้แผ่นฟิล์มแห้งและกรอบ เปราะ แตกเสียหายได้ เมื่อลอกฟิล์มแล้วนำมาเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสม (53%) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป เมื่อลอกแผ่นฟิล์มออกมาแล้วพบว่าแผ่นฟิล์มมีความอ่อนตัว ไม่กรอบแห้ง ไม่ติดนิ้ว ฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์มีความยืดหยุ่นและอ่อนตัวมากกว่าฟิล์มควบคุมที่มีลักษณะกระด้างและแข็งกว่าเล็กน้อย ลักษณะของแผ่นฟิล์มดังรูปที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าแผ่นฟิล์มควบคุมมีลักษณะใสไม่มีสี บาง ไม่มีกลิ่น ที่บริเวณพื้นผิวมีรูจากฟองอากาศเล็กน้อย ไม่พบรอยแตก เป็นแผ่นสม่ำเสมอ แต่พบว่าแผ่นฟิล์มมีรอยย่นเล็กน้อยจากการลอก และอาจพับติดกันได้ง่ายกว่าแผ่นฟิล์มประยุกต์ที่ผสมซินนามาลดีไฮด์จะมีสีเหลืองสม่ำเสมอทั้งแผ่น มีความขุ่นทึบมากกว่า มีความคงตัวไม่อ่อนนุ่มเกินไป ไม่พบรอยแตกร้าว ผิวหน้ามีลักษณะสม่ำเสมอ และมีกลิ่นของซินนามอน โดยที่แผ่นฟิล์มผสมสารที่ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะมีสีเหลืองเข้มกว่าแผ่นฟิล์ม 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



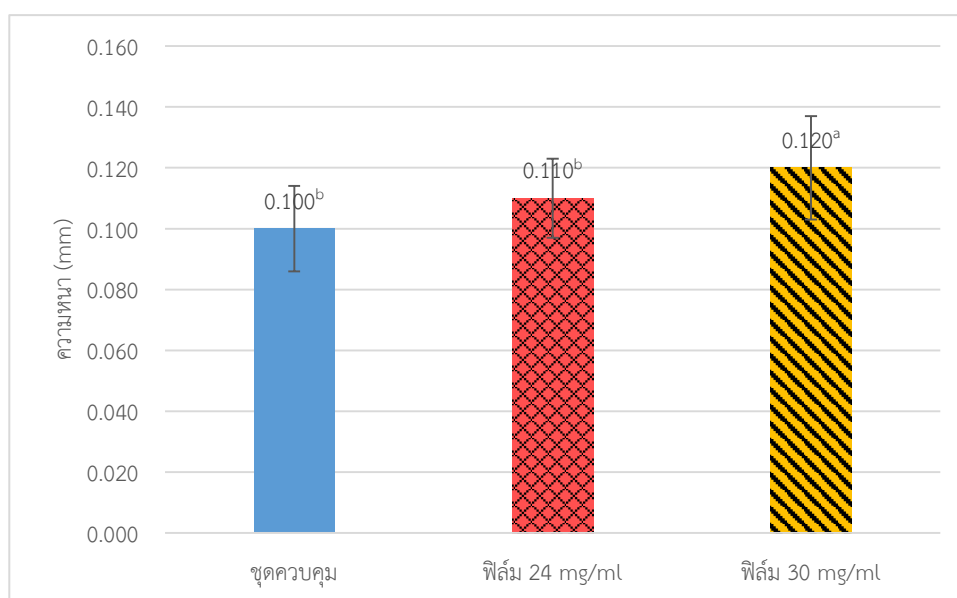
รูปที่ 4.9 ลักษณะของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อ *A. pullulans* YTP6-14 (ก) แผ่นฟิล์มควบคุม (ไม่เติมซินนามาลดีไฮด์) (ข) แผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 mg/ml (ค) แผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 mg/ml

นำแผ่นฟิล์มที่เตรียมได้ไปตรวจหสยใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดชนิดฟิวมิชชันและอุปกรณ์วิเคราะห์ธาตุ ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อตรวจดูลักษณะภายนอกของแผ่นฟิล์มเพื่อเปรียบเทียบระหว่างแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์และไม่ได้ผสม โดยส่องบริเวณพื้นผิวของแผ่นฟิล์ม โดยติดตัวอย่างเข้ากับแท่นส่องแล้วเคลื่อนด้วยทองคำจากนั้นนำไปวิเคราะห์ผล จากตารางที่ 4.3 จากลักษณะแผ่นฟิล์มที่พื้นผิวหน้าที่กำลังขยาย 60 เท่าแสดงให้เห็นว่าแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์มีพื้นผิวหน้าขรุขระกว่าชุดควบคุม โดยพบว่าที่บริเวณพื้นผิวมีหยดก้อนกลมๆ ที่มีลักษณะคล้ายฟองอากาศ เมื่อเพิ่มกำลังขยายถึง 250 เท่า พบว่ามีฟองที่เห็นมีลักษณะเป็นหยดๆ เหมือนหยดน้ำมันของซินนามาลดีไฮด์ที่ถูกกักอยู่ในเนื้อแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์กระจายอยู่โดยรอบของบริเวณพื้นผิวหน้า โดยพบว่าฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีความขรุขระของพื้นผิวมากที่สุด เนื่องจากมีหยดน้ำมันจากซินนามาลดีไฮด์ที่พุ่งออกมาจากบริเวณแผ่นฟิล์มมีความหนาแน่นมากกว่า แผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ไม่พบรอยแตกร้าวที่ผิวหน้า ในส่วนของชุดควบคุมมีลักษณะพื้นผิวเรียบกว่า พบรอยร้าวเล็กน้อย ลักษณะพื้นผิวไม่พบลักษณะหยดน้ำมัน มีความต้านไม่แวววาวเท่าชุดแผ่นฟิล์มประยุกต์ ในส่วนของบริเวณตัดขวาง (cross-section) นำแผ่นฟิล์มทดสอบมาแช่ในไนโตรเจนเหลวรอจนแผ่นฟิล์มแข็งตัวแล้วจึงหักแผ่นฟิล์มออกเพื่อให้เห็นบริเวณตัดขวาง จากนั้นนำมาติดบนแท่นส่องแล้วเคลื่อนด้วยทองคำ จากตารางที่ 4.3 พบว่าแผ่นฟิล์มชุดควบคุมที่กำลังขยาย 250 และ 500 เท่า มีบริเวณผิวหน้าตัดที่เรียบสนิท สม่ำเสมอ แสดงให้เห็นว่าทุกพอลิแซ็กคาไรด์และกลีเซอรอลสามารถเข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยสมบูรณ์ ในส่วนของแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์จะพบหยดของสารแทรกอยู่ในเนื้อฟิล์มโดยส่วนใหญ่ถูกเนื้อฟิล์มล้อมเป็นหยดกลมๆกระจุกอยู่บริเวณตรงกลางแผ่นฟิล์มดังแสดงใน ตารางที่ 4.3 ภาพตัดขวาง 250 และ 500 เท่าเช่นเดียวกันกับลักษณะพื้นผิวพบว่าฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความหนาแน่นของหยดสารบริเวณตรงกลางสูงกว่าแผ่นฟิล์มชนิดอื่นๆ และส่งผลต่อความเรียบของแผ่นฟิล์มอีกด้วย

ตารางที่ 4.3 ลักษณะภายนอกของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ชุดควบคุม และที่ซินนามาลดีไฮด์บริเวณพื้นผิวและบริเวณตัดขวางจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

บริเวณ	ฟิล์มชุดควบคุม	ฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 mg/ml	ฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 mg/ml
ผิวหน้า แผ่น (x60)			
ผิวหน้า แผ่น (x250)			
ภาพตัด ขวาง (x250)			
ภาพตัด ขวาง (x500)			

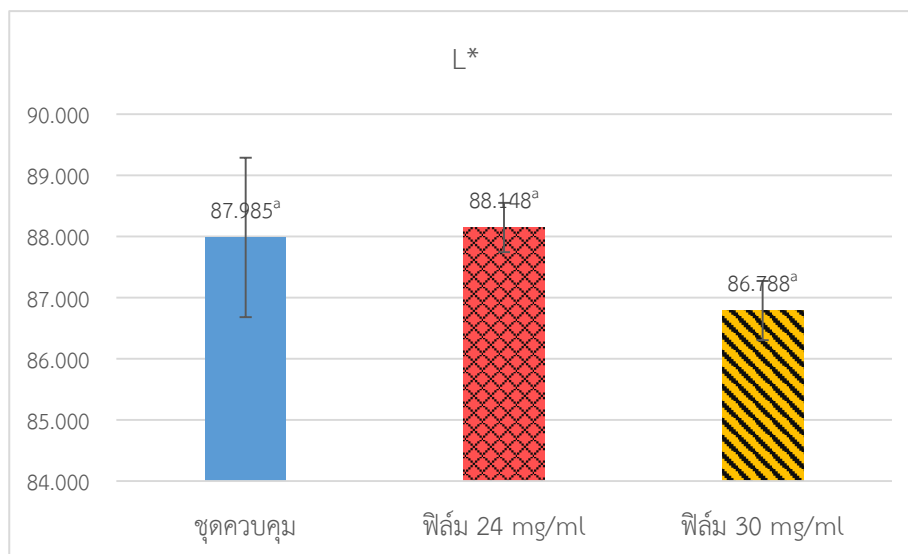
สำหรับการค่าความหนาของแผ่นฟิล์มวัดโดยใช้เครื่องวัดความหนาที่บริเวณต่างๆ ของแผ่นฟิล์มแล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ดังแสดงในกราฟแท่งในรูปที่ 4.10 พบว่าค่าความหนาของแผ่นฟิล์มมีค่าใกล้เคียงกัน ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ มีความหนาต่ำที่สุดคือ 0.10 ± 0.014 มิลลิเมตร ถัดมาคือฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ปริมาณ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่มีความหนา 0.11 ± 0.013 และ 0.12 ± 0.017 มิลลิเมตร ตามลำดับ หลังจากคำนวณทางสถิติพบว่าค่าความหนาของฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีความแตกต่างจากค่าความหนาของฟิล์มชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



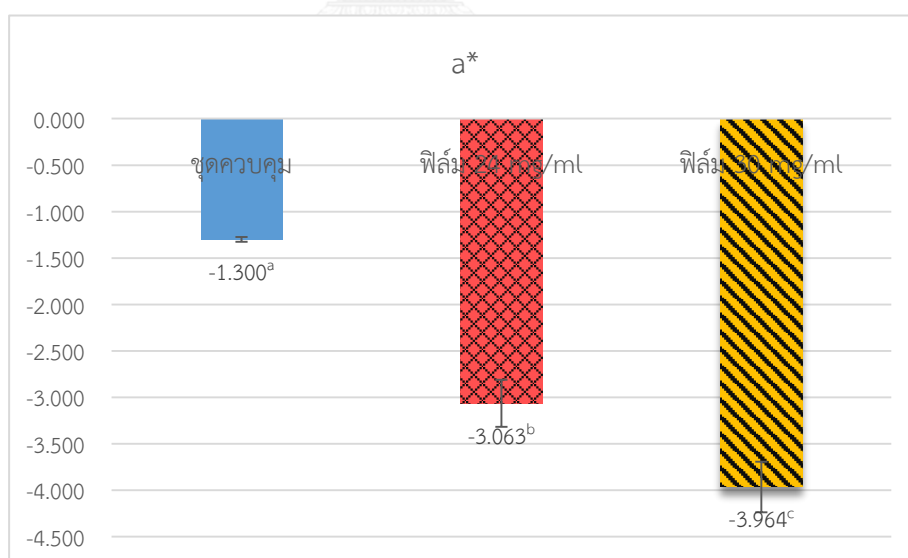
รูปที่ 4.10 ผลค่าความหนาเฉลี่ยของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 15 ครั้ง และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนค่าข้อมูลในแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี one-way ANOVA

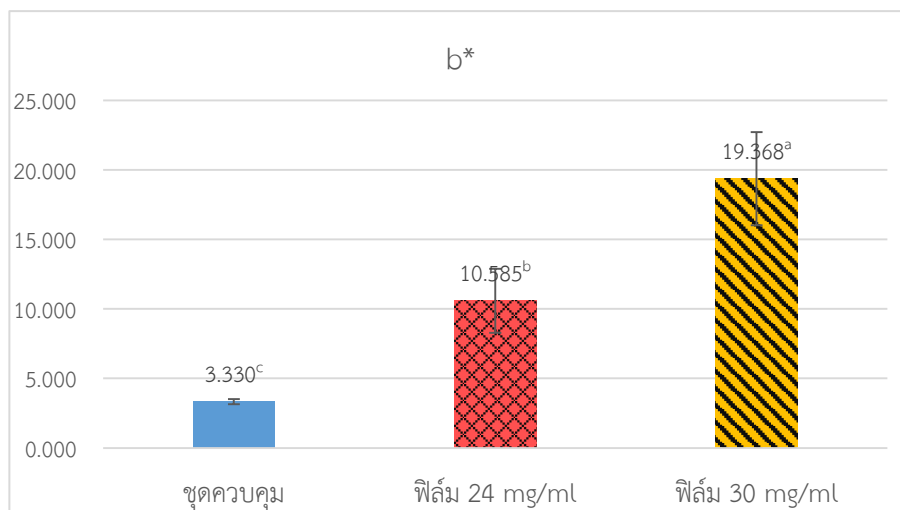
สีเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งทางกายภาพที่ส่งผลต่อความพึงพอใจสินค้าสำหรับผู้บริโภค และเนื่องจากซินนามาลดีไฮด์เป็นสารมีสี จึงได้ศึกษาผลของซินนามาลดีไฮด์ต่อสีของแผ่นฟิล์ม โดยใช้เครื่องโครมามิเตอร์ในการวัดค่าสีของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ โดยทำการวัดแบบสุ่มจากหลายจุดบนแผ่นฟิล์มแต่ละประเภทบนแผ่นสีขาวมาตรฐาน และจดบันทึกค่าสีตามตัวแปรสีทั้ง 3 ตัวแปร คือ L^* , b^* และ a^* จากรูปที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าค่าความสว่าง (L^*) ของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ในชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 87.985 ± 1.305 แผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าความสว่างเฉลี่ยคือ 88.148 ± 0.405 และ 86.788 ± 0.484 ตามลำดับ เมื่อคำนวณทางสถิติ พบว่าค่าความสว่างของแผ่นฟิล์มแต่ละชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ในส่วนของผลค่าความแดง (a^*) ของแผ่นฟิล์ม จากรูปที่ 4.12 แผ่นฟิล์มควบคุมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ -1.300 ± 0.026 ในส่วนของฟิล์มประยุกต์กับสารมีค่าความแดงเฉลี่ยเท่ากับ -3.063 ± 0.254 และ -3.964 ± 0.272 สำหรับปริมาณซินนามาลดีไฮด์ในฟิล์ม 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังมีความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อแปลผลจากรูปที่ 3.1 แสดงให้เห็นว่าฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ส่งผลให้ฟิล์มมีความเขียวยิ่งขึ้น และแปรผันตามปริมาณสารที่เติม สำหรับค่าความเหลือง (b^*) จากรูปที่ 4.13 พบว่าแผ่นฟิล์มชุดควบคุมมีค่าความเหลืองเฉลี่ยที่ 3.330 ± 0.187 แผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าเท่ากับ 10.585 ± 2.304 และแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่าความเหลืองเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ 19.368 ± 3.350 โดยค่าเฉลี่ยของแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และความเหลืองของแผ่นฟิล์มแปรผันตามปริมาณของซินนามาลดีไฮด์ เมื่อเติมสารมากค่าความเหลืองก็จะเพิ่มขึ้นตาม สำหรับค่าความแตกต่างของสีเมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นสีขาวมาตรฐาน (ΔE^*) พบว่า ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ปริมาณ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะให้ความแตกต่างของสีสูงที่สุด คือ 19.080 ± 3.638 รองลงมาคือ ฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ปริมาณ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่มีค่าเฉลี่ยความแตกต่างของสีเท่ากับ 9.668 ± 2.338 ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยความแตกต่างต่ำที่สุดเท่ากับ 3.1623 ± 0.920 ซึ่งฟิล์มแต่ละชนิดมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในรูปที่ 4.14



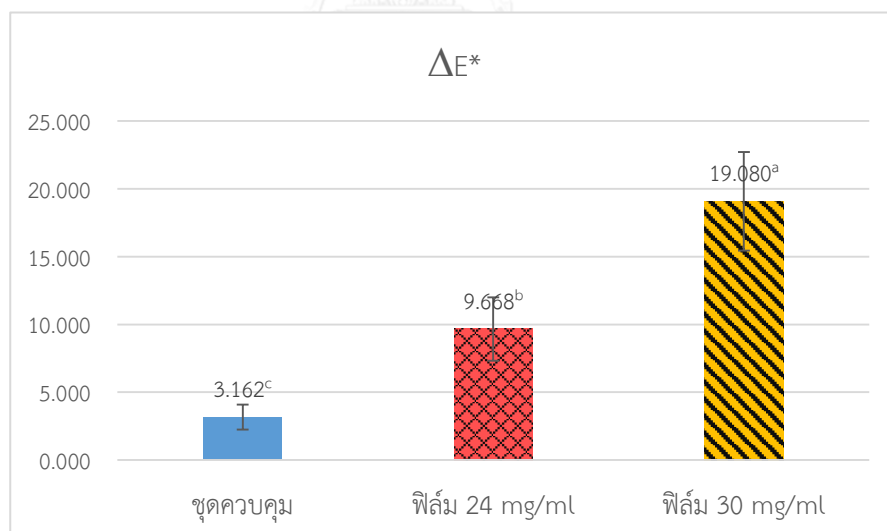
รูปที่ 4.11 ผลค่าเฉลี่ยความสว่าง (Lightness; L*) ของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 8 ครั้ง และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนค่าข้อมูลในแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี one-way ANOVA



รูปที่ 4.12 ผลค่าเฉลี่ยความแดง (Redness; a*) ของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 8 ครั้ง และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนค่าข้อมูลในแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี one-way ANOVA

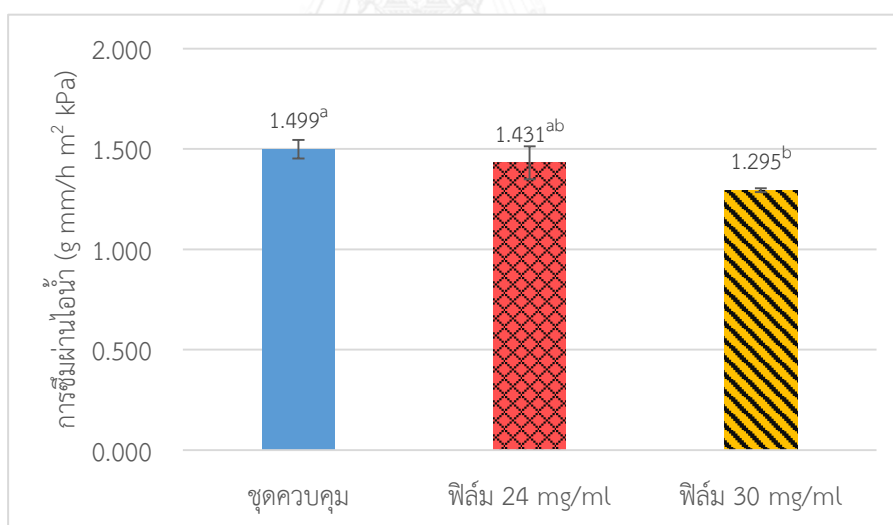


รูปที่ 4.13 ผลเฉลี่ยค่าความเหลือง (Yellowness; b^*) ของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 8 ครั้ง และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนค่าข้อมูลในแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี one-way ANOVA



รูปที่ 4.14 ผลค่าเฉลี่ยความแตกต่างของสีฟิล์มตัวอย่างกับแผ่นมาตรฐาน (ΔE^*) ของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 8 ครั้ง และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนค่าข้อมูลในแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี one-way ANOVA

ปริมาณน้ำเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ภายในผลิตภัณฑ์ จึงต้องการศึกษาผลของการเติมซินนามาลดีไฮด์ลงในแผ่นฟิล์มว่าส่งผลอย่างไรต่อค่าการซึมผ่านไอน้ำของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ โดยนำแผ่นฟิล์มที่ตัดเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 เซนติเมตรมาปิดปากภาชนะที่บรรจุจุลินทรีย์เจลเอาไว้ ซึ่งถือว่ามีค่าความชื้นสัมพัทธ์ภายในภาชนะเท่ากับศูนย์ ($r_1 = 0$) และนำไปเก็บในตู้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 75% ($r_2 = 0.75$) จากนั้นนำภาชนะมาชั่งน้ำหนักที่เวลาต่างๆ และนำมาคำนวณหาค่าความชื้นของกราฟระหว่างน้ำหนักของชุดทดลองที่เพิ่มขึ้นต่อเวลา (กรัมต่อชั่วโมง) จากรูปที่ 4.15 พบว่า ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ได้ผสมซินนามาลดีไฮด์ ฟิล์มที่ผสมสารปริมาณ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการซึมผ่านไอน้ำเฉลี่ยเท่ากับ 1.499 ± 0.046 , 1.431 ± 0.082 และ 1.295 ± 0.010 กรัม/มิลลิเมตรต่อชั่วโมงต่อตารางเมตรต่อกิโลพาสคาล ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าปริมาณไอน้ำซึมผ่านแปรผกผันกับปริมาณซินนามาลดีไฮด์ เมื่อปริมาณสารเพิ่มขึ้นพบว่าค่าการซึมผ่านไอน้ำลดลง และเมื่อคำนวณในทางสถิติพบว่า ฟิล์มที่ไม่เติมสารมีค่าการซึมผ่านไอน้ำที่สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นฟิล์มที่เติมซินนามาลดีไฮด์พบว่าที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการซึมผ่านไอน้ำต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 4.15 ผลค่าเฉลี่ยค่าการซึมผ่านไอน้ำ (WVP) ของแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ และแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนค่าข้อมูลในแท่งกราฟแสดงถึงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี one-way ANOVA

4.6 ปริมาณซินนามาลดีไฮด์ที่เหลือในแผ่นฟิล์ม

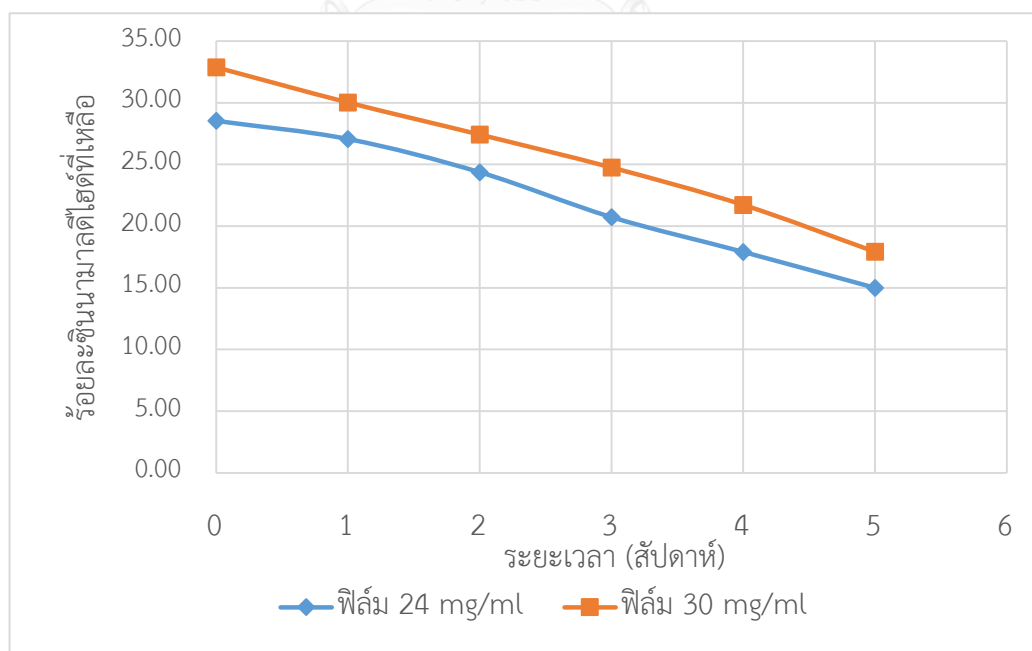
หลังจากอบแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ปริมาตร 30 มิลลิลิตรในภาชนะขนาด 10x15 เซนติเมตร) นำมาตัดให้ได้ขนาด 4x4 เซนติเมตร จากนั้นนำมาละลายลงในสารละลาย DMSO และนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า จะพบว่าสารละลาย DMSO จะเปลี่ยนสีจากสีใสเป็นสีเหลือง ดูดสารละลายมากรองผ่านหัวกรองเพื่อป้องกันการอุดตันของคอลัมน์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณซินนามาลดีไฮด์ในแผ่นฟิล์มด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี และติดตามปริมาณสารในแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ประยุกต์เป็นเวลา 5 สัปดาห์ จากนั้นนำผลพื้นที่ใต้กราฟมาคำนวณกลับเทียบกับกราฟมาตรฐานของซินนามาลดีไฮด์มีค่า R-Square มากกว่าเท่ากับ 0.99 และนำมาคิดเป็นร้อยละของซินนามาลดีไฮด์ที่เหลืออยู่เทียบกับปริมาณเริ่มต้นที่เติมลงไป ดังที่แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณของซินนามาลดีไฮด์ที่ก่อนอบและเหลืออยู่หลังจากอบแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในระยะเวลาต่างๆ

เวลา (สัปดาห์)	ชนิดของแผ่นฟิล์ม							
	24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร				30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร			
	CH ทั้งหมด (mg)	% เหลือ	เหลือ (mg/ml)	ต่อพื้นที่ (mg/cm ²)	CH ทั้งหมด (mg)	% เหลือ	เหลือ (mg/ml)	ต่อพื้นที่ (mg/cm ²)
ก่อนอบ	720.00	100.00	24.00	4.80	900.00	100.00	30.00	6.00
หลังอบ (0)	205.42	28.53	6.85	1.37	295.87	32.87	9.86	1.97
1	194.86	27.06	6.50	1.30	270.19	30.02	9.01	1.80
2	175.48	24.37	5.85	1.17	246.81	27.42	8.23	1.65
3	149.23	20.73	4.97	0.99	222.74	24.75	7.42	1.48
4	128.98	17.91	4.30	0.86	195.44	21.72	6.51	1.30
5	107.98	15.00	3.60	0.72	161.31	17.92	5.38	1.08

หมายเหตุ : CH ย่อมาจากซินนามาลดีไฮด์ ปริมาณความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์ทั้งหมดเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

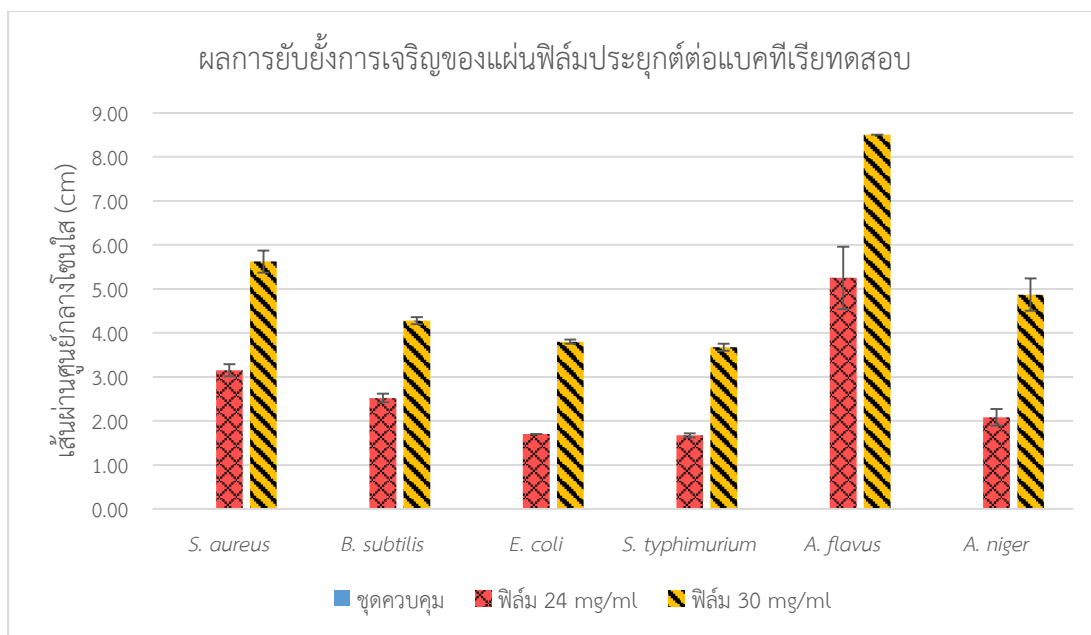
จากผลการทดลองพบว่า การเก็บแผ่นฟิล์มเป็นระยะเวลาสั้นขึ้นจะทำให้แผ่นฟิล์มมีสีเหลืองเข้มขึ้นตามระยะเวลา และส่งผลให้สีของสารละลาย DMSO สีเข้มขึ้นตาม ปริมาณของซินนามาลดีไฮด์จะลดลงมากที่สุดหลังจากอบคือ จาก 720 เหลือ 205.42 มิลลิกรัมในฟิล์มที่เติมสาร 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ จาก 900 เหลือ 295.87 มิลลิกรัมในแผ่นฟิล์มที่เติมสาร 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็นร้อยละของสารที่เหลือเมื่อเทียบกับปริมาณสารเริ่มต้นเท่ากับ 28.53% และ 32.87% ตามลำดับ และเมื่อลองคำนวณกลับเป็นหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรก็ยังคงพบว่าในแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ทั้งสองความเข้มข้นยังคงเหลือปริมาณเท่ากับ 6.85 และ 9.86 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งยังคงสูงกว่าค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ (MIC) ตามข้อที่ 4.3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่สามารถครอบคลุมการยับยั้งการเจริญของทุกเชื้อการทดสอบ เมื่อติดตามปริมาณซินนามาลดีไฮด์ของแผ่นฟิล์มตามระยะเวลาที่เก็บพบว่าปริมาณของสารค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องในทุกสัปดาห์ ดังแสดงในรูปที่ 4.16 โดยแสดงให้เห็นว่าปริมาณของซินนามาลดีไฮด์แปรผกผันกับระยะเวลาที่เก็บ และในสัปดาห์ที่ 5 พบว่า แผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ประยุกต์เหลือปริมาณสารเท่ากับ 107.98 และ 161.31 มิลลิกรัมในแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรทั้งแผ่น ตามลำดับ หรือคิดเป็นร้อยละของสารที่เหลือเท่ากับ 15.00% และ 17.92% ตามลำดับ และยังคงพบว่ามีค่าความเข้มข้นในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสูงกว่าค่า MIC คือ 3.60 และ 5.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



รูปที่ 4.16 ค่าเฉลี่ยของร้อยละซินนามาลดีไฮด์ที่เหลือของแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 สัปดาห์

4.7 การติดตามประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของแผ่นฟิล์มประยุกต์

หลังจากที่ลอกแผ่นฟิล์มแล้วนำมาเก็บรักษาในโถดูดความชื้น นำแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ไม่ได้ผสมสาร (ชุดควบคุม) มาตัดเป็นรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 1.2 เซนติเมตร มีพื้นที่ประมาณ 1.1 ตารางเซนติเมตร มาวางลงตรงกลางผิวหน้าจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียหรือสปอร์ทดสอบเอาไว้ หลังการบ่มนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรวจสอบผลการยับยั้งดังกราฟแสดงในรูปที่ 4.17 พบว่าแม้แผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการอบแห้ง แผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบอยู่ ในขณะที่แผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์หรือชุดควบคุม ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทุกสายพันธุ์เช่นเดียวกันกับในรูปสารละลายฟิล์ม แผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ทั้งสองความเข้มข้นมีผลการยับยั้งมากที่สุดต่อ *S. aureus* ในแบคทีเรียโดยให้ผลค่าเฉลี่ยขนาดศูนย์กลางโซนใสเท่ากับ 3.15 ± 0.14 และ 5.62 ± 0.25 เซนติเมตร รองลงมาคือ *B. subtilis* ที่มีขนาดการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 2.52 ± 0.10 และ 4.28 ± 0.08 เซนติเมตร สำหรับฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในส่วนของตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบยังคงให้ผลการต้านทานซินนามาลดีไฮด์ได้ดีกว่าแกรมบวกเช่นเดียวกับการทดสอบก่อนหน้า โดยฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. typhimurium* ได้ค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสเท่ากับ 1.70 ± 0.00 และ 1.67 ± 0.05 เซนติเมตร ตามลำดับ และสำหรับฟิล์มที่มีความเข้มข้นสารเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลค่าโซนใสเฉลี่ยเท่ากับ 3.80 ± 0.05 และ 3.67 ± 0.08 เซนติเมตร ตามลำดับ ในส่วนของรา พบว่าแผ่นฟิล์มชุดควบคุมไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ และพบว่าราทั้งสองสายพันธุ์ได้เจริญปกคลุมแผ่นฟิล์มชุดควบคุมนี้ทั้งหมด แต่ยังคงพบโซนใสในบนผิวหน้าอาหารในชุดของแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ โดยพบว่า *A. flavus* ถูกยับยั้งการเจริญได้มากที่สุดในจุลินทรีย์ทดสอบ พบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสเฉลี่ยเท่ากับ 5.25 ± 0.71 และ 8.50 ± 0.00 เซนติเมตร สำหรับฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ *A. niger* สามารถต้านทานการยับยั้งของซินนามาลดีไฮด์ได้ดีกว่า *A. flavus* พบว่าค่าเฉลี่ยของขนาดโซนใสเท่ากับ 2.08 ± 0.19 และ 4.87 ± 0.37 เซนติเมตร สำหรับฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ทั้งสองความเข้มข้นตามลำดับ จึงแสดงให้เห็นว่าในฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์หลังผ่านการอบแห้งยังคงมีปริมาณสารที่มากพอต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ

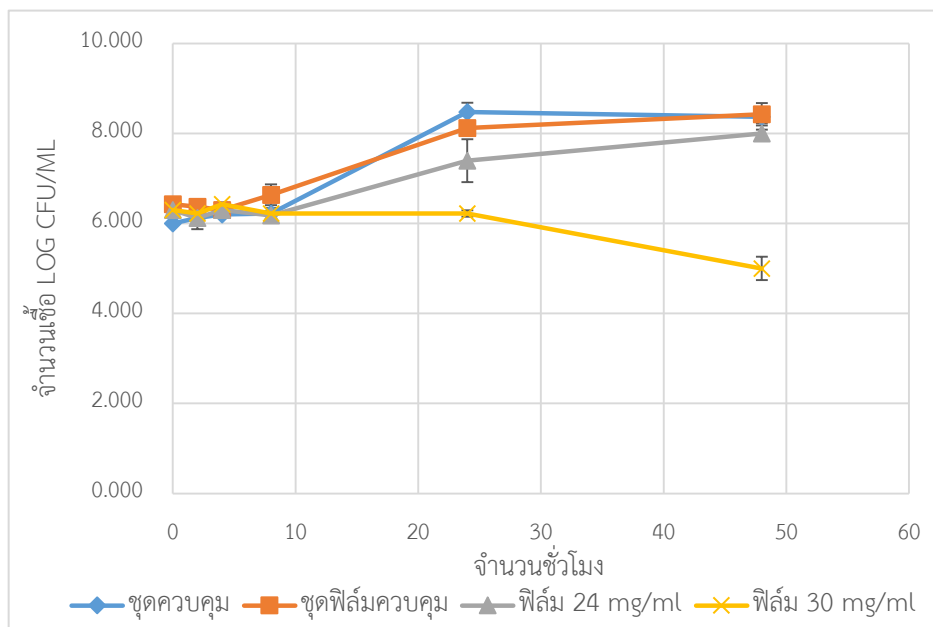


รูปที่ 4.17 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแผ่นฟิล์มควบคุม ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตรต่อการเจริญของแบคทีเรียและราทดสอบโดยวิธี disc diffusion โดยแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หมายเหตุ : ความกว้างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.50 เซนติเมตร ค่าเฉลี่ยศูนย์กลางโซนใสได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

เนื่องจากการคงประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของบรรจุภัณฑ์เอกทิฟขึ้นอยู่กับอัตราการปลดปล่อยสารซึ่งต้องให้เหมาะสมต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมาย ไม่ปล่อยเร็วหรือช้าจนเกินไป จึงติดตามความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ช่วงเวลา 0-48 ชั่วโมง โดยนำแผ่นฟิล์มขนาด 1 ตารางเซนติเมตร มาใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเลี้ยงเหลวและจุลินทรีย์ โดยติดตามจำนวนของแบคทีเรียทดสอบสายพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบผลกับชุดทดลองที่ไม่มีแผ่นฟิล์มและชุดที่เติมแผ่นฟิล์มควบคุมที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ จากรูปที่ 4.18 พบว่า การเจริญของ *S. aureus* ATCC 6538P ในช่วงชั่วโมงที่ 0, 2, 4 และ 8 ยังไม่พบความแตกต่างของปริมาณเชื้อในทุกชุดการทดสอบซึ่งมีปริมาณเชื้อในช่วง 6-6.5 log CFU/ml แต่เมื่อติดตามปริมาณเชื้อถึงช่วงเวลาชั่วโมงที่ 24 พบว่า ในชุดการทดลองที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรยังคงรักษาปริมาณเชื้อไว้อย่างคงที่จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น ในขณะที่ชุดทดสอบอื่นๆ มีปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในชุดควบคุมที่เติม และไม่เติมแผ่นฟิล์มพบว่า มีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 8.125 ± 0.056 และ 8.477 ± 0.205 log CFU/ml ตามลำดับ และพบว่าปริมาณ *S. aureus* ยังคงอยู่ที่ประมาณ 8 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 48 ยกเว้น

ชุดทดสอบของแผ่นฟิล์มผสมสารที่ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเชื้อลดลงมากที่สุดเหลือ 5.000 ± 0.260 log CFU/ml

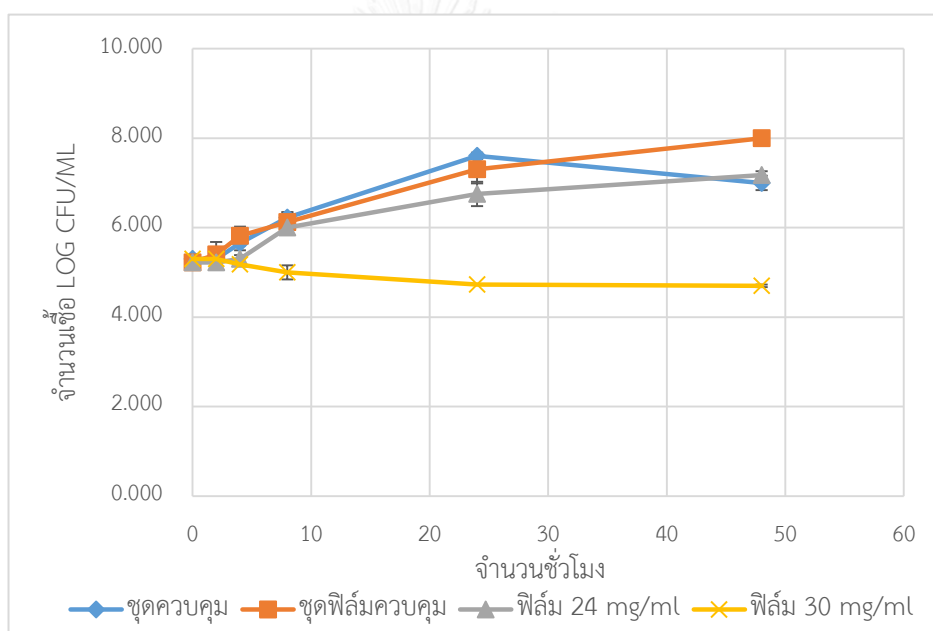


รูปที่ 4.18 จำนวน *S. aureus* ATCC 6538P ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมูลเลอร์ฮินตัน หลังจากเติมแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แผ่นฟิล์มควบคุมและชุดควบคุมบวกที่ไม่เติมแผ่นฟิล์ม ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

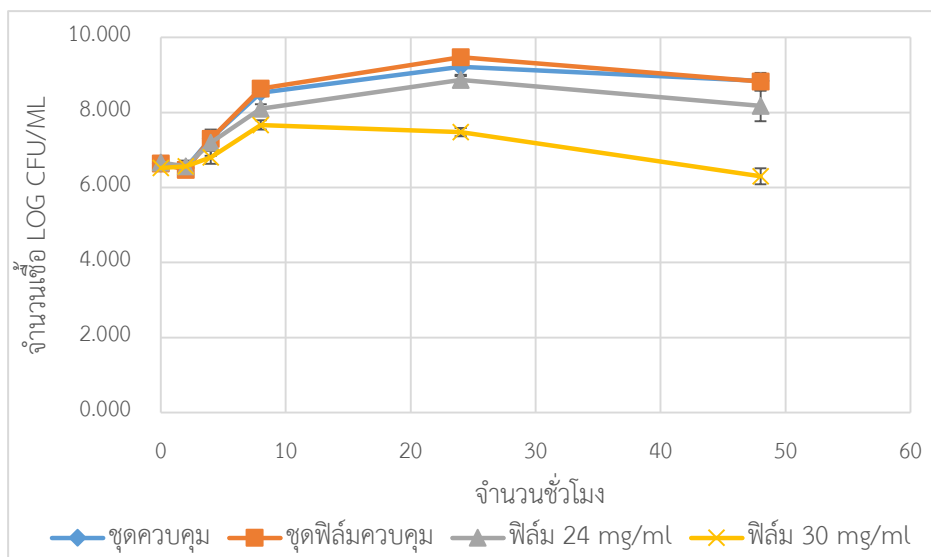
หมายเหตุ : โดยแสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

สำหรับการศึกษการยับยั้งการเจริญของแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร ต่อ *B. subtilis* ATCC 16643 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าในช่วงชั่วโมงที่ 0-2 ยังไม่พบความแตกต่างของปริมาณเชื้อโดยพบปริมาณในช่วง 5.2-5.4 log CFU/ml ในทุกชุดการทดสอบ เมื่อเข้าชั่วโมงที่ 4 พบว่าในชุดการควบคุมทั้งสองชุดมีเริ่มมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นมากกว่าชุดการทดลองที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ และเริ่มมีความแตกต่างด้านปริมาณเพิ่มมากขึ้นในชั่วโมงที่ 8 โดยในชุดการทดลองที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรยังคงมีปริมาณเชื้อที่ 5.000 ± 0.157 log CFU/ml ซึ่งพบว่าปริมาณของ *B. subtilis* เริ่มลดลงจากเริ่มต้น ในขณะที่ชุดการทดลองอื่นๆ พบปริมาณเชื้ออย่างน้อย 6 log CFU/ml ขึ้นไปทุกชุดการทดสอบ เมื่อครบ 24 ชั่วโมงพบว่าชุดการทดสอบมีความชุ่มของอาหารเหลวอย่างชัดเจน เมื่อตรวจปริมาณเชื้อพบว่าชุดควบคุมทั้งสองชุดมีปริมาณสูงขึ้นถึง 7.602 ± 0.072 และ 7.301 ± 0.310 log CFU/ml สำหรับชุดควบคุมที่ไม่ได้

เติม และเติมแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ตามลำดับ พบปริมาณเชื้อ $6.753 \pm 0.272 \log \text{CFU/ml}$ ในชุดที่เติมแผ่นฟิล์ม 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ชุดที่เติมแผ่นฟิล์ม 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบปริมาณเฉลี่ยเชื้อต่ำสุดที่ $4.727 \pm 0.000 \log \text{CFU/ml}$ หลังจากติดตามครบ 48 ชั่วโมงพบว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมแผ่นฟิล์มมีการลดจำนวนลงจนมีจำนวนใกล้เคียงกับชุดการทดสอบที่เติมแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ประมาณ 7-7.1 $\log \text{CFU/ml}$ ในขณะที่ชุดควบคุมที่เติมแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ยังคงพบปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นถึง $8.000 \pm 0.080 \log \text{CFU/ml}$ และสำหรับชุดที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ไม่ให้เพิ่มสูงขึ้นและพบปริมาณต่ำกว่าปริมาณเริ่มต้นที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ $4.699 \pm 0.029 \log \text{CFU/ml}$ ดังแสดงในรูปที่ 4.19



รูปที่ 4.19 จำนวน *B. subtilis* ATCC 16643 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมูลเลอร์ฮินตัน หลังจากเติมแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แผ่นฟิล์มควบคุม และชุดควบคุมบวกที่ไม่เติมแผ่นฟิล์ม ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
หมายเหตุ : โดยแสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง



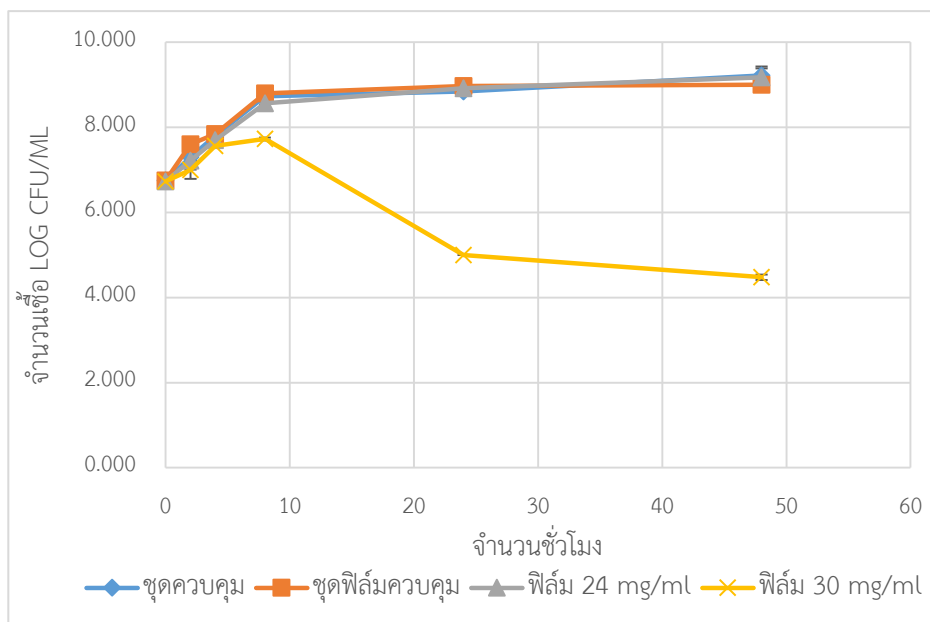
รูปที่ 4.20 จำนวน *E. coli* ATCC 8739 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมูลเลอร์ฮินตัน หลังจากเติมแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แผ่นฟิล์มควบคุม และชุดควบคุมบวกที่ไม่เติมแผ่นฟิล์ม ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

หมายเหตุ : โดยแสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ผลของการเจริญของ *E. coli* ATCC 8739 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหลังจากที่ได้เติมแผ่นฟิล์มทดสอบลงไปเช่นเดียวกับการทดสอบก่อนหน้านี้ ในรูปที่ 4.20 พบว่าที่ 2 ชั่วโมงแรกในทุกชุดการทดลองให้ผลของปริมาณเชื้อใกล้เคียงกันคือประมาณ 6.5-6.7 log CFU/ml เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 4 พบว่าทุกชุดการทดสอบมีจำนวนเชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยที่ชุดควบคุมที่ไม่เติมและเติมแผ่นฟิล์มทั้งสองชุดมีปริมาณเชื้อใกล้เคียงกันที่ 7.308 ± 0.202 และ 7.301 ± 0.120 log/ml ตามลำดับ ชุดการทดลองที่เติมแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีปริมาณเชื้อมากรองลงมาที่ 7.195 ± 0.351 log CFU/ml และพบปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ 6.802 ± 0.170 log CFU/ml สำหรับชุดการที่เติมแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 8 พบว่าปริมาณ *E. coli* ยังคงเพิ่มสูงขึ้นในทุกการทดลองโดยเฉลี่ยประมาณ 1 log CFU/ml เมื่อครบ 24 ชั่วโมงเป็นช่วงเวลา que พบปริมาณเชื้อสูงที่สุด พบปริมาณของเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 9.222 ± 0.220 และ 9.477 ± 0.058 log CFU/ml ในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแผ่นฟิล์ม และที่เติมแผ่นฟิล์มควบคุม ตามลำดับ ที่ 8.865 ± 0.105 log CFU/ml ในชุดการทดสอบที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นในชุดที่เติมฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มลดต่ำลงเหลือ 7.477 ± 0.113 จากเดิม 7.669 ± 0.125 log CFU/ml ในชั่วโมงที่ 8 สำหรับการติดตามในชั่วโมงที่ 48

พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มลงในทุกชุดการทดลอง และลดลงต่ำสุดในชุดที่เติมฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งมีปริมาณเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ $6.301 \pm 0.213 \log \text{CFU/ml}$

ในการศึกษาผลของแผ่นฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ต่อการยับยั้ง *S. typhimurium* MSCU 0492 พบว่ามีแนวโน้มผลการทดลองคล้ายกับผลการทดสอบของแบคทีเรียชนิดก่อนหน้า คือพบปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและลดลงในช่วงหลังๆ ในชุดการทดลองที่เติมแผ่นผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 4.21 โดยในช่วงที่ 0 พบว่าในทุกชุดการทดลองมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเฉลี่ยประมาณ $6.7 \log \text{CFU/ml}$ เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงพบว่าปริมาณเชื้อเพิ่มสูงขึ้นในชุดควบคุมทั้ง 2 ชุด โดยที่ชุดควบคุมที่เติมแผ่นฟิล์มจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นไวที่สุดถึงประมาณ $0.9 \log \text{CFU/ml}$ ตามมาด้วยปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น 0.6 และ $0.5 \log \text{CFU/ml}$ สำหรับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแผ่นฟิล์มและชุดที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับชุดที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเพียงประมาณ $0.3 \log \text{CFU/ml}$ ในช่วงที่ 4 พบว่า *S. typhimurium* ยังคงเพิ่มปริมาณอย่างต่อเนื่องในทุกชุดการทดลองเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 8 พบว่า ปริมาณเชื้อมีค่าสูงชันมากในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแผ่นฟิล์ม และในชุดที่เติมแผ่นฟิล์มควบคุมที่ 8.727 ± 0.030 และ $8.802 \pm 0.140 \log \text{CFU/ml}$ ตามลำดับ ในส่วนของการทดลองที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรยังคงพบว่ามีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับชุดที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 8.564 ± 0.027 และ $7.727 \pm 0.036 \log \text{CFU/ml}$ ตามลำดับ เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบปริมาณเชื้อเหลือเพียง $5.000 \pm 0.000 \log \text{CFU/ml}$ ในขณะที่ชุดการทดสอบอื่นพบปริมาณเชื้อเฉลี่ยประมาณ $8.8-8.9 \log \text{CFU/ml}$ ขึ้นไป หลังติดตามครบ 48 ชั่วโมง ทุกชุดการทดลองยังคงมีปริมาณของเชื้อเพิ่มมากขึ้นถึง $9-9.2 \log \text{CFU/ml}$ ยกเว้นชุดการทดลองที่เติมแผ่นฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่พบปริมาณ *S. typhimurium* เพียง $4.477 \pm 0.062 \log \text{CFU/ml}$ ซึ่งน้อยกว่าชุดการทดลองอื่น



รูปที่ 4.21 จำนวน *S. typhimurium* MSCU 0492 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมูลเลอร์ฮินตัน หลังจากเติมแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แผ่นฟิล์มควบคุม และชุดควบคุมบวกที่ไม่เติมแผ่นฟิล์ม ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง
หมายเหตุ : โดยแสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนแบคทีเรียและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ผลการทดสอบในขั้นตอนนี้กับแบคทีเรียทดสอบทุกชนิดแสดงให้เห็นแนวโน้มคล้ายคลึงกันว่าชุดการทดสอบฟิล์มเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียได้ดีที่สุดใน 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มชุดควบคุมและฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ความเข้มข้นต่ำ (24 mg/ml) ที่พบการเจริญของจุลินทรีย์แบบทวีคูณหรือในระยะ exponential อย่างเห็นได้ชัด

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

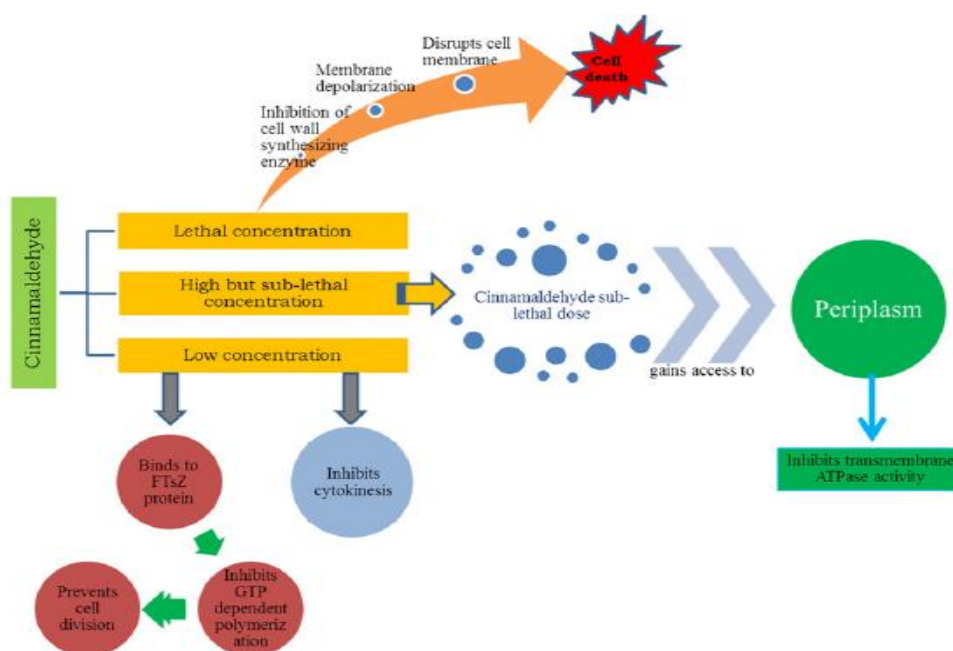
การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์มอลต์ดัดแปลง ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรซึ่งเป็นปริมาณที่พบว่ามีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด (ศุภิสภา เอกเผ่าพันธุ์, 2558) สอดคล้องกับการรายงานของ Cheng และคณะ (2011) ที่กล่าวว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อ *A. pullulans* ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ เพปโตนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน มีความเป็นกรดเบสที่ 4.5 ซึ่งอยู่ต่ำกว่าช่วงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่ 5.5-7.5 (Cheng และคณะ, 2010) เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรดเบสที่สูงขึ้นส่งผลให้สมบัติการละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ลดลง (ศุภิสภา เอกเผ่าพันธุ์, 2558) และสอดคล้องกับการรายงานของ Madi และคณะ (1996) ที่กล่าวว่าภาวะกรดเบสที่เหมาะสมในการผลิตคือ 4.5 เนื่องจากออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จึงเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งช่วงอุณหภูมิในการผลิตที่ดีที่สุดในการผลิตที่อยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส (Finkelman และ Vardanis, 1982, Leathers และคณะ, 1984) และจากการทดลองพบว่าเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้สามารถละลายน้ำทั้งหมดในภาวะการผลิตนี้ ซึ่งมีข้อได้เปรียบอีกมีประการคือ ในระหว่างการผลิตไม่พบการผลิตเม็ดสีจากจุลินทรีย์ ซึ่งช่วยลดขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในทำให้พอลิแซ็กคาไรด์บริสุทธิ์ในขั้นตอนการกำจัดเม็ดสีที่เป็นปัญหาสำคัญออกไปได้

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ วิธีการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก ซึ่งเป็นการตัดพันธะภายในทั้งหมดของพอลิเมอร์ หลังการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง พบว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้ตรงกับน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน และมีผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียว จึงสรุปได้ว่า เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 เป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีเพียงน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงชนิดเดียว เช่นเดียวกันกับผลการวิเคราะห์ของ ศุภิสภา เอกเผ่าพันธุ์ (2558) เนื่องจากคาดว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ คือ พูลูลาน ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์พูลูลานเนสที่มีความจำเพาะในการตัดพันธะ α -(1,6) ไกลโคซิดิก เทียบกับพูลูลานมาตรฐาน (Abdullah และ French, 1970, Wu และคณะ, 2010) เมื่อย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้กับพูลูลานมาตรฐานด้วยพูลูลานเนส แล้วนำผลิตภัณฑ์มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับกราฟมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์จากการย่อยทั้งสองมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกย่อยด้วยพูลูลานเนสมีค่าใกล้เคียงกัน ในชุดควบคุมหรือชุดไม่เติมเอนไซม์พูลูลานเนสไม่พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงให้เห็นว่าหลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตและ พูลูลานถูกทำปฏิกิริยาที่พันธะ α -(1,6) ไกลโคซิดิกแล้วให้น้ำตาลรีดิวซ์เป็นผลิตภัณฑ์ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากทั้งสอง

ตัวอย่างไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับน้ำตาลมอลโทโทรโอสมมาตรฐาน ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงพบว่าค่า retention time ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อฉีดตัวอย่างของผลิตภัณฑ์จากการย่อยจากพอลิแซ็กคาไรด์ทดสอบร่วมกับผลิตภัณฑ์จากการย่อยพุลลูแลนและน้ำตาลมอลโทโทรโอสมมาตรฐาน พบว่าพีคที่พบเป็นพีคที่เวลาเดียวกัน (4.766 นาที) และมีพื้นที่ใต้กราฟเพิ่มมากขึ้น จึงสามารถสรุปได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์จากพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อนี้ คือน้ำตาลมอลโทโทรโอส ซึ่งให้ผลตรงกันกับผลิตภัณฑ์จากพุลลูแลนมาตรฐาน และคาดว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 คือ พุลลูแลน เนื่องจากพุลลูแลนเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียวเป็นองค์ประกอบเชื่อมต่อกันพันธะ α -(1,4) ไกลโคซิดิกทีละ 3 โมเลกุล (มอลโทโทรโอส) และระหว่างมอลโทโทรโอสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -(1,6) ไกลโคซิดิก (Singh และคณะ, 2008, Cheng และคณะ, 2011) ในส่วนของพีคที่เวลา 2.3-2.55 นาที คาดว่าน่าจะเป็นพีคของเกลือที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เหมาะสมต่อการทำงานของคอลัมน์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือจากบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตท

ผลการทดสอบซินนามาลดีไฮด์ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และรา โดยสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้แก่ *S. aureus* ATCC 6538P, *E. coli* ATCC 8739, *S. typhimurium* MSCU 0492, *B. subtilis* ATCC 16643, *A. niger* MSCU 0361 และ *A. flavus* MSCU 0580 ได้ ค่า MIC ที่ได้อยู่ในช่วง 0.0928 ถึง 1.4840 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าซินนามาลดีไฮด์ส่งผลต่อ *S. aureus* ATCC 6538P น้อยที่สุด แต่ส่งผลต่อ *B. subtilis* ATCC 16643 มากที่สุด รองลงมาคือราทั้งสองชนิด สอดคล้องกับการรายงานของ Al-Bayati และ Mohammed (2009) ที่ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ของซินนามาลดีไฮด์ และพบว่าสารชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ในวงกว้าง (ทั้งแบคทีเรียและราทดสอบ) และส่งผลมากที่สุดกับ *B. cereus* มากกว่า *S. aureus*, *E. coli* และ *K. pneumoniae* จากรายงานหลายฉบับได้ระบุว่าซินนามาลดีไฮด์ทำหน้าที่สารยับยั้งราที่มีประสิทธิภาพสูง ดังการรายงานของ Ooi และคณะ (2006) ที่ระบุถึงค่า MIC ของซินนามาลดีไฮด์ต่อราสายใยที่มีค่าอยู่ในช่วง 75 ถึง 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าช่วงค่า MIC ของแบคทีเรียอยู่ที่ 75 ถึง 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถแบ่งการออกฤทธิ์ของซินนามาลดีไฮด์ออกเป็น 3 ระดับจากความเข้มข้นของสาร ได้แก่ ความเข้มข้นสูง (Lethal dose) จะยับยั้งการสังเคราะห์สารที่เกี่ยวข้องในการสร้างผนังเซลล์ ส่งผลโดยตรงกับเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เซลล์ตาย ความเข้มข้นสารสูงแต่ยังไม่ทำให้เชื้อตาย (Sub-lethal dose) ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase และที่ความเข้มข้นต่ำ (Low concentration) จะทำหน้าที่ยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับไซโทไคน์ (cytokine) และเกี่ยวเนื่องกับการแบ่งตัวของเซลล์ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ดังแสดงในรูปที่ 5.1 (Shreaz และคณะ, 2016) การศึกษาผลของซินนามาลดีไฮด์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์

ของ *E. coli* และ *S. aureus* โดย Shen และคณะ (2015) พบว่าเมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะขรุขระ บิดเบี้ยว มีรอยขีดข่วน และจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงให้เห็นถึงไซโทพลาสซึมที่มีลักษณะผิดปกติ คือ มีการกระจุกรวมกันอยู่ฝั่งใดฝั่งหนึ่ง มีการรั่ว เยื่อหุ้มเซลล์แยกตัวออกจากผนังเซลล์ ทำให้เซลล์มีลักษณะบิดเบี้ยวจากการเติมซินนามาลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้เกิดความเสียหายอย่างถาวรแก่เซลล์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นขึ้นก็ยิ่งทำให้เกิดความเสียหายรุนแรงมากขึ้นต่อเซลล์ ซึ่งการที่ซินนามาลดีไฮด์ส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์นี้จะทำให้มีผลโดยตรงต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ (Burt, 2004, Apostolidis และคณะ, 2008)



รูปที่ 5.1 แสดงรูปแบบการออกฤทธิ์ของซินนามาลดีไฮด์ต่อการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (Shreaz และคณะ, 2016)

การนำพอลิแซ็กคาไรด์มาประยุกต์ใช้เป็นสารละลายฟิล์มโดยใช้พอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณ 7% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรผสมกับกลีเซอรอล 1.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ศุภิสภา เอกเผ่าพันธุ์, 2558) กลีเซอรอลทำหน้าที่เป็นพลาสติกไซเซอร์เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นแก่แผ่นฟิล์ม ช่วยลดแรงเค้นภายในโครงสร้างของเนื้อฟิล์ม และช่วยลดแรงระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์ทำให้เกิดความยืดหยุ่นอ่อนตัว ทำให้ฟิล์มไม่เปราะ แข็ง และแตกหักง่าย (Cazón และคณะ, 2017) จากนั้นนำสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์มาผสมกับซินนามาลดีไฮด์ซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมัน สามารถผสมเข้าเป็นสารเนื้อเดียวกันได้โดยไม่เกิดการแยกชั้น เนื่องจากไฮโดรคอลลอยด์ส่วนใหญ่มีสมบัติการเป็นสารให้ความ

เสถียร สามารถทำให้น้ำมันอยู่รวมกับน้ำได้หรือที่เรียกว่า อิมัลชัน ซึ่งมีสมมติฐานของสมบัตินี้เกิดจากที่แกนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะชอบน้ำมีกลุ่มของสารเคมีที่ไม่มีขั้วที่ติดอยู่ และการที่พอลิแซ็กคาไรด์มีองค์ประกอบของโปรตีนซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาแลนต์ (Dickinson, 2009) หลังจากลองทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในรูปของสารละลายด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า สารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์เพียงอย่างเดียวไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Gniewosz และคณะ (2014), Singh และคณะ (2008) ที่ไม่พบสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์จากฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์หรือพอลิแลนเช่นเดียวกัน หลังจากทดสอบสารละลายฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ค่าความเข้มข้น MIC (1.5 mg/ml) ที่ครอบคลุมทุกเชื้อทดสอบจากการทดลองก่อนหน้านี้ยังไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ เนื่องจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์อาจเจือจางหรือกักซินนามาลดีไฮด์ไว้ภายในเนื้อสารทำให้ประสิทธิภาพลดลง จึงแพร่ออกมาได้ช้า และมีความเข้มข้นไม่เพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Balaguer และคณะ, 2013) เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดลองแบบเดียวกันที่ไม่ผสมสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์และใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายเจือจางซินนามาลดีไฮด์ เป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายและไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Al-Bayati และ Mohammed, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าชุดควบคุมหรือชุดที่เติม DMSO ไม่มีการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบ ในการทดลองนี้พบว่าที่ความเข้มข้น MIC พบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกการทดสอบจึงเป็นการยืนยันว่า การผสมสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ส่งผลให้การแสดงออกของซินนามาลดีไฮด์ลดลง จากผลการทดลองพบว่าสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ที่มีลิโปพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่มีสมบัติชอบน้ำเป็นองค์ประกอบและทำหน้าที่ป้องกันสารโมเลกุลใหญ่ สารที่ไม่ชอบน้ำหรือไม่มีขั้ว หรือสารจำพวกสารประกอบเอกทิฟไมให้เข้าสู่เซลล์ (Burt, 2004, Balaguer และคณะ, 2013, Gniewosz และคณะ, 2014) สำหรับ *S. aureus* ATCC 6538P ที่มีค่าการยับยั้งสูงที่สุดในแบคทีเรีย อาจเป็นเพราะเจริญเติบโตช้าเมื่อเทียบกับแบคทีเรียทดสอบอื่นที่เวลาและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ทำให้ซินนามาลดีไฮด์แพร่ออกมาที่ความเข้มข้นสูงเกินกว่าที่จะทนได้จึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้ และส่งผลให้มีโซนการยับยั้งมากที่สุด แตกต่างจากผลในขั้นตอนทดสอบหาค่า MIC เนื่องจากในขั้นตอนทดสอบนั้นได้เติม *S. aureus* ที่อยู่ในช่วงที่เอกทิฟจำนวนมากลงไปตั้งแต่แรกทำให้สามารถทนต่อสารได้ดีกว่า สำหรับการคัดเลือกความเข้มข้นที่จะนำไปขึ้นรูปแผ่นฟิล์มจึงอาศัยผลการทดสอบที่พบว่าสารละลายฟิล์มที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลการยับยั้งโดยรวมดีที่สุด และการเติมซินนามาลดีไฮด์ความเข้มข้นสูงกว่านี้ไม่ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากพบซินนามาลดีไฮด์ติดค้างอยู่ในก้นหลุมหลังจากบ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นส่วนของสารที่ไม่สามารถแพร่ออกไปได้ จึงเลือกสารละลายฟิล์มที่

ผสมสารเข้มข้น 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับชั้นรูปฟิล์ม นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ส่งผลต่อ *A. flavus* MSCU 0580 มากที่สุดโดยมีค่าศูนย์กลางโซนใส 8.5 เซนติเมตร หรือไม่พบการเจริญของราบนานอาหารเลี้ยงเชื้อเลยตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

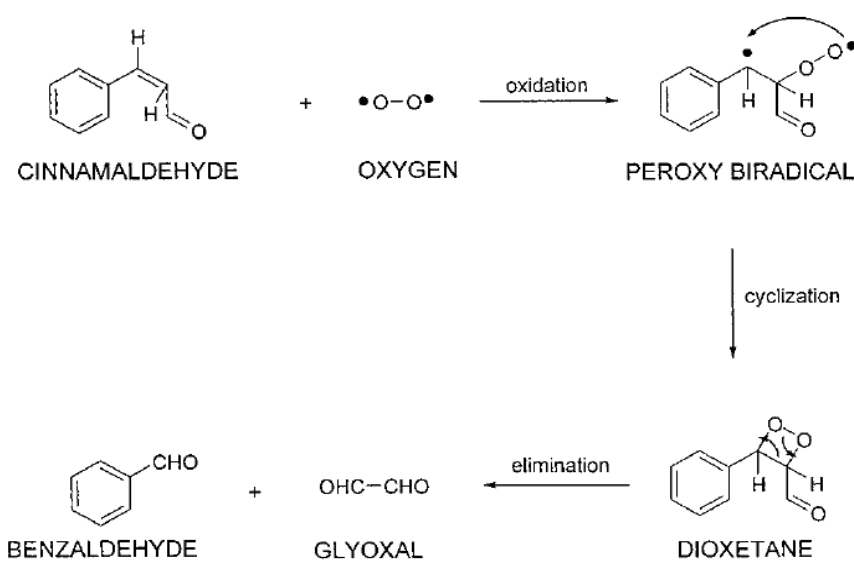
การศึกษาลักษณะภายนอกและสมบัติของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จากแผ่นฟิล์มควบคุมพบว่ากลีเซอรอลสามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกันกับแผ่นฟิล์ม ไม่มีรู หรือหลุมบนผิวหน้า การเติมซินนามาลดีไฮด์ส่งผลต่อลักษณะของแผ่นฟิล์ม เนื่องจากสารไม่ได้รวมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับฟิล์ม แต่มีลักษณะถูกกักอยู่ในเนื้อฟิล์มในลักษณะเป็นหยดกลมๆ เล็กๆ กระจายอยู่ทั่วแผ่นฟิล์ม ยิ่งเติมซินนามาลดีไฮด์มากทำให้มีความหนาแน่นของหยดสารเพิ่มขึ้น และส่งผลให้ฟิล์มขรุขระที่บริเวณผิวหน้า การเติมสารส่งผลต่อความหนาของแผ่นฟิล์ม โดยที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้ความหนาสูงสุด คือ 0.12 ± 0.017 มิลลิเมตร เทียบกับฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์หรือชุดควบคุมมีความหนาดำสุดที่ 0.10 ± 0.014 มิลลิเมตรที่ปริมาตรสารละลายฟิล์ม 30 มิลลิตร เช่นเดียวกับแผ่นฟิล์มพอลูลูแลนในชุดควบคุมของ Gniewosz และคณะ (2014) ที่พบว่ากลีเซอรอลรวมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันกับแผ่นฟิล์มพอลูลูแลน และพบว่า การเติมสารสกัดจากพืชส่งผลให้ฟิล์มชีวภาพมีความหนาเพิ่มขึ้นตามโดยแปรผันตามปริมาณสารที่มากขึ้น (Zivanovic และคณะ, 2005, Gniewosz และคณะ, 2014) เนื่องจากซินนามาลดีไฮด์ไปแทรกตัวอยู่ระหว่างชั้นเนื้อฟิล์มจึงทำให้มีความหนาเพิ่มขึ้น ซินนามาลดีไฮด์ยังทำให้แผ่นฟิล์มมีกลิ่นของอบเชย ความอ่อนนุ่มยืดหยุ่นกว่าชุดฟิล์มควบคุม เนื่องจากซินนามาลดีไฮด์สามารถทำหน้าที่เป็นพลาทีไทเซอร์ได้อีกด้วย (Nostro และคณะ, 2012)

นอกจากนี้การเติมซินนามาลดีไฮด์ยังส่งผลต่อสีของแผ่นฟิล์ม จากวัตรรชนีค่าสีด้วยเครื่องโครมามิเตอร์ พบว่าฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไป (30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่มีผลต่อค่าความสว่าง (L^*) ในทางสถิติ แต่มีผลต่อค่าความเขียว (a^*) และเหลือง (b^*) มากยิ่งขึ้น ทำให้มีค่าความแตกต่างจากแผ่นสีขาวมาตรฐาน หรือดรชนีการเปลี่ยนแปลงของสี (ΔE^*) มากที่สุดเท่ากับ 19.080 ± 3.638 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมและฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากซินนามาลดีไฮด์เป็นของเหลวที่เหลืองใส ดังนั้นในส่วนของคุณค่าความเหลืองของแผ่นฟิล์มคาดว่าเป็นสีที่ได้โดยตรงจากสาร ซึ่งผลจากสีของฟิล์มอาจส่งผลต่อการยอมรับและเลือกซื้อสินค้าของผู้บริโภค (Wu และคณะ, 2010) เนื่องจากปริมาณน้ำเป็นปัจจัยภายใน (Intrinsic factors) ของบรรจุภัณฑ์โดยตรงที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและชีวภาพในผลิตภัณฑ์ (Kaewprachu และ Rawdkuen, 2016) การทดสอบวัดค่าการซึมผ่านไอน้ำ (WVP) พบว่าฟิล์มที่ผสมสาร 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าการซึมผ่านไอน้ำต่ำที่สุดที่ 1.295 ± 0.010 กรัมมิลลิเมตรต่อชั่วโมงต่อตารางเมตรต่อกิโลพาสคาล และมีความ

แตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการเติมซินนามาลดีไฮด์จึงช่วยป้องกันการเข้าออกของน้ำได้อาจเป็นเพราะหดยของสารที่มีลักษณะเป็นน้ำมันแทรกอยู่ระหว่างเนื้อฟิล์มช่วยกันการเข้าออกของไอน้ำจึงทำให้การซึมผ่านเป็นไปได้ยากขึ้น สอดคล้องกับการรายงานของ Zivanovic และคณะ (2005) ที่ทดลองนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชมาผสมกับฟิล์มไคโทซาน แล้วพบว่าสารสกัดจากพืชช่วยลดค่าการซึมผ่านไอน้ำให้ลดลง และยังช่วยส่งเสริมสมบัติเชิงกลของฟิล์มให้ดียิ่งขึ้น เช่น การยืดตัว การทนแรงดึง แต่แตกต่างจากการรายงานผลของ Rojas-Grau และคณะ (2007) ที่ระบุว่า การเติมสารสกัดจากพืชไม่มีส่วนช่วยลดค่าการซึมผ่านน้ำของฟิล์มแอลจีเนตผสมมะเขือเทศ (alginate-apple puree edible film) ฟิล์มชีวภาพที่มีสมบัติการต้านซึมผ่านไอน้ำจึงเหมาะสำหรับการประยุกต์ใช้ในอาหารที่ต้องป้องกันการสูญเสียน้ำ (Cazón และคณะ, 2017) เช่น ผัก และผลไม้ ซึ่งปัญหาของสินค้าเหล่านี้คือการเสียน้ำ ที่จะส่งผลต่อน้ำหนัก ความเหี่ยว ความกรอบและความสดใหม่ของสินค้า (Gniewosz และคณะ, 2014) ในประเทศญี่ปุ่นมีการนำฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์มาประยุกต์ใช้ทางการค้ามาหลายปี โดยเคลือบบนเนื้อสัตว์ก่อนที่จะนำไปรมควัน หรือนึ่งไอน้ำ โดยในระหว่างกระบวนการจะให้ฟิล์มละลายและรวมเข้ากับผิวเนื้อสัตว์ทำให้ได้เนื้อสัมผัสที่ดี คงน้ำหนักผลิตภัณฑ์ และป้องกันการสูญเสีย น้ำของเนื้อได้ดี (Cutter, 2006)

เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติในการอุ้มน้ำ และทนความร้อนได้ดี (ศุภิกา เอกเผ่าพันธุ์, 2558) จึงใช้ความร้อนในระเหยตัวทำละลายหรือน้ำออกในขั้นตอนการขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม ทำให้เกิดการสูญเสียซินนามาลดีไฮด์ไปในระหว่างขั้นตอนนี้ จึงติดตามปริมาณของสารที่หลงเหลืออยู่ที่ช่วงเวลาต่างๆ ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี หลังจากอบแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่อุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง พบว่าเหลือซินนามาลดีไฮด์อยู่เพียงร้อยละ 28.53 และ 32.87 ในฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ความเข้มข้น 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ben Arfa และคณะ (2007) ที่พบว่า การนำซินนามาลดีไฮด์มาผสมกับสารเคลือบผิวกับ soy protein isolate และ octenyl-succinate modified starch เมื่อนำไปทำให้แห้งพบว่าซินนามาลดีไฮด์สูญหายไป 43-76% ซึ่งในสารเคลือบจากแป้งจะมีร้อยละสูญหายสูงกว่า แสดงให้เห็นว่าซินนามาลดีไฮด์เป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ดังในรายงานของ Friedman และคณะ (2000) ที่ระบุว่าซินนามาลดีไฮด์ในภาวะที่มีออกซิเจนจะทำให้ไม่เสถียรต่อความร้อน (heat-induced) ตรงบริเวณพันธะระหว่างคาร์บอน (carbon-carbon bond) จะถูกตัดกลายเป็นเบนซาลดีไฮด์ (benzaldehyde) และไกลออกซอล (glyoxal) ส่งผลให้ปริมาณของซินนามาลดีไฮด์ลดลงตามระยะเวลาและอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5.2 ในส่วนของซินนามาลดีไฮด์ที่พบเป็นองค์ประกอบสารเอกทิวในน้ำมันอบเชย ซินนามาลดีไฮด์ในรูปแบบนี้สามารถทนต่อความร้อนได้ เนื่องจากมียูจินอลเป็นองค์ประกอบร่วม แต่ในด้านกลไกยังคงไม่ปรากฏแน่ชัด แต่คาดว่า เป็นผลมาจากสมบัติการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของยูจินอลจึงทำให้ลดการเกิดปฏิกิริยาระหว่างออกซิเจนและซินนา

มาลดีไฮด์ลงได้ (Wong, 1989) หลังจากติดตามปริมาณสารครบ 5 สัปดาห์ พบว่าปริมาณของสาร ค่อยๆ ลดลงในแต่ละสัปดาห์ แต่พบว่าสีของฟิล์มเข้มข้นตามระยะเวลาเก็บฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่นาน ขึ้น เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของซินนามาลดีไฮด์กับอากาศ (Weast และคณะ, 1988) และ ฟิล์มทดสอบยังคงเหลือซินนามาลดีไฮด์ปริมาณ 3.60 และ 5.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในฟิล์มผสม สารความเข้มข้น 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ ผสมซินนามาลดีไฮด์สามารถคงมีปริมาณสารที่มีค่าสูงกว่าค่า MIC ได้นานอย่างน้อย 5 สัปดาห์



รูปที่ 5.2 กลไกสันนิษฐานของการเปลี่ยนโครงสร้างซินนามาลดีไฮด์ไปเป็นเบนซาลดีไฮด์และไกลออกซอล (Balaguer และคณะ, 2013)

การทดสอบเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ภายหลังจากการอบฟิล์มให้แห้งแล้วตัดแผ่นฟิล์มมาวางทดสอบการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ทดสอบ พบว่าแผ่นฟิล์มที่ไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์หรือชุดควบคุมไม่พบความสามารถในการยับยั้งการ เจริญของจุลินทรีย์ทดสอบทุกสายพันธุ์ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบของสารละลายฟิล์มใน ขั้นตอนก่อนหน้า แต่ฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ยังคงพบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ทดสอบทุกสายพันธุ์ แต่ประสิทธิภาพลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายฟิล์มที่ความ เข้มข้นสารเดียวกัน ยกตัวอย่างเช่น ที่ความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในรูป ของสารละลายฟิล์มสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* MSCU 0580 ได้ทั้งหมดบนจานอาหาร เลี้ยงเชื้อ ในขณะที่เป็นฟิล์มที่ผ่านความร้อนจากการอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งหมด แสดงให้

เห็นว่าผลที่ได้เป็นไปตามการติดตามปริมาณของสารในแผ่นฟิล์มจากการทดลองก่อนหน้าคือ มีการสูญเสียซินนามาลดีไฮด์ไปในขั้นตอนการอบแห้ง และมีการแสดงประสิทธิภาพไม่เต็มที่อาจมีสาเหตุจากการที่สารถูกกักอยู่ภายในฟิล์ม และไม่ได้สัมผัสเชื้อโดยตรงเหมือนในรูปของสารละลายฟิล์ม กลไกการปลดปล่อยสารซินนามาลดีไฮด์ออกจากฟิล์ม คือ ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ทำหน้าที่เป็นสารที่นำมาห่อหุ้ม (wall material, shell) โดยกักซินนามาลดีไฮด์ที่เป็นสารถูกยึดจับ (core material) ไว้ภายในโดยอาศัยหลักการเอนแคปซูลชัน (encapsulation) เมื่อตัวฟิล์มสัมผัสกับน้ำหรือตัวทำละลาย ส่งผลให้ฟิล์มละลายและปล่อยสารภายในออกมา (Gibbs, 1999) ดังนั้นจึงสามารถควบคุมการปลดปล่อยสารให้ดำเนินต่อเนื่อง และคงประสิทธิภาพของการต้านจุลินทรีย์ไว้ได้นานยิ่งขึ้น พบว่าฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรยังคงมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการติดตามการปลดปล่อยสาร และประสิทธิภาพของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ในช่วง 4 ชั่วโมงแรก หลังจากฟิล์มทดสอบลงไปในหลอดทดสอบที่มีแบคทีเรียแขวนลอยอยู่ พบว่าจำนวนของ *S. aureus* ในช่วง 8 ชั่วโมงแรกของการทดสอบมีปริมาณแตกต่างจากชั่วโมงที่ 0 ไม่มาก เนื่องจากปริมาณซินนามาลดีไฮด์ถูกปลดปล่อยออกจากฟิล์มน้อย และเป็นช่วงที่แบคทีเรียกำลังอยู่ในระหว่างการปรับตัว ในการถูกถ่ายมาสู่อาหารใหม่ทำให้แบคทีเรียปรับภาวะจึงทำให้ปริมาณของจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ (Buchanan, 1918) เนื่องจากยังไม่มีกรยับยั้งของสารและการเพิ่มจำนวนของ *S. aureus* หรือมีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตาย ในส่วนของ *B. subtilis*, *E. coli* และ *S. typhimurium* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 แตกต่างจาก *S. aureus* อาจเป็นเพราะลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีระยะเวลาแบ่งตัว (generation time) ที่สั้นกว่าจึงสามารถเพิ่มปริมาณได้ไวเทียบกับซินนามาลดีไฮด์ถูกปลดปล่อยออกยังคงมีปริมาณไม่มากพอที่จะยับยั้งการเจริญได้ทันการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียจึงทำให้แนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น พบโดยภาพรวมชุดควบคุมที่เติมฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ผสมสารพบปริมาณการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบมากกว่าในชุดควบคุมที่ไม่เติมแผ่นฟิล์ม คาดว่าเป็นเพราะแบคทีเรียสามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์มาเป็นแหล่งอาหารในการเจริญเติบโตนอกเหนือจากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในชุดทดสอบ และยังพบว่าในชั่วโมงที่ 48 ชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแผ่นฟิล์มผสมสาร ปริมาณเชื้อแบคทีเรียมีแนวโน้มลดจำนวนลง อาจมีสาเหตุจากการเริ่มมีการตายของแบคทีเรียสารอาหารเริ่มหมด มีการสะสมของสารพิษ ทำให้จุลินทรีย์เริ่มเข้าสู่ระยะเซลล์ตาย (Buchanan, 1918, Roszak และ Colwell, 1987) ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่เติมแผ่นฟิล์มไม่ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ยังไม่พบแนวโน้มการลดลงของจำนวนแบคทีเรีย ในชุดทดสอบที่เติมแผ่นฟิล์มผสมสาร 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรพบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แต่ได้ในปริมาณไม่มากเมื่อเทียบกับชุดทดสอบที่เติมฟิล์มผสมสาร 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร คาดว่าปริมาณ

สารที่ถูกปล่อยออกจากเนื้อฟิล์มไม่มากเพียงพอกับปริมาณแบคทีเรียที่อยู่ในหลอดทดลอง จึงมีการยับยั้งการเจริญที่ต่ำกว่า และส่งผลให้แบคทีเรียสามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์ไปเป็นแหล่งอาหารได้ สำหรับชุดการทดสอบที่ให้ผลการยับยั้งไม่ทำให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนและยังลดปริมาณของแบคทีเรียในชั่วโมงที่ 48 ได้ดีที่สุด คือ ฟิล์มผสมซินนามาลดีไฮด์ปริมาณ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ของชุดทดสอบฟิล์มชนิดนี้ พบว่า *S. aureus* ATCC 6538P มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างน้อย 1 log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณตั้งต้น หรืออย่างน้อย 3 log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อในชุดควบคุม สำหรับ *B. subtilis* ATCC 16643 มีปริมาณลดลงจากชั่วโมงที่ 0 ประมาณ 0.6 log CFU/ml และต่ำกว่าชุดควบคุมที่เวลาเดียวกัน 2.3-3.3 log CFU/ml ในการทดสอบเชื้อ *E. coli* ATCC 8739 พบว่าที่ชั่วโมงที่ 48 มีปริมาณน้อยกว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นเล็กน้อย แต่พบว่าน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างน้อย 2.5 log CFU/ml และชุดการทดลองนี้ สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. typhimurium* MSCU 0492 ได้สูงที่สุดถึง 4.5-4.7 log CFU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และลดปริมาณเชื้อลงได้ประมาณ 2.5 log CFU/ml เมื่อเทียบกับปริมาณตั้งต้นในชั่วโมงที่ 48 นี้ จึงสามารถสรุปได้ว่า ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบไม่ให้เพิ่มจำนวนซึ่งเป็นสาเหตุหลักของการเน่าเสียสำหรับอาหารอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากแผ่นฟิล์มชีวภาพ จำเป็นต้องใช้พอลิแซ็กคาไรด์จำนวนมาก ควรขยายขนาดการผลิต เพื่อให้เพียงพอต่อการใช้งานโดยการใช้อย่างหนัก หรือใส่ปัจจัยส่งเสริมการผลิตเพิ่มเติม เป็นต้น
2. ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางเคมีนอกเหนือจากการพิสูจน์ทางชีวภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 เพิ่มเติม เช่น เทคนิควิธี Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) เพื่อหาหมู่ฟังก์ชัน Mass spectrometry (MS) เพื่อหาโมเลกุล และ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) เพื่อตรวจสอบเคมีคอลชิฟ (chemical shift) เป็นการยืนยันโครงสร้างว่าเป็นพอลูลูแลนหรือไม่
3. ทดสอบหาสมบัติของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ประยุกต์เพิ่มเติม เพื่อที่จะได้ฟิล์มชีวภาพที่ได้มาประยุกต์ให้เหมาะสมตามคุณสมบัติ เช่น วัดค่าการซึมผ่านแก๊ซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ วัดค่าแรงต้านทานการดึง (tensile strength) ค่าความยืดตัวของแผ่นฟิล์ม (elongation) เป็นต้น
4. จากการทดสอบพบว่า การเติมซินนามาลดีไฮด์ลงไปบนแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ให้ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและราได้ดี และมีการสูญเสียสารไปมากในขั้นตอนการอบแห้ง

จึงควรหาสารมาใส่รวมกันเพื่อลดการสูญหาย หรือปรับปรุงวิธีการเตรียมแผ่นฟิล์มเพื่อให้คงสารออกฤทธิ์ไว้ให้มากที่สุด เป็นต้น

5. ควรมีการติดตามปริมาณซินนามาติไฮด์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเนื้อฟิล์ม เพื่อให้ทราบถึงปริมาณแท้จริงของสารออกฤทธิ์ในการทดลองต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์
6. เพื่อต่อยอดจุดประสงค์ของแผ่นฟิล์มชีวภาพที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ควรลองทดสอบประสิทธิภาพของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาติไฮด์บนอาหารจริงเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา เช่น ผัก ผลไม้ และเนื้อสัตว์ เป็นต้น และติดตามการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์



รายการอ้างอิง

Abarca, M., Bragulat, M., Castella, G., et al. Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Applied and Environmental Microbiology*. **60** (7): 2650-2652. (1994).

Abdullah, M. and French, D. Substrate specificity of pullulanase. *Archives of biochemistry and biophysics*. **137** (2): 483-493. (1970).

Aitzetmüller, K. Sugar analysis by high-performance liquid chromatography using silica columns. *Journal of Chromatography A*. **156** (2): 354-358. (1978).

Al-Bayati, F. A. and Mohammed, M. J. Isolation, identification, and purification of cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark oil. An antibacterial study. *Pharmaceutical Biology*. **47** (1): 61-66. (2009).

Apolinario, A. C., de Lima Damasceno, B. P. G., de Macêdo Beltrão, N. E., et al. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate polymers*. **101** 368-378. (2014).

Apostolidis, E., Kwon, Y.-I. and Shetty, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. *International journal of food microbiology*. **128** (2): 317-324. (2008).

Appendini, P. and Hotchkiss, J. H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **3** (2): 113-126. (2002).

Ara, K., Saeki, K., Igarashi, K., et al. Purification and characterization of an alkaline amylopullulanase with both α -1, 4 and α -1, 6 hydrolytic activity from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-1378. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. **1243** (3): 315-324. (1995).

Association, F. E. M. Survey of flavoring ingredient usage levels. *Food Technology, Champaign*. **19** (2): 155. (1965).

Balaguer, M. P., Lopez-Carballo, G., Catala, R., et al. Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread foodstuffs. *International journal of food microbiology*. **166** (3): 369-377. (2013).

Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O. and Baker, R. A. Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. **35** (6): 509-524. (1995).

Baratta, M. T., Dorman, H., Deans, S. G., et al. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour and fragrance journal*. **13** (4): 235-244. (1998).

Barnes, J. High performance liquid chromatography. John Wiley & Sons. (1992)

Becker, A., Katzen, F., Pühler, A., et al. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied microbiology and biotechnology*. **50** (2): 145-152. (1998).

Beech, I. B. and Tapper, R. C. Exopolymers of sulphate-reducing bacteria. *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Springer: 119-126. (1999)

BeMiller, J. N. and Whistler, R. L. *Industrial gums: polysaccharides and their derivatives*. New York, Academic Press, INC. (1973)

Ben Arfa, A., Preziosi-Belloy, L., Chalier, P., et al. Antimicrobial paper based on a soy protein isolate or modified starch coating including carvacrol and cinnamaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **55** (6): 2155-2162. (2007).

Bernier, B. The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter. *Canadian journal of microbiology*. **4** (3): 195-204. (1958).

Beuer, R. Physiology of *Dematium pullulans* de Bary. *Zentralbl Bacteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt2*. **98** 133-167. (1938).

Buchanan, R. Life phases in a bacterial culture. *The Journal of Infectious Diseases*. 109-125. (1918).

Bulmer, M. A., Catley, B. J. and Kelly, P. J. The effect of ammonium ions and pH on the elaboration of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan, by *Aureobasidium pullulans*. *Applied microbiology and biotechnology*. **25** (4): 362-365. (1987).

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*. **94** (3): 223-253. (2004).

Campana, S., Ganter, J., Milas, M., et al. On the solution properties of bacterial polysaccharides of the gellan family. *Carbohydrate research*. **231** 31-38. (1992).

Carvalho, R. L., Cabral, M. F., Germano, T. A., et al. Chitosan coating with trans-cinnamaldehyde improves structural integrity and antioxidant metabolism of fresh-cut melon. *Postharvest Biology and Technology*. **113** 29-39. (2016).

Catley, B. Role of pH and nitrogen limitation in the elaboration of the extracellular polysaccharide pullulan by *Pullularia pullulans*. *Applied microbiology*. **22** (4): 650-654. (1971).

Catley, B. The extracellular polysaccharide, pullulan, produced by *Aureobasidium pullulans*: a relationship between elaboration rate and morphology. *Microbiology*. **120** (1): 265-268. (1980).

Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., et al. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food hydrocolloids*. **68** 136-148. (2017).

Cerning, J., Renard, C., Thibault, J., et al. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*. **60** (11): 3914-3919. (1994).

Chaibenjawong, P. and Foster, S. J. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Archives of microbiology*. **193** (2): 125-135. (2011).

Cheng, K.-C., Demirci, A. and Catchmark, J. M. Effects of plastic composite support and pH profiles on pullulan production in a biofilm reactor. *Applied microbiology and biotechnology*. **86** (3): 853-861. (2010).

Cheng, K.-C., Demirci, A. and Catchmark, J. M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*. **92** (1): 29. (2011).

Chi, Z., Liu, J. and Zhang, W. Trehalose accumulation from soluble starch by *Saccharomycopsis fibuligera* sdu. *Enzyme and Microbial Technology*. **28** (2): 240-245. (2001).

Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., et al. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied microbiology and biotechnology*. **82** (5): 793-804. (2009).

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports*. **5** (1): 58-65. (2013).

Coleman, R. J., Patel, Y. N. and Harding, N. E. Identification and organization of genes for diutan polysaccharide synthesis from *Sphingomonas* sp. ATCC 53159. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. **35** (4): 263-274. (2008).

Cutter, C. N. Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods. *Meat science*. **74** (1): 131-142. (2006).

da Silva, G. T., Voss, G. T., Kaplum, V., et al. Development, characterization and biocompatibility of chondroitin sulfate/poly (vinyl alcohol)/bovine bone powder porous biocomposite. *Materials Science and Engineering: C*. **72** 526-535. (2017).

Damien Dorman, H., Deans, S. G., Noble, R. C., et al. Evaluation in vitro of plant essential oils as natural antioxidants. *Journal of Essential Oil Research*. **7** (6): 645-651. (1995).

de Oliveira, M. R., da Silva, R. S. S. F., Buzato, J. B., et al. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal*. **37** (2): 177-183. (2007).

de Oliveira, S. A., da Silva, B. C., Riegel-Vidotti, I. C., et al. Production and characterization of bacterial cellulose membranes with hyaluronic acid from chicken comb. *International Journal of Biological Macromolecules*. **97** 642-653. (2017).

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A. and Voilley, A. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science*. **38** (4): 299-313. (1998).

DesMarais, T. A. (1982). Extrusion process for thermoplastic resin composition for fabric fibers with exceptional strength and good elasticity, Google Patents.

Dhanapal, A., Rajamani, L. and Banu, M. S. Edible films from polysaccharides. *Food Science and Quality Management*. (2012).

Dickinson, E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food hydrocolloids*. **23** (6): 1473-1482. (2009).

Donnenberg, M. S. and Finlay, B. B. Combating enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections: the way forward. *Trends in microbiology*. **21** (7): 317-319. (2013).

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J., et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate polymers*. **87** (2): 951-962. (2012).

Doyle, M. P. and Buchanan, R. L. Food microbiology: fundamentals and frontiers. American Society for Microbiology Press. (2012)

Duan, X., Chi, Z., Wang, L., et al. Influence of different sugars on pullulan production and activities of α -phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68. *Carbohydrate polymers*. **73** (4): 587-593. (2008).

El-Saied, H., Basta, A. H. and Gobran, R. H. Research progress in friendly environmental technology for the production of cellulose products (bacterial cellulose and its application). *Polymer-Plastics Technology and Engineering*. **43** (3): 797-820. (2004).

Endo, H. and Rees, T. D. Clinical features of cinnamon-induced contact stomatitis. *Compendium newtown*. **27** (7): 403. (2006).

Fersht, A. Enzyme structure and mechanism. (1985).

Films, D. Particle Science, Drug Development Services. *Technical Brief*. **3** (2010).

Filtborg, O., Frisvad, J. C. and Thrane, U. Moulds in food spoilage. *International journal of food microbiology*. **33** (1): 85-102. (1996).

Finkelman, M. and Vardanis, A. Simplified microassay for pullulan synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. **43** (2): 483-485. (1982).

Fischer, B., Dieckmann, U. and Taborsky, B. When to store energy in a stochastic environment. *Evolution*. **65** (5): 1221-1232. (2011).

Forbes, G. B. Glycogen storage disease: report of a case with abnormal glycogen structure in liver and skeletal muscle. *The Journal of pediatrics*. **42** (6): 645-653. (1953).

Freitas, F., Alves, V. D. and Reis, M. A. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in biotechnology*. **29** (8): 388-398. (2011).

Friedman, M., Kozukue, N. and Harden, L. A. Cinnamaldehyde content in foods determined by gas chromatography– mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **48** (11): 5702-5709. (2000).

Gandhi, N. S. and Mancera, R. L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical biology & drug design*. **72** (6): 455-482. (2008).

Garcia-Ochoa, F., Santos, V., Casas, J., et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology advances*. **18** (7): 549-579. (2000).

Gibbs, S. K., Inteaz Alli, Catherine N. Mulligan, Bernard. Encapsulation in the food industry: a review. *International journal of food sciences and nutrition*. **50** (3): 213-224. (1999).

Gniewosz, M., Synowiec, A., Kraśniewska, K., et al. The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae flos*) on postharvest quality of apples. *Food Control*. **37** 351-361. (2014).

Goldblatt, L. Aflatoxin: scientific background, control, and implications. Elsevier. (2012)

Gong, Y., Wang, C., Lai, R. C., et al. An improved injectable polysaccharide hydrogel: modified gellan gum for long-term cartilage regeneration in vitro. *Journal of Materials Chemistry*. **19** (14): 1968-1977. (2009).

Gowder, S. Safety assessment of food flavor-cinnamaldehyde. *Biosafety*. **3** e147. (2014).

Guillard, V., Issoufov, V., Redl, A., et al. Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **10** (1): 108-115. (2009).

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., et al. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. **38** (11): 1599-1616. (2003).

Han, J. H. Antimicrobial food packaging. *Novel food packaging techniques*. 50-70. (2003).

Han, J. H. and Aristippos, G. Edible films and coatings-15: A review. *Elsevier Ltd*. (2005).

Hasan, F., Shah, A. A. and Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. **39** (2): 235-251. (2006).

Held, P. Enzymatic Digestion of Polysaccharides, Part II: Optimization of Polymer Digestion and Glucose Production in Microplates. *Biofuel Research*. (2012).

Hu, H., Liang, H. and Wu, Y. Isolation, purification and structural characterization of polysaccharide from *Acanthopanax brachypus*. *Carbohydrate polymers*. **127** 94-100. (2015).

Hyun, H. and Zeikus, J. General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **49** (5): 1168-1173. (1985).

Isaac-Renton, M., Li, M. K. and Parsons, L. M. Cinnamon spice and everything not nice: many features of intraoral allergy to cinnamic aldehyde. *Dermatitis*. **26** (3): 116-121. (2015).

Lyzdorzcyk, M., Cui, S. W. and Wang, Q. Polysaccharide gums: structures, functional properties, and applications. *Food carbohydrates: Chemistry, physical properties, and applications*. 293-299. (2005).

Kachhawa, D. K., Bhattacharjee, P. and Singhal, R. S. Studies on downstream processing of pullulan. *Carbohydrate polymers*. **52** (1): 25-28. (2003).

Kaewprachu, P. and Rawdkuen, S. Application of Active Edible Film as Food Packaging for Food Preservation and Extending Shelf Life. *Microbes in Food and Health*, Springer: 185-205. (2016)

Kambourova, M., Mandeva, R., Dimova, D., et al. Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. *Carbohydrate polymers*. **77** (2): 338-343. (2009).

Katina, K., Sauri, M., Alakomi, H.-L., et al. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. *LWT-Food Science and Technology*. **35** (1): 38-45. (2002).

Khan, T., Park, J. K. and Kwon, J.-H. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. *Korean Journal of Chemical Engineering*. **24** (5): 816-826. (2007).

Kirk, O., Borchert, T. V. and Fuglsang, C. C. Industrial enzyme applications. *Current opinion in biotechnology*. **13** (4): 345-351. (2002).

Kogan, G., Šoltés, L., Stern, R., et al. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology letters*. **29** (1): 17-25. (2007).

Kraśniewska, K., Gniewosz, M., Synowiec, A., et al. The use of pullulan coating enriched with plant extracts from *Satureja hortensis* L. to maintain pepper and apple quality and safety. *Postharvest Biology and Technology*. **90** 63-72. (2014).

Krichen, F., Volpi, N., Sila, A., et al. Purification, structural characterization and antiproliferative properties of chondroitin sulfate/dermatan sulfate from tunisian fish skins. *International Journal of Biological Macromolecules*. **95** 32-39. (2017).

Kumar, C. G. and Takagi, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*. **17** (7): 561-594. (1999).

Kurtzman, C., Fell, J. W. and Boekhout, T. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier. (2011)

Leathers, T., Kurtzman, C. and Detroy, R. (1984). Overproduction and regulation of xylanase in *Aureobasidium pullulans* and *Cryptococcus albidus*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*

Leathers, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied microbiology and biotechnology*. **62** (5-6): 468-473. (2003).

LeDuy, A., Yarmoff, J.-J. and Chagraoui, A. Enhanced production of pullulan from lactose by adaptation and by mixed culture techniques. *Biotechnology letters*. **5** (1): 49-54. (1983).

Lee, D. S., Yam, K. L. and Piergiovanni, L. Food packaging science and technology. CRC press. (2008)

Lee, J. W., Yeomans, W. G., Allen, A. L., et al. Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*. **65** (12): 5265-5271. (1999).

Lee, K. Y. and Yoo, Y. J. Optimization of pH for high molecular weight pullulan. *Biotechnology letters*. **15** (10): 1021-1024. (1993).

Li, D., Chen, L., Yi, X., et al. Pyrolytic characteristics and kinetics of two brown algae and sodium alginate. *Bioresource technology*. **101** (18): 7131-7136. (2010).

Li, X.-L., Zhang, Z.-Q., Dean, J., et al. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Applied and Environmental Microbiology*. **59** (10): 3212-3218. (1993).

Liang, W. H., Kienitz, B. L., Penick, K. J., et al. Concentrated collagen-chondroitin sulfate scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. **94** (4): 1050-1060. (2010).

Lin, T.-C. and Chen, C. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. *Process Biochemistry*. **39** (9): 1103-1109. (2004).

Linder, D., Kurz, G., Bender, H., et al. 1, 4- α -Glucan Phosphorylase from *Klebsiella pneumoniae* Purification, Subunit Structure and Amino Acid Composition. *European Journal of Biochemistry*. **70** (1): 291-303. (1976).

Liu, B., Lu, J., Ai, C., et al. Quick characterization of uronic acid-containing polysaccharides in 5 shellfishes by oligosaccharide analysis upon acid hydrolysis. *Carbohydrate research*. **435** 149-155. (2016).

Liu, C., Lu, J., Lu, L., et al. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. *Bioresource technology*. **101** (14): 5528-5533. (2010).

Logue, C., Barbieri, N. and Nielsen, D. Pathogens of Food Animals: Sources, Characteristics, Human Risk, and Methods of Detection. *Advances in Food and Nutrition Research*. (2017).

López, C. G., Fernández, F. A., Sevilla, J. F., et al. Utilization of the cyanobacteria *Anabaena* sp. ATCC 33047 in CO₂ removal processes. *Bioresource technology*. **100** (23): 5904-5910. (2009).

Louvier-Hernández, J. F., Luna-Bárceñas, G., Thakur, R., et al. Formation of chitin nanofibers by supercritical antisolvent. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. **1** (1): 109-114. (2005).

Madi, N. S., McNeil, B. and Harvey, L. M. Influence of culture pH and aeration on ethanol production and pullulan molecular weight by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of chemical technology and biotechnology*. **65** (4): 343-350. (1996).

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella gastroenteritis*. *Clinical Infectious Diseases*. **50** (6): 882-889. (2010).

Manners, D. J. Recent developments in our understanding of glycogen structure. *Carbohydrate polymers*. **16** (1): 37-82. (1991).

Marsh, K. S. Wiley encyclopedia of packaging technology. Wiley. (1997)

McCormick, C., Bock, J. and Schulz, D. Encyclopedia of polymer science and engineering. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. **17** (1989).

McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R. and Krochta, J. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of food science*. **58** (4): 899-903. (1993).

McNeil, B., Kristiansen, B. and Seviour, R. Polysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* in continuous culture. *Biotechnology and bioengineering*. **33** (9): 1210-1212. (1989).

Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry*. **31** (3): 426-428. (1959).

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., et al. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. **11** (9): 675-685. (2001).

Mounir, R., Durieux, A., Bodo, E., et al. Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnology letters*. **29** (4): 553-559. (2007).

Nagahama, T. Yeast biodiversity in freshwater, marine and deep-sea environments. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*, Springer: 241-262. (2006)

Norman, B. A novel debranching enzyme for application in the glucose syrup industry. *Starch -Stärke*. **34** (10): 340-346. (1982).

Nostro, A., Scaffaro, R., D'Arrigo, M., et al. Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Applied microbiology and biotechnology*. **96** (4): 1029-1038. (2012).

O'sullivan, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*. **4** (3): 173-207. (1997).

Olivas, G. and Barbosa-Cánovas, G. Edible coatings for fresh-cut fruits. *Critical reviews in food science and nutrition*. **45** (7-8): 657-670. (2005).

Ono, K., Yasuda, N. and Ueda, S. Effect of pH on pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* S-1. *Agricultural and Biological chemistry*. **41** (11): 2113-2118. (1977).

Ooi, L. S., Li, Y., Kam, S.-L., et al. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *The American journal of Chinese medicine*. **34** (03): 511-522. (2006).

Ouattara, B., Simard, R., Piette, G., et al. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of food science*. **65** (5): 768-773. (2000).

Ozturk, S., Aslim, B. and Suludere, Z. Evaluation of chromium (VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresource technology*. **100** (23): 5588-5593. (2009).

Pathare, P. B., Opara, U. L. and Al-Said, F. A.-J. Colour measurement and analysis in fresh and processed foods: a review. *Food and Bioprocess Technology*. **6** (1): 36-60. (2013).

Pavlovic, S. and Brandão, P. R. G. Adsorption of starch, amylose, amylopectin and glucose monomer and their effect on the flotation of hematite and quartz. *Minerals Engineering*. **16** (11): 1117-1122. (2003).

Peres, A. and Correa, M. Depression of iron oxides with corn starches. *Minerals Engineering*. **9** (12): 1227-1234. (1996).

Perugino, G., Trincone, A., Rossi, M., et al. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases. *Trends in biotechnology*. **22** (1): 31-37. (2004).

Prabaharan, M. and Jayakumar, R. Chitosan-graft- β -cyclodextrin scaffolds with controlled drug release capability for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. **44** (4): 320-325. (2009).

Ramaprasad, A., Latha, D. and Rao, V. Synthesis and characterization of polypyrrole grafted chitin. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. **104** 169-174. (2017).

Rao, V. and Ramaprasad, A. Optical and conductivity studies of Pseudo-doped chitin-polyaniline blend. *Journal of applied polymer science*. **106** (1): 309-313. (2007).

Ravella, S. R., Quiñones, T. S., Retter, A., et al. Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate polymers*. **82** (3): 728-732. (2010).

Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C., et al. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*. **81** (3): 634-641. (2007).

Roszak, D. and Colwell, R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological reviews*. **51** (3): 365. (1987).

Roukas, T. Pullulan production from brewery wastes by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **15** (4): 447-450. (1999).

Sakano, Y., Hiraiwa, S.-i., Fukushima, J., et al. Enzymatic properties and action patterns of *Thermoactinomyces vulgaris* α -amylase. *Agricultural and Biological chemistry*. **46** (5): 1121-1129. (1982).

Sakellariou, P., Rowe, R. and White, E. An evaluation of the interaction and plasticizing efficiency of the polyethylene glycols in ethyl cellulose and hydroxypropyl methylcellulose films using the torsional braid pendulum. *International journal of pharmaceutics*. **31** (1): 55-64. (1986).

Segel, I. H. Enzyme kinetics. Wiley, New York. (1975)

Senthilkumar, V. and Gunasekaran, P. Influence of fermentation conditions on levan production by *Zymomonas mobilis* CT2. (2005).

Seo, H.-P., Son, C.-W., Chung, C.-H., et al. Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. *Bioresource technology*. **95** (3): 293-299. (2004).

Shen, S., Zhang, T., Yuan, Y., et al. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. *Food Control*. **47** 196-202. (2015).

Shi, L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. **92** 37-48. (2016).

Shinji, N., Hiroyuki, Y., Yoshiyuki, H., et al. Porosity-controlled ethylcellulose film coating. II. Spontaneous porous film formation in the spraying process and its solute permeability. *International journal of pharmaceutics*. **104** (2): 95-106. (1994).

Shoib, M., Shehzad, A., Omar, M., et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate polymers*. **147** 444-454. (2016).

Shreaz, S., Wani, W. A., Behbehani, J. M., et al. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*. **112** 116-131. (2016).

Shu, C. H., Lin, K. J. and Wen, B. J. Effects of culture temperature on the production of bioactive polysaccharides by *Agaricus blazei* in batch cultures. *Journal of chemical technology and biotechnology*. **82** (9): 831-836. (2007).

Siehr, D. Melanin biosynthesis in *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Coatings Technology*. **53** (681): 23-25. (1981).

Siemann, U. Solvent cast technology—a versatile tool for thin film production. *Scattering Methods and the Properties of Polymer Materials*, Springer: 1-14. (2005)

Simon, L., Bouchet, B., Bremond, K., et al. Studies on pullulan extracellular production and glycogen intracellular content in *Aureobasidium pullulans*. *Canadian journal of microbiology*. **44** (12): 1193-1199. (1998).

Simon, L., Caye-Vaugien, C. and Bouchonneau, M. Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations. *Microbiology*. **139** (5): 979-985. (1993).

Singh, R. S., Saini, G. K. and Kennedy, J. F. Pullulan: microbial sources, production and applications. *Carbohydrate polymers*. **73** (4): 515-531. (2008).

Siró, I. and Plackett, D. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review. *Cellulose*. **17** (3): 459-494. (2010).

Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., et al. Food hydrocolloid edible films and coatings. *Food Hydrocolloids: Characteristics, Properties*, Nova Science Publishers, Inc. (2010).

Sobieszczkańska, B., Osek, J., Waśko-Czopnik, D., et al. Association of enteroaggregative *Escherichia coli* with irritable bowel syndrome. *Clinical microbiology and infection*. **13** (4): 404-407. (2007).

Steffen, R., Castelli, F., Dieter Nothdurft, H., et al. Vaccination against Enterotoxigenic *Escherichia coli*, a Cause of Travelers—Diarrhea. *Journal of travel medicine*. **12** (2): 102-107. (2005).

Stephen, A. M. Food polysaccharides and their applications. CRC press. (1995)

Synowiec, A., Gniewosz, M., Kraśniewska, K., et al. Antimicrobial and antioxidant properties of pullulan film containing sweet basil extract and an evaluation of coating effectiveness in the prolongation of the shelf life of apples stored in refrigeration conditions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. **23** 171-181. (2014).

Takata, H., Kajiura, H., Furuyashiki, T., et al. Fine structural properties of natural and synthetic glycogens. *Carbohydrate research*. **344** (5): 654-659. (2009).

Tester, R. F., Karkalas, J. and Qi, X. Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*. **39** (2): 151-165. (2004).

Thaniyavarn, J., S. Jindamorakot, S. Am-in, et al. (2013). Yeast biodiversity in the coastal area of Koh Si Chang and their potential as biosurfactant producers. The 25th Annual meeting of Thai Society for Biotechnology and International Conference, Bangkok.

Thombare, N., Jha, U., Mishra, S., et al. Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. **88** 361-372. (2016).

Threlfall, E. J. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104 a truly international multiresistant clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **46** (1): 7-10. (2000).

Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*. **28** (3): 603-661. (2015).

Ullrich, M. Bacterial polysaccharides: current innovations and future trends. Horizon Scientific Press. (2009)

Urzì, C., De Leo, F., Passo, C. L., et al. Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of microbiological methods*. **36** (1): 95-105. (1999).

Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., del Río, M. A., et al. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. **51** (9): 872-900. (2011).

Valgas, C., Souza, S. M. d., Smânia, E. F., et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. **38** (2): 369-380. (2007).

Van Long, N. N., Joly, C. and Dantigny, P. Active packaging with antifungal activities. *International journal of food microbiology*. **220** 73-90. (2016).

Vandamme, E., De Baets, S. and Seibuchel, A. Polysaccharides I: polysaccharides and prokaryotes (biopolymers series). (2002)

Wang, H.-x., Zhao, J., Li, D.-m., et al. Structural investigation of a uronic acid-containing polysaccharide from abalone by graded acid hydrolysis followed by PMP-HPLC-MS n and NMR analysis. *Carbohydrate research*. **402** 95-101. (2015).

Wang, P., Petrella, F., Nicosia, L., et al. Molecular imaging of stem cell transplantation for liver diseases: monitoring, clinical translation, and theranostics. *Stem Cells International*. **2016** (2016).

Wasser, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied microbiology and biotechnology*. **60** (3): 258-274. (2002).

Weast, R. C., Astle, M. J. and Beyer, W. H. CRC handbook of chemistry and physics. CRC press Boca Raton, FL. (1988)

West, T. P. and Reed-Hamer, B. Ability of *Aureobasidium pullulans* to synthesize pullulan. *Microbios*. **67** 117-124. (1991).

West, T. P. and Reed-Hamer, B. Effect of temperature on pullulan production in relation to carbon source. *Microbios*. **75** (305): 261-268. (1993).

Whitfield, C. and Valvano, M. A. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Advances in microbial physiology*. **35** 135-246. (1993).

Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*. **3** (2): 163-175. (2008).

Wong, D. W. Mechanism and theory in food chemistry. Van Nostrand Reinhold. (1989)

Wu, S.-J., Kim, J.-M., Zhou, C., et al. Estimation of pullulan by hydrolysis with pullulanase. *Biotechnology letters*. **32** (8): 1143-1145. (2010).

Wynne, E. and Gott, C. L. A proposed revision of the genus Pullularia. *Microbiology*. **14** (3): 512-519. (1956).

Xu, S., Chen, X. and Sun, D.-W. Preservation of kiwifruit coated with an edible film at ambient temperature. *Journal of Food Engineering*. **50** (4): 211-216. (2001).

Youssef, F., Biliaderis, C. and Roukas, T. Enhancement of pullulan production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture using olive oil and sucrose as carbon sources. *Applied biochemistry and biotechnology*. **74** (1): 13-30. (1998).

Yuen, S. Pullulan and its applications. *Process Biochemistry*. (1974).

Yurlova, N. and De Hoog, G. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van leeuwenhoek*. **72** (2): 141-147. (1997).

Zareian, S., Khajeh, K., Ranjbar, B., et al. Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullulan to glucose, maltose, and maltotriose and starch to glucose and maltose. *Enzyme and Microbial Technology*. **46** (2): 57-63. (2010).

Zhang, C. and Runge, T. Fractionating pentosans and hexosans in hybrid poplar. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **51** (1): 133-139. (2011).

Zhang, L. and CHI, Z. Screening and identification of a cellulase producing marine yeast and medium and fermentation condition optimization for cellulase production. *Periodical of Ocean University of China*. **37** (S2): 101-108. (2007).

Zivanovic, S., Chi, S. and Draughon, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of food science*. **70** (1): (2005).

Zoebel, H. and Stephen, A. M. Starch: structure, analysis and application. *Food polysaccharides and their application*. 25-85. (2006).

ศุภิสรา เอกเผ่าพันธุ์ (2558) การผลิต การหาลักษณะสมบัติ และการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุดารัตน์ ลือพงศ์พัฒนา (2557) การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพโดยยีสต์และราคล้ายยีสต์ที่แยกได้จากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารยีสต์มอลต์

สารสกัดจากยีสต์	3 กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3 กรัม
แบคโตเพปโตน	5 กรัม
กลูโคส	10 กรัม
ค่ากรดต่าง	4.5

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารยีสต์มอลต์ดัดแปลง

สารสกัดจากยีสต์	3 กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3 กรัม
แบคโตเพปโตน	5 กรัม
ซูโครส	10 กรัม
ค่ากรดต่าง	4.5

เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟูริก 1 โมลาร์

กรดซัลฟูริกเข้มข้น	10 มิลลิลิตร
สารสกัดจากมอลต์	100 มิลลิลิตร

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์	40 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

สำหรับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2, 1 และ 0.1 โมลาร์ เตรียมจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ ใช้วิธีการทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น โดยใช้สูตรคำนวณ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

3. บัฟเฟอร์อะซีเตท 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบส 5.0

กรดอะซีติก 0.1 โมลาร์	295 มิลลิลิตร
โซเดียมอะซีเตทไตรไฮเดรต 0.1 โมลาร์	705 มิลลิลิตร

4. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

กรดไนโตรซาลิไซลิก	1 กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์	20 มิลลิลิตร
โพแทสเซียมคาร์เตรต	30 กรัม

ละลายกรดไนโตรซาลิไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ เติมโพแทสเซียมคาร์เตรต จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

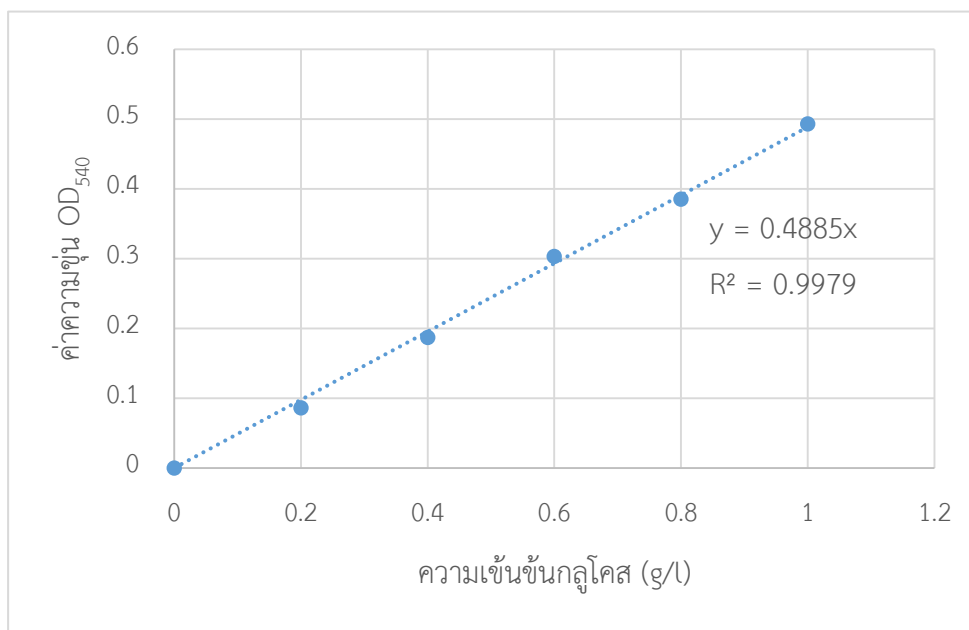
5. น้ำฟิสิโอ

ทวิน 80	0.01 กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.85 กรัม
น้ำ	100 มิลลิลิตร



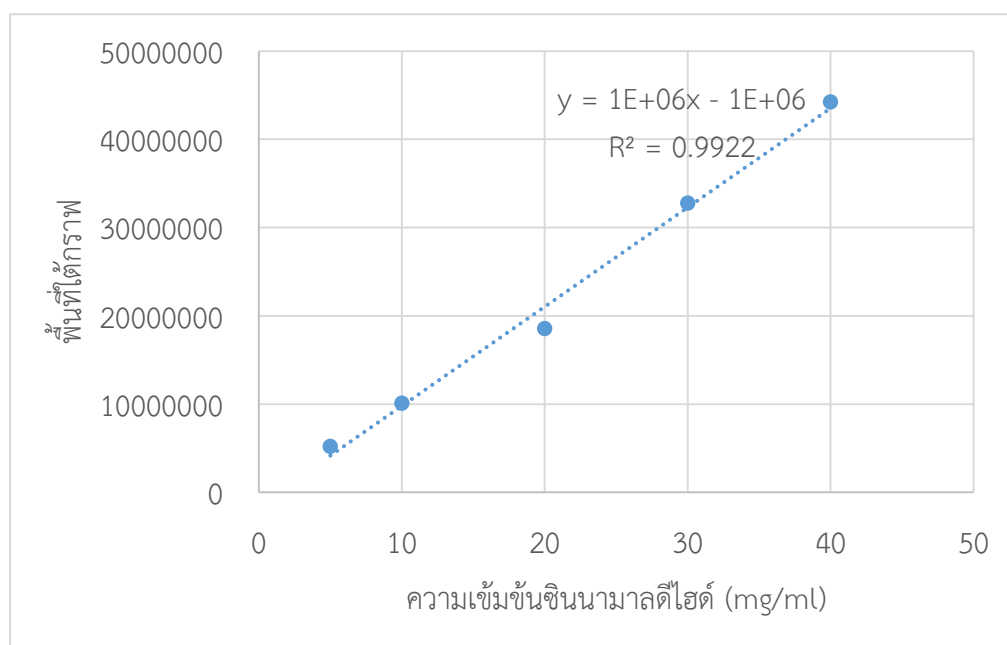
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีตีวซ์ วิเคราะห์ด้วยวิธีที่ใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA)



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-1 กรัม แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

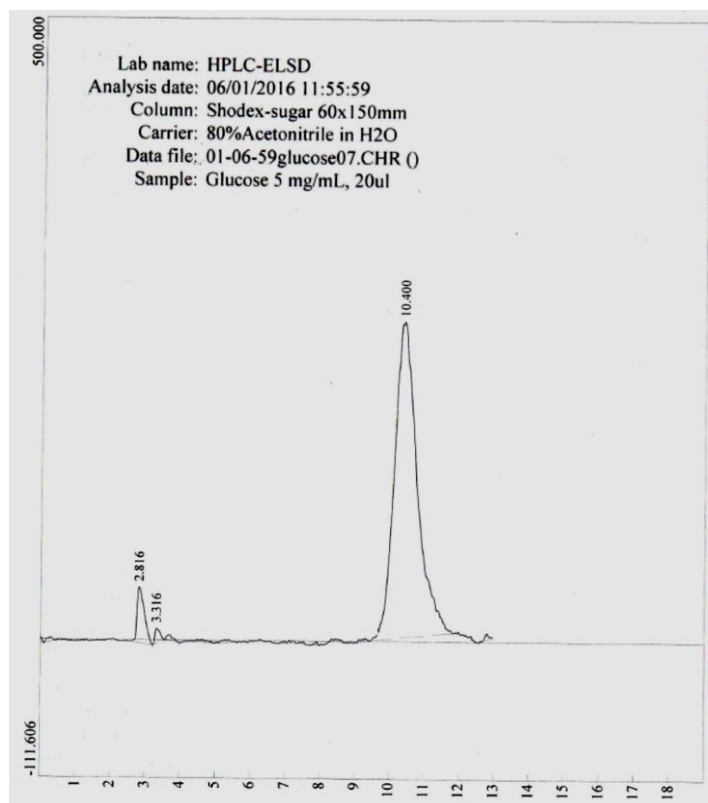
2. กราฟมาตรฐานปริมาณความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์วิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานของซินนามาลดีไฮด์ในช่วงความเข้มข้น 5-40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

ภาคผนวก ง
โครมาโทแกรมสารมาตรฐาน

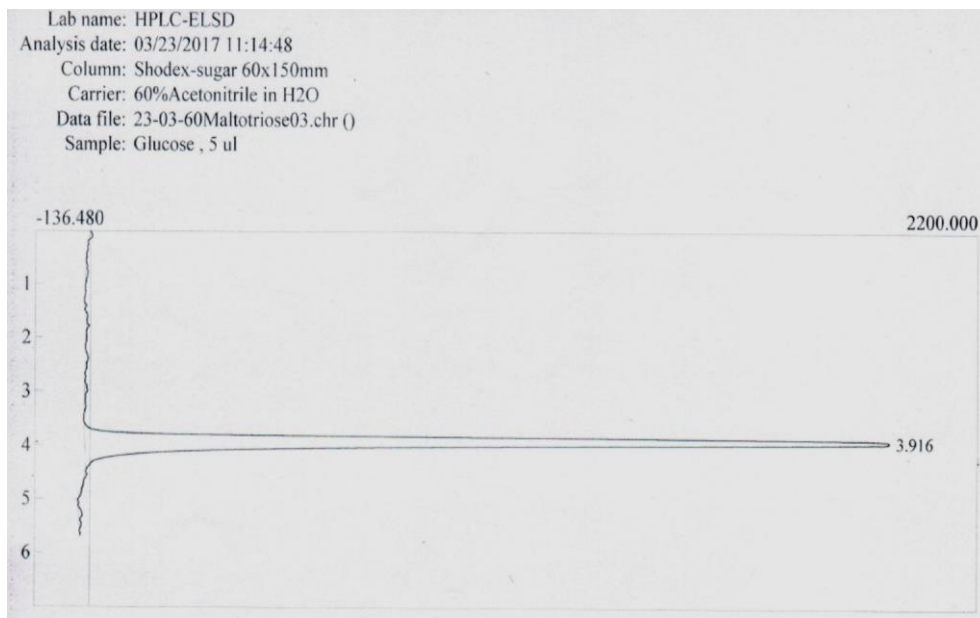
1. โครมาโทแกรมน้ำตาลกลูโคส (เฟสเคลื่อนที่อะซีโทไนไตรล์ 80% โดยปริมาตร)



CHULALONGKORN UNIVERSITY

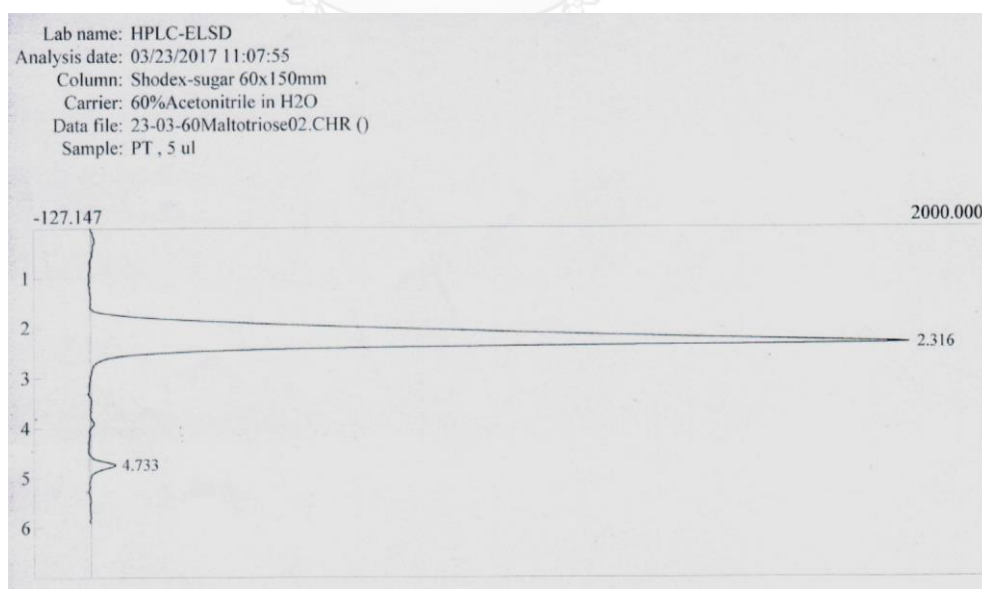
รูปที่ ง.1 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (เฟสเคลื่อนที่อะซีโทไนไตรล์ 80% โดยปริมาตร)

2. โครมาโทแกรมน้ำตาลกลูโคส (เฟสเคลื่อนที่อะซีโตนไทรล์ 60% โดยปริมาตร)



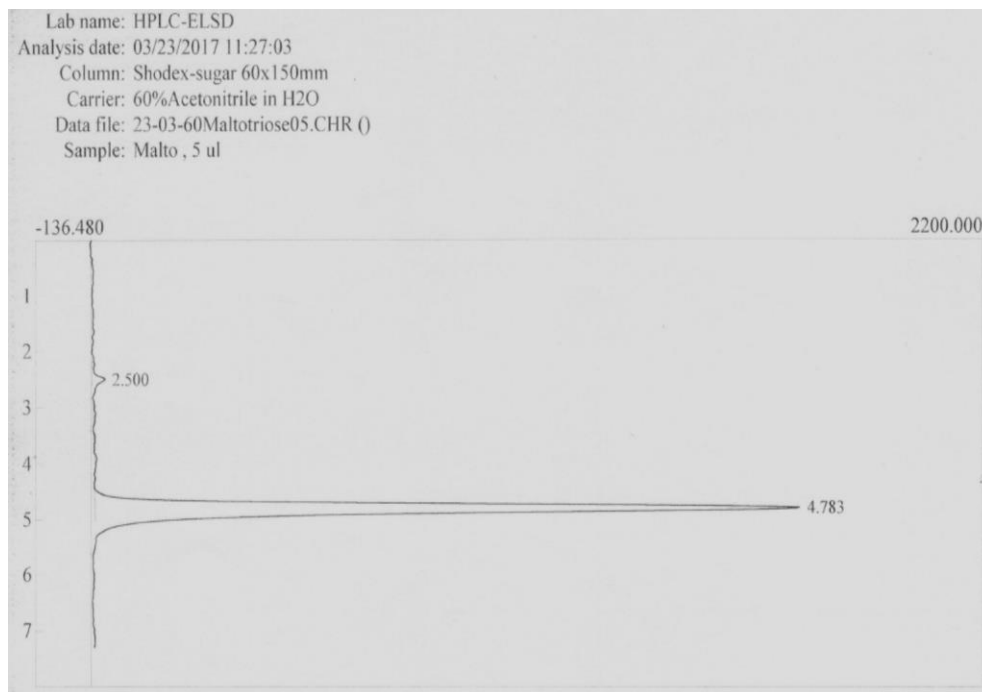
รูปที่ ง.2 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (เฟสเคลื่อนที่อะซีโตนไทรล์ 60% โดยปริมาตร)

3. โครมาโทแกรมพอลิแซ็กคาไรด์หลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์พอลิแซ็กคาไรเดส



รูปที่ ง.3 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน (เฟสเคลื่อนที่อะซีโตนไทรล์ 60% โดยปริมาตร)

4. โครมาโทแกรมน้ำตาลมอลโทไตรโอส



รูปที่ ง.4 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ โครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลมอลโทไตรโอสมมาตรฐาน (เฟสเคลื่อนที่อะซิโตนไทรล์ 60% โดยปริมาตร)

ภาคผนวก จ
ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ตารางที่ จ.1 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสายพันธุ์ต่างๆของสารละลายฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่มี ความเข้มข้นซินนามาลดีไฮด์ตั้งแต่ 0-48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยวิธี agar well diffusion โดยแสดง ค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ความเข้มข้น CH (mg/ml)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (cm±SD)					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>
ชุดควบคุม	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
1.5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3.0	2.43±0.10 ^f	1.64±0.05 ^d	1.00±0.00 ^e	1.35±0.06 ^e	3.50±0.10 ^e	1.70±0.00 ^c
6.0	3.05±0.10 ^e	2.35±0.17 ^c	1.38±0.10 ^d	1.70±0.00 ^d	5.08±0.31 ^d	2.90±0.11 ^b
12.0	3.50±0.00 ^d	2.86±0.05 ^b	1.78±0.03 ^c	2.19±0.10 ^c	6.47±0.32 ^c	3.22±0.15 ^b
24.0	3.93±0.10 ^c	3.00±0.00 ^b	2.29±0.02 ^b	2.78±0.05 ^b	7.88±0.48 ^b	3.15±0.29 ^b
30.0	4.13±0.19 ^{bc}	3.70±0.08 ^a	2.65±0.06 ^a	3.15±0.06 ^a	8.50±0.01 ^a	4.15±0.27 ^a
36.0	4.23±0.10 ^b	3.63±0.05 ^a	2.65±0.06 ^a	3.08±0.05 ^a	8.32±0.39 ^{ab}	3.97±0.16 ^a
42.0	4.55±0.06 ^a	3.65±0.06 ^a	2.75±0.06 ^a	3.08±0.10 ^a	8.50±0.00 ^a	4.00±0.23 ^a
48.0	4.35±0.13 ^{ab}	3.60±0.00 ^a	2.70±0.00 ^a	3.10±0.08 ^a	8.50±0.00 ^a	3.90±0.32 ^a

หมายเหตุ : CH ย่อมาจากซินนามาลดีไฮด์ ความกว้างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.50 เซนติเมตร ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนข้อมูลในตารางแสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี one-way ANOVA

ตารางที่ ง.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบสายพันธุ์ต่างๆของซินนามาลดีไฮด์มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรด้วยวิธี agar well diffusion โดยแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ความเข้มข้น CH (mg/ml)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (cm±SD)					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>
ชุดควบคุม	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
1.5	4.17±0.05 ^d	3.80±0.15 ^b	2.98±0.13 ^{bc}	3.22±0.04 ^c	3.97±0.28 ^d	5.02±0.29 ^b
3.0	4.38±0.08 ^c	3.88±0.08 ^b	2.92±0.08 ^c	3.40±0.09 ^b	4.72±0.45 ^{cd}	6.50±1.64 ^a
6.0	4.90±0.09 ^b	3.90±0.11 ^b	3.17±0.05 ^a	3.47±0.05 ^b	5.38±0.93 ^{bc}	6.57±0.67 ^a
12.0	5.12±0.17 ^a	4.25±0.05 ^a	3.30±0.06 ^a	3.78±0.10 ^a	5.78±0.68 ^{bc}	5.03±0.60 ^b
24.0	4.98±0.16 ^{ab}	4.28±0.12 ^a	3.32±0.17 ^a	3.67±0.14 ^a	6.00±0.65 ^b	4.97±0.36 ^b
30.0	5.08±0.10 ^{ab}	4.30±0.06 ^a	3.27±0.12 ^a	3.72±0.10 ^a	7.47±0.80 ^a	4.65±0.26 ^b

หมายเหตุ : CH ย่อมาจากซินนามาลดีไฮด์ ความกว้างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.50 เซนติเมตร ค่าเฉลี่ยได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันบนข้อมูลในตาราง แสดงความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี one-way ANOVA

ตารางที่ ง.3 การยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแผ่นฟิล์มควบคุม ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.2 เซนติเมตรต่อการเจริญของแบคทีเรียและราทดสอบโดยวิธี disc diffusion โดยแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จุลินทรีย์ทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (cm±SD)		
	แผ่นฟิล์มควบคุม	ฟิล์มผสม CH 24 mg/ml	ฟิล์มผสม CH 30 mg/ml
<i>S. aureus</i>	0.00±0.00	3.15±0.14	5.62±0.25
<i>B. subtilis</i>	0.00±0.00	2.52±0.10	4.28±0.08
<i>E. coli</i>	0.00±0.00	1.70±0.00	3.80±0.05
<i>S. typhimurium</i>	0.00±0.00	1.67±0.05	3.67±0.08
<i>A. flavus</i>	0.00±0.00	5.25±0.71	8.50±0.00
<i>A. niger</i>	0.00±0.00	2.08±0.19	4.87±0.37

หมายเหตุ :: CH ย่อมาจากซินนามาลดีไฮด์ ความกว้างของจานอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.50 เซนติเมตร ค่าเฉลี่ยศูนย์กลางโซนใสได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

ตารางที่ ง.4 การยับยั้งจุลินทรีย์ของแผ่นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ผสมซินนามาลดีไฮด์ที่ 24 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแผ่นฟิล์มควบคุม ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ตารางเซนติเมตรต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยแสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในหน่วย log CFU/ml และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จุลินทรีย์	ชั่วโมง	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (log CFU/ml \pm SD)			
		ชุดควบคุม	ชุดฟิล์มควบคุม	ฟิล์ม 24 mg/ml	ฟิล์ม 30 mg/ml
<i>S. aureus</i>	0	6.000 \pm 0.020	6.426 \pm 0.078	6.301 \pm 0.000	6.301 \pm 0.125
	2	6.125 \pm 0.045	6.368 \pm 0.105	6.125 \pm 0.249	6.222 \pm 0.056
	4	6.200 \pm 0.035	6.301 \pm 0.120	6.301 \pm 0.069	6.426 \pm 0.036
	8	6.222 \pm 0.120	6.637 \pm 0.230	6.176 \pm 0.088	6.222 \pm 0.000
	24	8.477 \pm 0.205	8.125 \pm 0.056	7.398 \pm 0.776	6.222 \pm 0.071
	48	8.368 \pm 0.140	8.426 \pm 0.250	8.000 \pm 0.088	5.000 \pm 0.260
<i>B. subtilis</i>	0	5.301 \pm 0.100	5.222 \pm 0.071	5.222 \pm 0.032	5.301 \pm 0.069
	2	5.301 \pm 0.103	5.398 \pm 0.280	5.222 \pm 0.045	5.301 \pm 0.125
	4	5.653 \pm 0.158	5.813 \pm 0.210	5.301 \pm 0.088	5.176 \pm 0.032
	8	6.222 \pm 0.120	6.125 \pm 0.220	6.000 \pm 0.000	5.000 \pm 0.157
	24	7.602 \pm 0.072	7.301 \pm 0.310	6.753 \pm 0.272	4.727 \pm 0.000
	48	7.000 \pm 0.160	8.000 \pm 0.080	7.176 \pm 0.088	4.699 \pm 0.029
<i>E. coli</i>	0	6.637 \pm 0.130	6.637 \pm 0.080	6.669 \pm 0.000	6.523 \pm 0.032
	2	6.525 \pm 0.110	6.468 \pm 0.065	6.564 \pm 0.027	6.564 \pm 0.151
	4	7.308 \pm 0.202	7.301 \pm 0.120	7.195 \pm 0.351	6.802 \pm 0.170
	8	8.523 \pm 0.090	8.637 \pm 0.132	8.097 \pm 0.120	7.669 \pm 0.125
	24	9.222 \pm 0.220	9.477 \pm 0.058	8.865 \pm 0.105	7.477 \pm 0.113
	48	8.845 \pm 0.154	8.824 \pm 0.235	8.176 \pm 0.408	6.301 \pm 0.213
<i>S. typhimurium</i>	0	6.753 \pm 0.100	6.753 \pm 0.067	6.727 \pm 0.036	6.727 \pm 0.064
	2	7.301 \pm 0.089	7.602 \pm 0.130	7.222 \pm 0.125	7.000 \pm 0.213
	4	7.801 \pm 0.065	7.845 \pm 0.120	7.699 \pm 0.020	7.564 \pm 0.000
	8	8.727 \pm 0.030	8.802 \pm 0.140	8.564 \pm 0.027	7.727 \pm 0.036
	24	8.845 \pm 0.060	8.970 \pm 0.130	8.921 \pm 0.094	5.000 \pm 0.000
	48	9.222 \pm 0.210	9.000 \pm 0.150	9.176 \pm 0.213	4.477 \pm 0.062

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว จิตมณี ศรีสุขอัยกา เกิดวันที่ 4 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2536 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2557 และเข้ารับการศึกษาคือต่อในระดับปริญญาโทที่ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2558

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติในงาน PACCON 2017 Green Convergence on Chemical Frontiers ระหว่างวันที่ 2-3 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2560 ณ Centra Government Complex Hotel & Convention Centre จังหวัดกรุงเทพมหานคร ในหัวข้อเรื่อง Antimicrobial effect and application of exopolysaccharide film from *Aureobasidium pullulans* YTP6 - 1 4 with cinnamaldehyde (Proceeding)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY