จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน

รายงานผลการวิจัย

การผลิตสารลักษณะคล้ายพลาสติกจากเชื้อรา

Production of a plastic-like substance from fungi

โดย

หรรษา ปุณณะพยัคฆ์

ปีงบประมาณ 2541

บทคัดย่อภาษาไทย

การทดสอบการผลิตสารพูลูแลนพอลิเมอร์จากเชื้อรา *Aureobasidium pullulans* สองสายพันธุ์คือ NRRL และ TISTR พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ได้อย่างดี ในสภาวะที่เหมาะสมเหมือนกันคือ pH 6.5 อุณหภูมิ 30°C ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะเขย่าที่มีอากาศพอสมควร การมีอาหารเสริม casein peptone จะช่วยให้ผลผลิตดีขึ้น 1.15เท่าในสายพันธุ์ NRRL (0.322 g/g carbon source) และ 1.23 เท่าในสายพันธุ์ TISTR (0.463 g/g carbon source) คุณสมบัติของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มีลักษณะคล้ายพลาสติคแข็ง ละลายได้ในน้ำ ไม่ละลายในเอทธานอลและน้ำมันพืช สายพันธุ์ NRRL ให้พูลูแลนพอลิเมอร์ที่มีสีขาว ส่วนสายพันธุ์ TISTR ให้พูลูแลนพอลิเมอร์ที่มีสีเขียวปนเล็กน้อย การวิเคราะห์โดยดูจาก IR-spectrum พบว่าสารที่ผลิตได้มีลักษณะโครงสร้างสอดคล้องเช่นเดียวกับพูลูแลนพอลิเมอร์มาตรฐาน เมื่อทิ้งไว้บนผิวดินในธรรมชาติพบว่าแท่งพูลูแลนพอลิเมอร์ถูกย่อยสลายได้ด้วยเชื้อราอื่นๆ ที่มีมาขึ้นปกคลุมอย่างชัดเจน

ABSTRACT

The production of pullulan polymer from *Aureobasidium pullulans* NRRL and TISTR strains were investigated. Both strains were found to produce pullulan optimally at pH 6.5, 30°C, in nutrients having sucrose as the sole carbon source, $(NH_4)_2SO_4$ as the nitrogen source, under agitated aerobic conditions. The nutrient supplementation with casein peptone helped increase the production 1.15 folds in the NRRL strain (0.322 g/g carbon source) and 1.23 folds in the TISTR strain (0.463 g/g carbon source). The pullulan polymer products were plastic-like, water-soluble, ethanol-insoluble and vegetable oil-insoluble. The color of NRRL polymer was whitish while the TISTR polymer was a little greenish. Analysis with IR spectrum showed that the structures of both pullulan polymers corresponded with that of the pullulan standard. When placing the polymer sticks on natural soil, the biodegradation occurred with obvious growth of molds from natural environment on the polymer sticks.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณะกรรมการจัดสรรเงินทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2541 ในการสนับสนุนในครั้งนี้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดีด้วยอาศัยความสามารถของ นายพงษ์ศักดิ์ ละไมพิศ ซึ่งเป็นผู้ช่วยวิจัยและ Prof. Dr. T.D. Leathers แห่ง USDA สหรัฐอเมริกา ผู้มอบเชื้อสายพันธุ์ NRRL และข้อมูลทางวิชาการอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	3
ผลการวิจัย	6
การอภิปรายผลการทดลอง	36
ข้อสรุปและเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	39
ภาคผนวก	40

เลขหมู่ ดพ ว
ดท 15
เลขทะเบียน 009880
วัน.เดือน.ปี 21 ม.ค.43

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 10

ตารางที่ 2. ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR 10

ตารางที่ 3. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะอุณหภูมิ 25 30 และ 35°C ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 13

ตารางที่ 4. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะอุณหภูมิ 25 30 และ 35°C ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR 13

ตารางที่ 5. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะแหล่งคาร์บอนต่างๆ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 17

ตารางที่ 6. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะแหล่งคาร์บอนต่างๆ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR 17

ตารางที่ 7. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 20

ตารางที่ 8. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR 20

ตารางที่ 9. ผลของการมีปริมาณอากาศต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 23

ตารางที่ 10. ผลของการมีปริมาณอากาศต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR 23

ตารางที่ 11. ผลของการเติมอาหารเสริม casein peptone ที่มีต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 26

ตารางที่ 12. ผลของการเติมอาหารเสริม casein peptone ที่มีต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR 26

ตารางที่ 13. ผลการทดสอบคุณสมบัติการถูกละลายของพูลูแลนพอลิเมอร์ในตัวทำละลายชนิดต่างๆ 34

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1.	ลักษณะของ *A. pullulans* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA ก. *A. pullulans* NRRL ข. *A. pullulans* TISTR	7
ภาพที่ 2.	กราฟแสดงการเจริญของ *A. pullulans* NRRL	8
ภาพที่ 3.	กราฟแสดงการเจริญของ *A. pullulans* TISTR	9
ภาพที่ 4.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ pH ต่างๆ ของ *A. pullulans* NRRL	11
ภาพที่ 5.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ pH ต่างๆ ของ *A. pullulans* TISTR	12
ภาพที่ 6.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ ของ *A. pullulans* NRRL	14
ภาพที่ 7.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ ของ *A. pullulans* TISTR	15
ภาพที่ 8.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* NRRL ในสภาวะของแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด	18
ภาพที่ 9.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* TISTR ในสภาวะของแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด	19
ภาพที่ 10.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* NRRL ในสภาวะของแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด	21
ภาพที่ 11.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* TISTR ในสภาวะของแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด	22
ภาพที่ 12.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* NRRL ในสภาวะการมีปริมาณอากาศระดับต่างๆ	24

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 13.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ *A. pullulans* TISTR ในสภาวะการมีปริมาณอากาศระดับต่างๆ	25
ภาพที่ 14.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* NRRL ในสภาวะเหมาะสมที่มีการเติมอาหารเสริม	27
ภาพที่ 15.	กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ *A. pullulans* TISTR ในสภาวะเหมาะสมที่มีการเติมอาหารเสริม	28
ภาพที่ 16.	ลักษณะของแท่งพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตได้	30
	ก. *A. pullulans* NRRL	
	ข. *A. pullulans* TISTR	
ภาพที่ 17.	IR spectrum ของพูลูแลนพอลิเมอร์มาตรฐาน (Sigma, USA)	31
ภาพที่ 18.	IR spectrum ของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL	32
ภาพที่ 19.	IR spectrum ของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* TISTR	33
ภาพที่ 20.	ลักษณะของแท่งพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ถูกย่อยสลายในธรรมชาติ	35

บทนำ

สารประเภทพอลิเมอร์ หรือที่อาจเรียกทั่วไปว่าพลาสติค ปกติจะมีคุณสมบัติสำคัญคือ สามารถหลอมและขึ้นรูปได้ ที่อุณหภูมิสูงและจะคงรูปอยู่ได้เมื่อเย็นลง พลาสติคที่รู้จักกันทั่วไปในอุตสาหกรรมมานานตั้งแต่ช่วงปี 1930 ได้แก่ polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride เป็นต้น (Emerging technology series, 1996) พลาสติคทั่วไปมีความทนทานต่อการย่อยสลาย ทำให้ยากที่จะกำจัดและมีผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อม จึงเกิดความต้องการพลาสติคที่มีคุณสมบัติถูกย่อยสลายได้ง่าย ซึ่งอาจจะเป็นการย่อยสลายด้วยวิธีการทางกายภาพหรือชีวภาพพอลิเมอร์ที่ถูกย่อยสลายได้โดยวิธีทางชีวภาพหรือ biodegradable polymer เริ่มเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้ *Aureobasidium pullulans* เป็นราชนิดหนึ่งที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycetes (Lacroixt et.al., 1985) มีชื่อเรียกกันทั่วไปว่า black yeast เนื่องจากสามารถสร้างเม็ดสี เมลานิน (melanin) ในระหว่างการเจริญเติบโต ลักษณะของเซลล์มีหลายรูปร่าง (polymorphism) (Simon et. al., 1993) และขณะที่มีการเจริญ *Aureobasidium* จะสังเคราะห์ carbohydrate ที่มีลักษณะเป็น polysaccharide ขับออกมานอกเซลล์ เรียกว่า พูลูแลน (pullulan) มีโครงสร้างเป็นน้ำตาล maltotriose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,6 (Leather et. al., 1988) การสังเคราะห์พูลูแลนนี้จะมีมากหรือน้อยขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์และชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา (Schuster et. al., 1993) พูลูแลนเป็น biopolymer ที่สำคัญคาดว่าจะมีบทบาทมากขึ้นเรื่อยๆ ในศตวรรษหน้าและในปัจจุบันกำลังเป็นที่สนใจในวงการอุตสาหกรรมไบโอพอลิเมอร์ในต่างประเทศ

Pollock (1992) ได้รายงานถึงคุณสมบัติของสารไบโอพอลิเมอร์ pullulan ว่าไม่มีรสและกลิ่น ไม่เป็นพิษ ถ้าบริโภคจะให้แคลลอรี่ต่ำ สามารถย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ในธรรมชาติ และยึดเกาะกับวัสดุต่างๆ ได้ดี ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมากในอุตสาหกรรมพอลิเมอร์ อาทิเช่น ใช้เป็นกาวยึดวัสดุต่างๆ ใช้เป็นวัตถุที่มีความแข็งพอๆ กับพลาสติคที่ผสมจาก polystyrene ถ้าทำเป็นแผ่นฟิล์มก็สามารถอยู่ได้โดยไม่ละลายในน้ำมัน หรือไขมัน ทำให้ใช้ห่อหุ้มอาหารประเภทไขมัน เพื่อป้องกันการหืนได้เป็นอย่างดี

ในประเทศญี่ปุ่นมีการผลิต pullulan ในระดับอุตสาหกรรมโดยเริ่มจากเชื้อรา *Aureobasidium* sp. โดยการเลี้ยงเชื้อรา ในอาหารเหลว starch syrup แล้วนำน้ำที่เลี้ยงเชื้อรามาทำให้เข้มข้น ต่อด้วยการทำแห้ง ก็จะได้ผลผลิตออกมา ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และพอลิเมอร์ (The amylase research society of Japan,

1988) นอกจากนั้นยังมีการนำไปใช้เป็นพอลิเมอร์ประเภทฟิล์มเคลือบวัสดุและบรรจุภัณฑ์ต่างๆ (Yeun, 1972)

West และ Reed-Hamer (1993) รายงานถึงการผลิตพอลิเมอร์จาก *Aureobasidium* สายพันธุ์แปลง (mutant) จากการใช้น้ำตาล sucrose หรือ glucose เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าในสายพันธุ์ mutant มีการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin) น้อยลง

Strohfus และ West (1998) ได้รายงานถึงการนำ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC มาใช้ในการผลิตพูลูแลน โดยการทำการตรึงเซลล์ (immobilization) ยึดกับวุ้นหรือ resin ที่บรรจุใน column bioreactor พบว่ามีการให้ผลผลิตที่มีเม็ดสีเมลานินลดลง

งานวิจัยชิ้นนี้มุ่งไปที่การทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลูแลน โดยทำการเปรียบเทียบระหว่าง *Aureobasidium* 2 สายพันธุ์ ในแง่ของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิต อาทิเช่น ความเป็นกรดด่าง (pH) แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และการใช้อาหารเสริม เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด เพื่อเป็นแนวทางในการที่สามารถจะนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรม นอกจากนั้นยังได้มีการสกัดเอาพอลิเมอร์ออกมาทดสอบและวิเคราะห์ดูความบริสุทธิ์ของพูลูแลน เพื่อเป็นการรับรองในเชิงคุณภาพของสารที่ผลิตได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การเลี้ยงและการขยายพันธุ์เชื้อรา

Aureobasidium pullulans มี 2 สายพันธุ์คือ

1. สายพันธุ์ NRRL ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. T. D. Leathers, United States Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA

2. สายพันธุ์ TISTR ได้รับความอนุเคราะห์จาก Bangkok MERCEN, Institute of Scientific and Technological Research, Thailand

เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ได้ถูกนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อรามาตรฐานสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, USA) โดยเก็บเป็นหัวเชื้อไว้บน agar slant ที่อุณหภูมิ 4°C

การขยายพันธุ์เชื้อราทำโดยการเลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA ใน petridish เป็นเวลา 4 วัน ดูลักษณะการเจริญหลังจากนั้นจึงย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB (Difco, USA) โดยการเติมหัวเชื้อ 5% V/V inoculum ที่มีเซลล์ตั้งต้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงใน flask ขนาด 250 ml เขย่า 150 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ศึกษาการเจริญเติบโตโดยดูจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น

การทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์

การหาสภาวะของ pH ที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร production ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.06% ปรับให้มี pH เริ่มต้น 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 ตามลำดับ ใช้หัวเชื้อ *A. pullulans* เริ่มต้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่า incubater shaker (Newbrunswick, USA) คุมอุณหภูมิที่ 25°C, 150 rpm เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำไปสกัดหาพูลูแลนที่เชื้อราผลิตขึ้น

การหาสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร production โดยปรับ pH ตาม pH ที่เหมาะสมที่ทดสอบได้ อุณหภูมิที่ใช้มี 3 ระดับคือ 25 30 และ 35°C บ่มในเครื่องเขย่า incubator shaker ที่ควบคุมอุณหภูมิได้, 150 rpm เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำไปสกัดหาพูลูแลนที่เชื้อราผลิตขึ้น

การหาสภาวะอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์

Carbon sources

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร production ในสภาพ pH และอุณหภูมิเหมาะสมที่หาได้ แหล่งคาร์บอน ที่ใช้ทดสอบมี 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส (glucose; Sigma, USA) และน้ำตาลซูโครส (sucrose ; Carlo Erba, Italy) ที่ความเข้มข้น 5% W/V บ่มเชื้อใน flasks บนเครื่องเขย่า incubator shaker 150 rpm เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำไปสกัดหาพูลูแลนที่เชื้อราผลิตขึ้น

Nitrogen sources

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร production ในสภาพ pH อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน ที่เหมาะสมที่หาได้ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ทดสอบมี 2 ชนิด คือ $(NH_4)_2SO_4$ (Carlo Erba, Italy) และ Peptone (Difco, USA) ที่ความเข้มข้น 0.06% W/V บ่มเชื้อใน flasks บนเครื่องเขย่า incubator shaker 150 rpm เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำไปสกัดหาพูลูแลนที่เชื้อราผลิตขึ้น

การทดสอบหาสภาวะการมีปริมาณอากาศที่เหมาะสมของการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร production ในสภาพ pH อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่หาได้ ทดสอบความต้องการอากาศที่มีผลต่อการผลิตโดยปรับระดับปริมาตรอาหารเหลวในแต่ละ flasks ไม่เท่ากันคือ 50 100 และ 150 ml ใน flasks ขนาด 250 ml ตามลำดับ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่า incubator shaker 150 rpm เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำไปสกัดหาพูลูแลนพอลิเมอร์ที่เชื้อราผลิตขึ้น

การผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์โดยการเติมอาหารเสริม (nutrient supplementation)

เลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร production ในสภาพ pH อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่หาได้ ปรับปริมาตรของอาหารเหลวให้สอดคล้องตามสภาวะอากาศที่เหมาะสมแล้วเพิ่มอาหารเสริมคือ casein peptone (Marcor Dev. Corp., N.J., USA) ที่ความเข้มข้น 0.06% W/V บ่มเชื้อใน flasks บนเครื่องเขย่า incubator shaker 150 rpm เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำไปสกัดหาพูลูแลนพอลิเมอร์ที่เชื้อราผลิตขึ้น

การวิเคราะห์และการทดสอบพอลิเมอร์

การวิเคราะห์ทางเคมี

นำน้ำเลี้ยงเชื้อ (spent medium) มาสกัดด้วยแอลกอฮอล ให้ได้พูลูแลนพอลิเมอร์ หาน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นนำมาบดและใส่ใน 95% KBr นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Infrafed spectrophotometer (Perkin Elmer, FT-IR spectrophotometer 1760x, USA) เทียบกับพูลูแลนพอลิเมอร์มาตรฐานที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* (Sigma chemical, USA)

การทดสอบคุณสมบัติบางประการของพูลูแลนพอลิเมอร์

คุณสมบัติการถูกละลาย

นำพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ได้ 0.1 กรัมน้ำหนักแห้งมาใส่ในตัวทำละลายได้แก่ น้ำกลั่น ethanol 95% และน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาตร 10 ml เขย่าบนเครื่องเขย่า 300 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมงตรวจดูการละลาย

คุณสมบัติการถูกย่อยสลายในธรรมชาติ

นำแท่งพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตได้มาตั้งทิ้งไว้ในธรรมชาติ บนดินที่ชื้นเป็นเวลา 9 วัน สังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น บันทึกภาพ

การวิจัยครั้งนี้ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง

ผลการวิจัย

การเจริญของ *A. pulluans*

เมื่อนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร PDA เชื้อ *A. pulluans* จะเจริญได้ดีมีลักษณะของโคโลนีคล้ายยีสต์คือเป็นสีขาวบางส่วนมีลักษณะไม่เรียบของ pseudohyphae (ภาพที่ 1.) เมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นลักษณะของยีสต์เซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะของ blastospores และเซลล์ที่มีรูปร่างอื่นๆ ที่แสดงถึงคุณสมบัติเด่นของเชื้อราประเภทนี้คือ เป็น polymorphism การเจริญในอาหารเหลวสูตร PDB สายพันธุ์ NRRL จะได้กราฟของการเจริญที่มี lag phase หรือระยะปรับตัวในช่วง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจึงเข้าสู่ระยะ log phase อีก 12 ชั่วโมง จึงเข้าสู่ stationary phase และเข้าสู่ death phase ประมาณก่อนเข้าชั่วโมงที่ 48 ตามลำดับ (ภาพที่ 2.) ส่วนสายพันธุ์ TISTR การเจริญจะเข้าสู่ระยะ log phase ได้เร็วกว่า (ภาพที่ 3.)

สภาวะของ pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์

pH เริ่มต้นของอาหารสูตร production ที่ศึกษาอยู่ในช่วง 4.5-7.5 พบว่าทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ได้สูงสุด ที่ pH 6.5 ภายในระยะเวลา 5 วันของการผลิต โดยสายพันธุ์ NRRL ให้ผลผลิตสูงสุดที่ 0.156 g/g carbon source (ตารางที่ 1.,ภาพที่ 4.) และสายพันธุ์ TISTR ให้ผลผลิตสูงสุดที่ 1.181 g/g carbon source (ตารางที่ 2., ภาพที่ 5.)

สภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์

อุณหภูมิที่ใช้ทดสอบอยู่ในช่วง 25-35°C โดยมี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 อันเป็น pH ที่เหมาะสม พบว่าสายพันธุ์ NRRL ให้ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์สูงสุด 0.166 g/g carbon source ที่อุณหภูมิ 30°C ในวันที่ 4 แล้วหลังจากนั้นผลผลิตลดลง (ตารางที่ 3., ภาพที่ 6.) ส่วนสายพันธุ์ TISTR ให้ผลผลิตได้สูงสุด 0.331 g/g carbon source ในวันที่ 5 ที่ 30°C (ตารางที่ 4., ภาพที่ 7.)

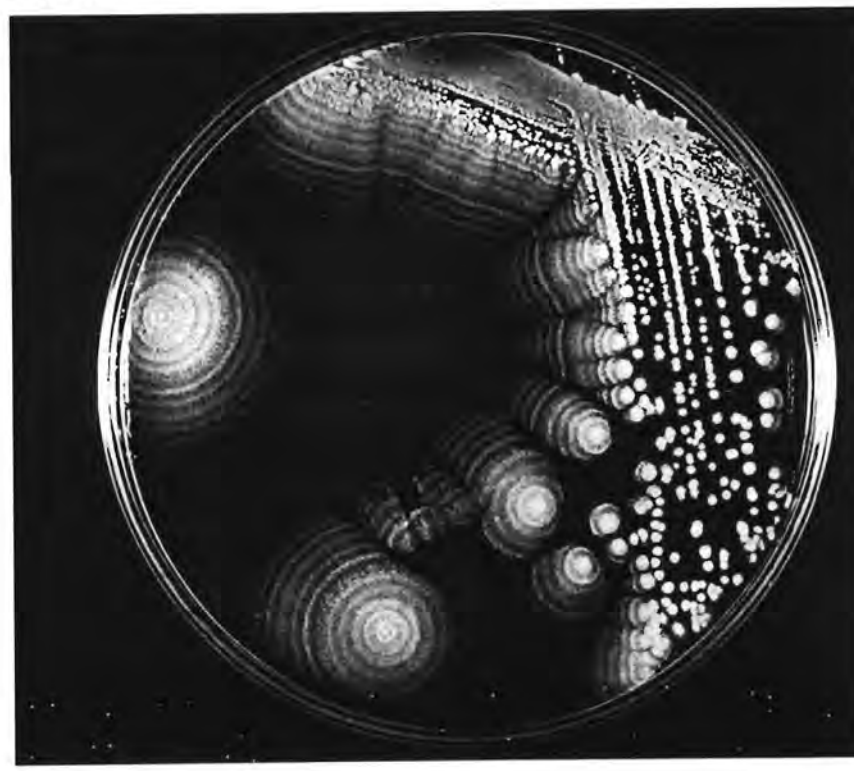
สภาวะอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์

Carbon sources

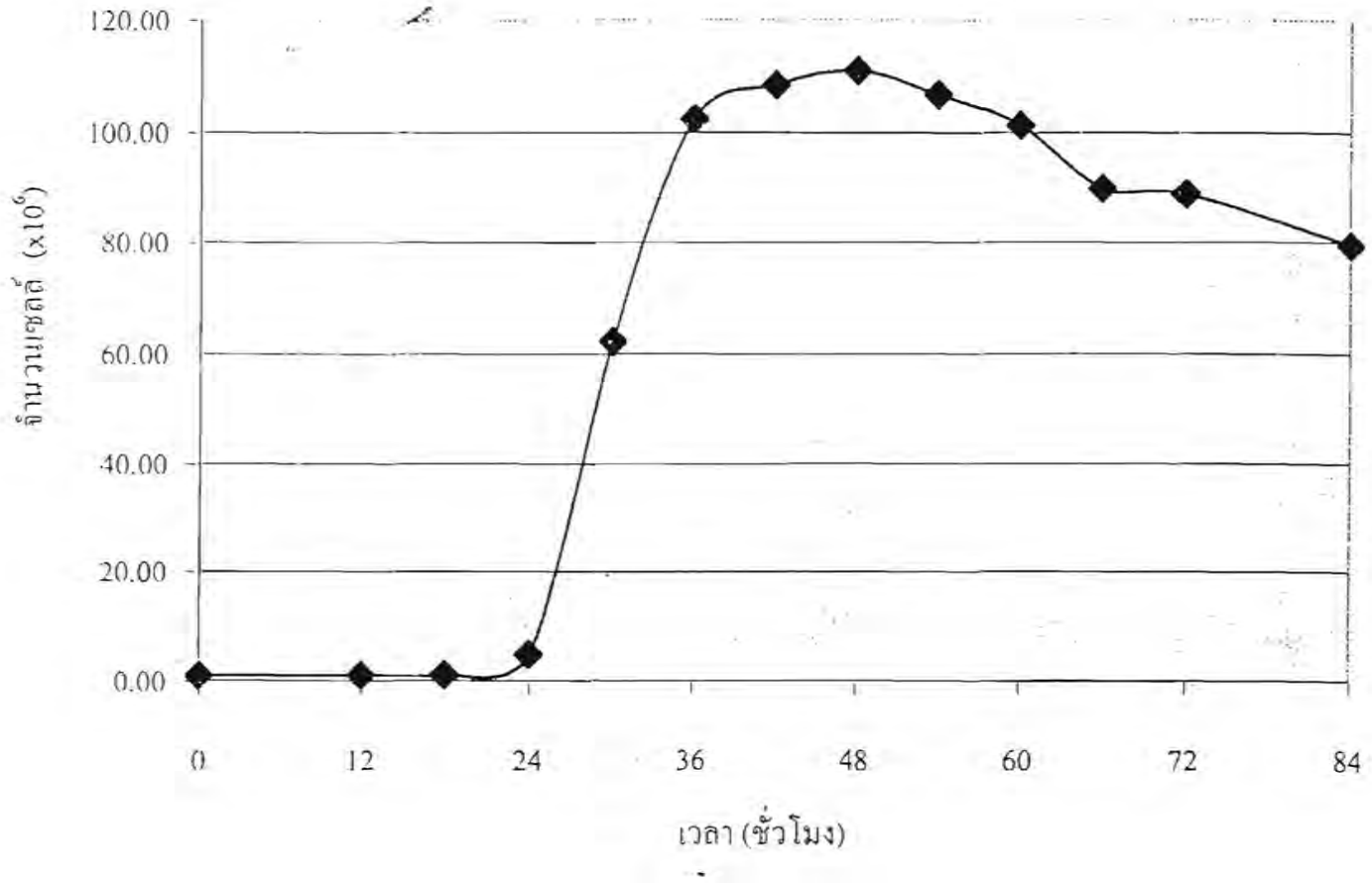
แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมี 2 ชนิดคือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครส *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์ ใช้น้ำตาลซูโครสได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส ดังจะเห็นได้จากข้อมูลในตารางที่ 5. ภาพที่ 8. แสดงถึงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์สูงสุดของ *A. pullulans*

ภาพที่ 1. ลักษณะของ *A. pullulans* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA

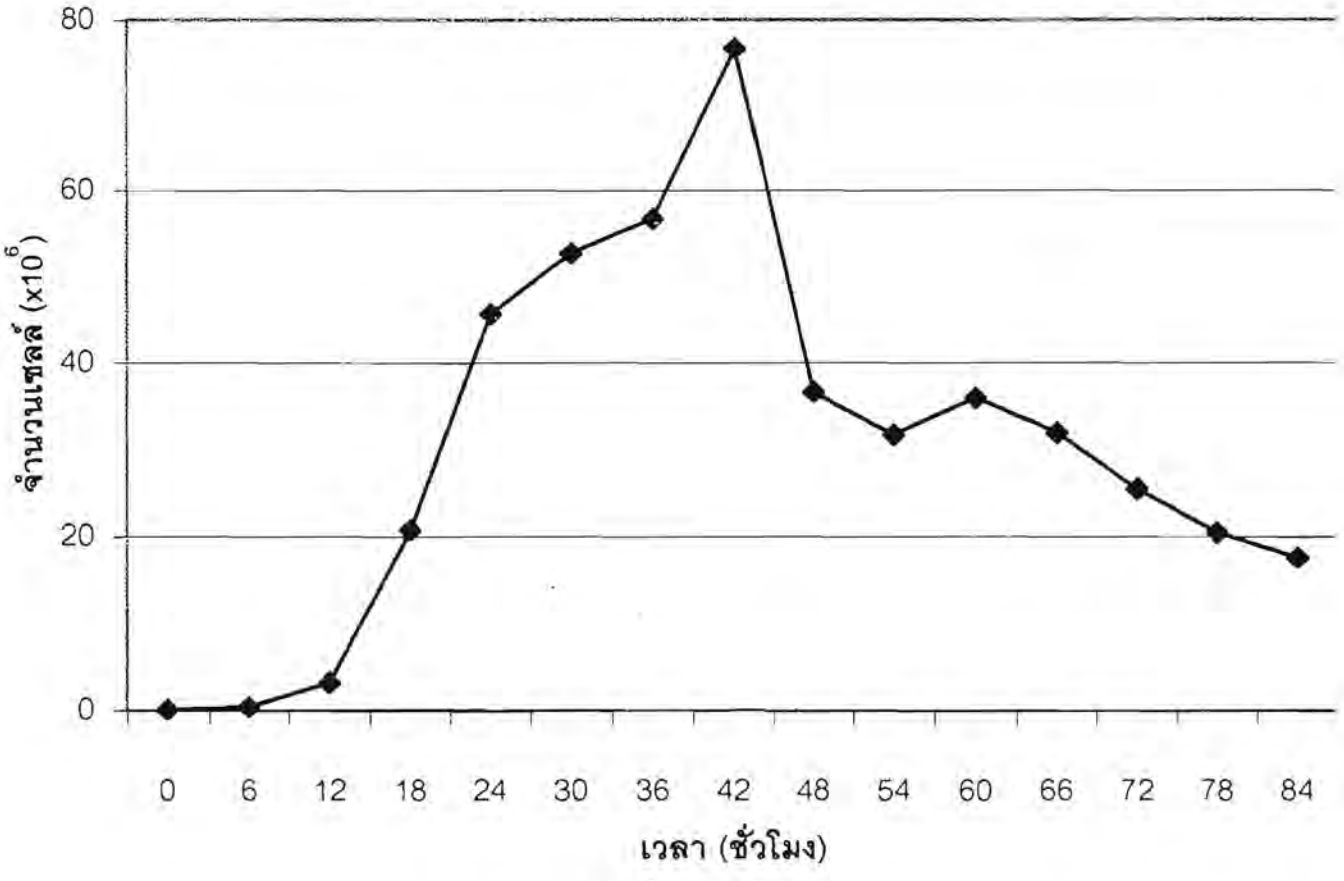
ก. *A. pullulans* NRRL



ข. *A. pullulans* TISTR



ภาพที่ 2. กราฟแสดงการเจริญของ *A. pullulans* NRRL



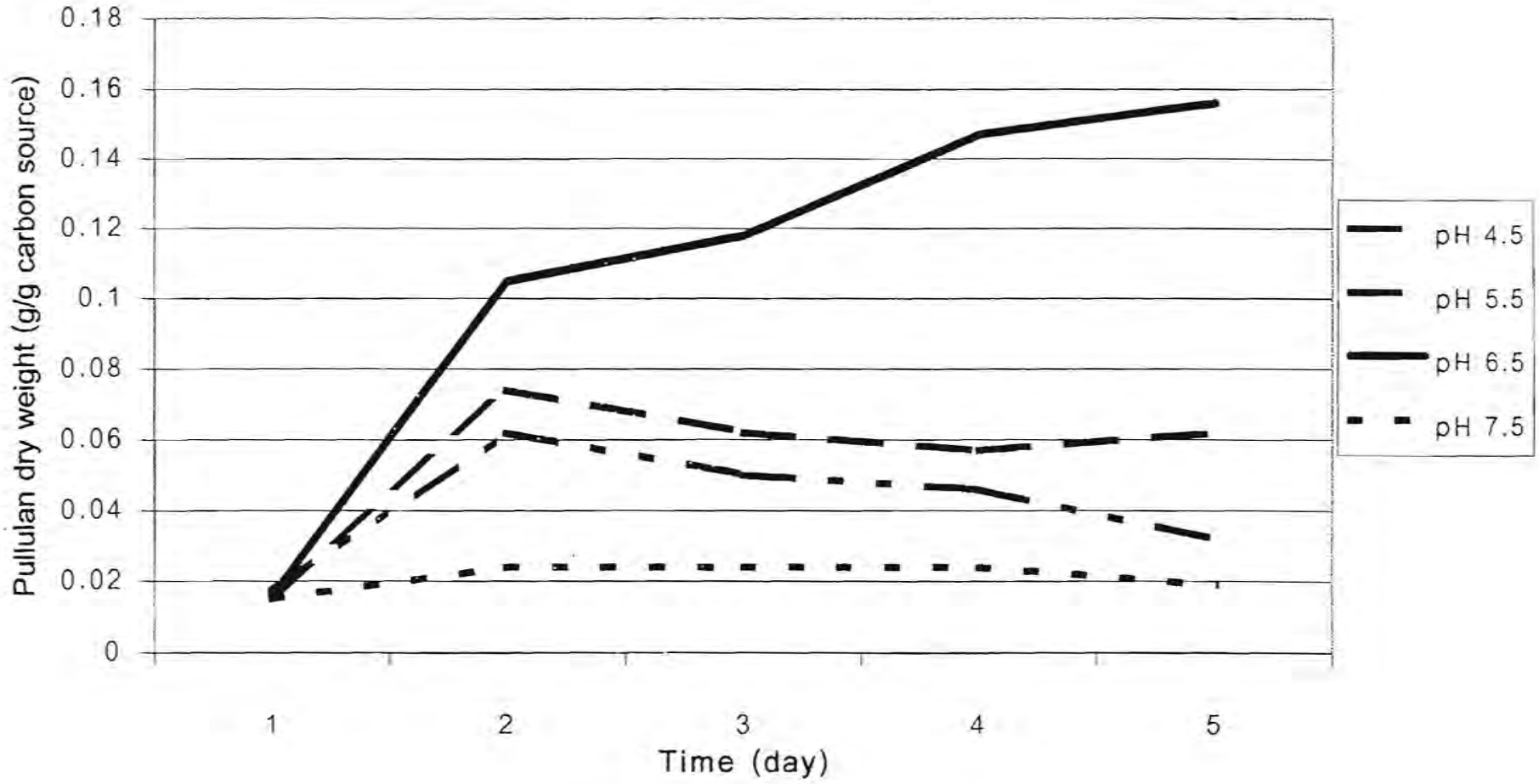
ภาพที่ 3. กราฟแสดงการเจริญของ *A. pullulans* TISTR

ตารางที่ 1. ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL

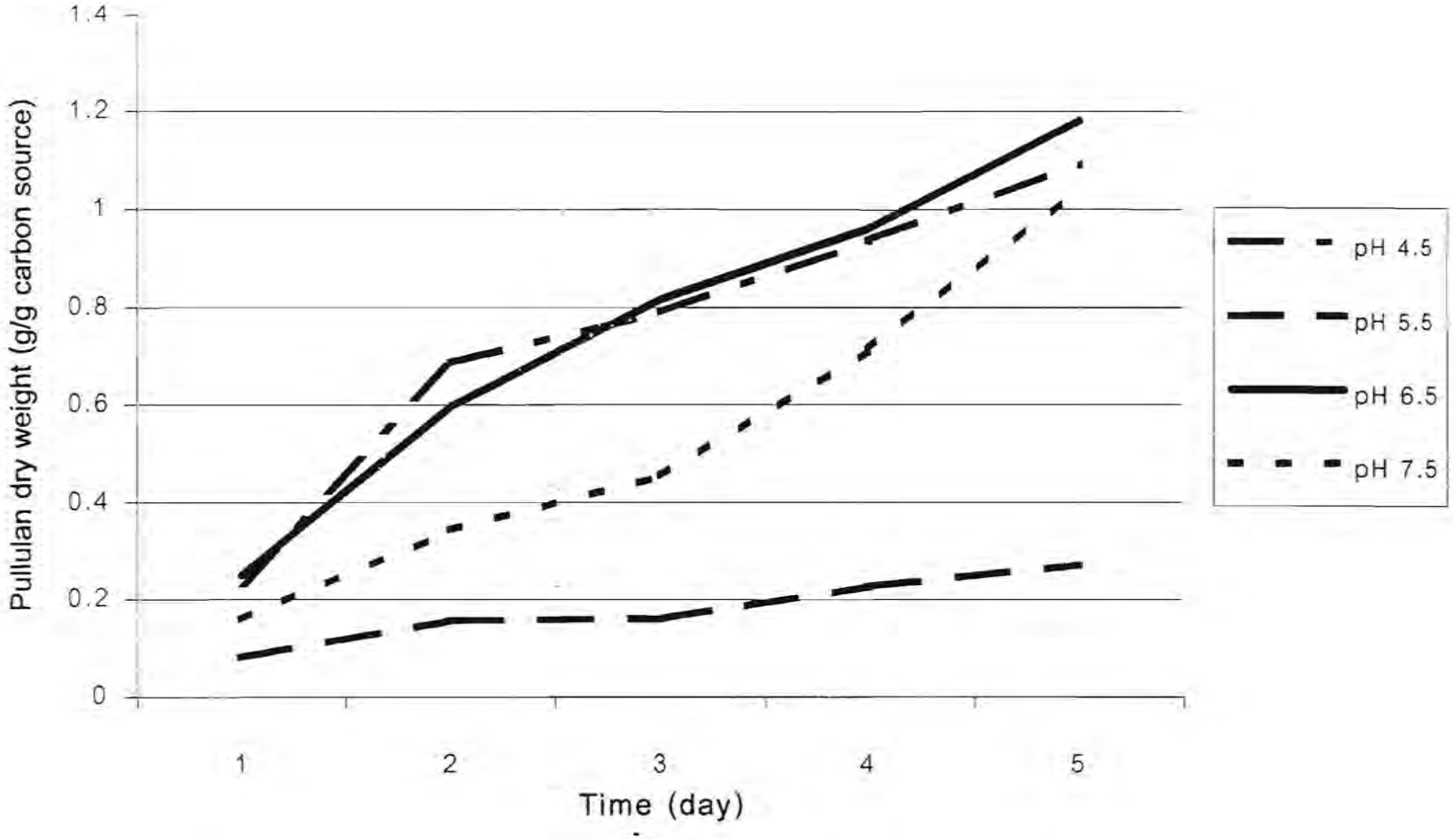
ระดับ pH	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
	1	2	3	4	5
4.5	0.017	0.062	0.050	0.046	0.032
5.5	0.016	0.074	0.062	0.057	0.062
6.5	0.016	0.105	0.118	0.147	0.156
7.5	0.015	0.024	0.024	0.024	0.019

ตารางที่ 2. ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR

ระดับ pH	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
	1	2	3	4	5
4.5	0.233	0.686	0.789	0.937	1.092
5.5	0.080	0.157	0.160	0.227	0.272
6.5	0.250	0.598	0.817	0.961	1.181
7.5	0.159	0.344	0.455	0.713	1.044



ภาพที่ 4. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ pH ต่างๆ ของ *A. pullulans* NRRL



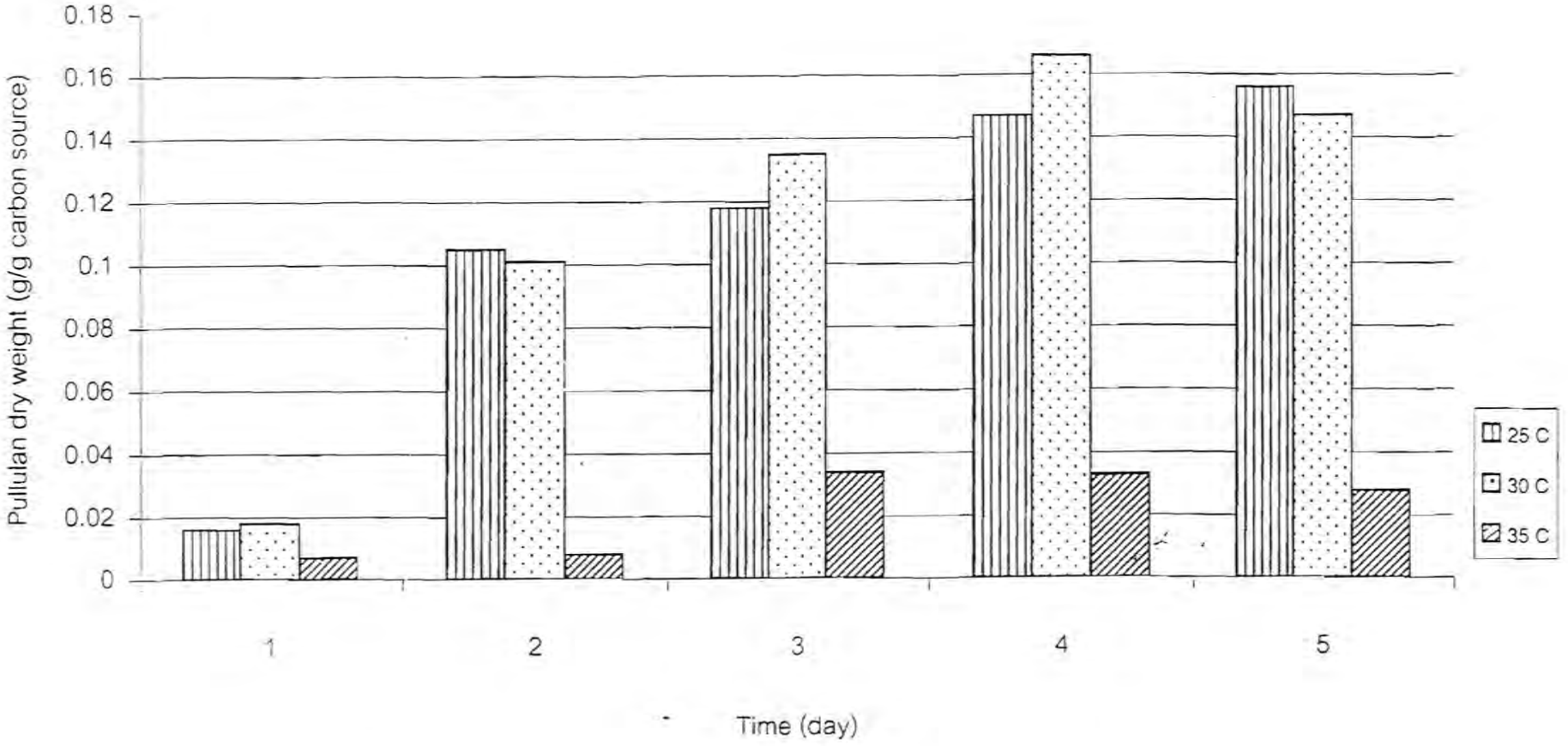
ภาพที่ 5. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ pH ต่างๆ ของ *A. pullulans* TISTR

ตารางที่ 3. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะอุณหภูมิ 25 30 และ 35°C ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL

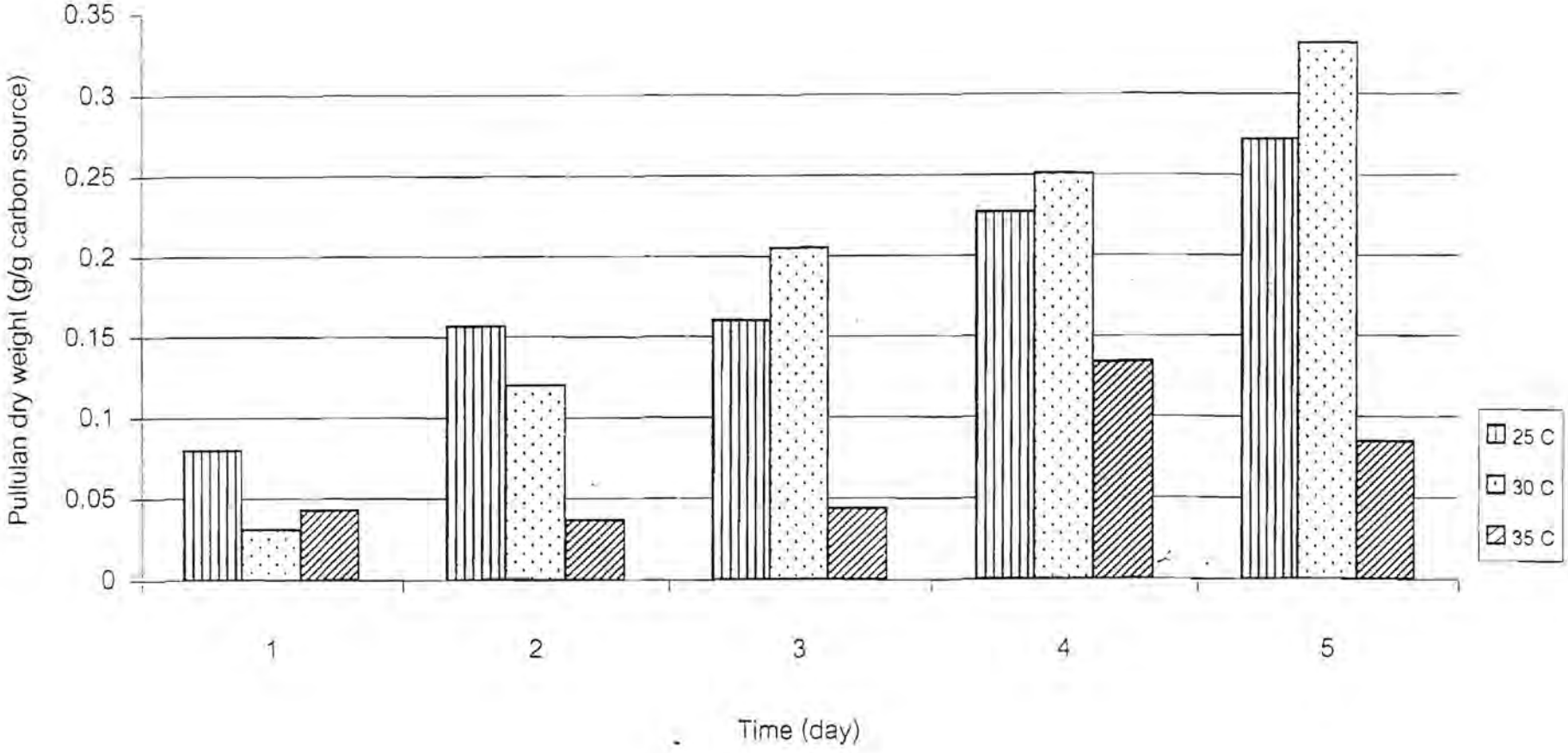
ระดับ	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
อุณหภูมิ	1	2	3	4	5
25°C	0.016	0.105	0.118	0.147	0.156
30°C	0.018	0.101	0.135	0.166	0.147
35°C	0.007	0.008	0.034	0.033	0.028

ตารางที่ 4. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะอุณหภูมิ 25 30 และ 35°C ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR

ระดับ	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
อุณหภูมิ	1	2	3	4	5
25°C	0.080	0.157	0.160	0.227	0.272
30°C	0.031	0.120	0.205	0.251	0.331
35°C	0.043	0.037	0.044	0.134	0.085



ภาพที่ 6. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ ของ *A. pullulans* NRRL



ภาพที่ 7. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ที่อุณหภูมิต่างๆ ของ *A. pullulans* TISTR

สายพันธุ์ NRRL ได้ 0.279 g/g carbon source ในวันที่ 5 และในตารางที่ 6. ภาพที่ 9. แสดงถึงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์สูงสุด ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR ได้ 0.376 g/g carbon source ในวันที่ 5 เช่นกัน

Nitrogen sources

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมี 2 ชนิดคือ $(NH_4)_2SO_4$ และ Peptone พบว่า *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์ ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ได้ดีกว่า peptone โดยสายพันธุ์ *A. pullulans* NRRL ได้ผลผลิตสูงสุด 0.279 g/g carbon source ในวันที่ 5 เมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ขณะที่ peptone ให้ผลผลิตต่ำกว่ามาก โดยได้ผลผลิตสูงสุดเพียง 0.024 g/g carbon source เท่านั้น (ตารางที่ 7., ภาพที่ 10.)

สายพันธุ์ *A. pullulans* TISTR ให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ 0.376 g/g carbon source ในวันที่ 5 ขณะที่ peptone ให้ผลผลิตเพียง 0.168 g/g carbon source (ตารางที่ 8., ภาพที่ 11.)

<u>สภาวะการมีปริมาณอากาศที่เหมาะสมของการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์</u>

การทดสอบพบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ได้สูงสุดในสภาวะที่มีปริมาตรอาหารเหลว 100 ml ในขวด flask ขนาด 250 ml โดยผลิตได้ 0.279 g/g carbon source ตามด้วยสภาวะที่มีอาหารเหลว 50 ml และ 150 ml ตามลำดับ (ตารางที่ 9., ภาพที่ 12.) ส่วน *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR ผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ได้สูงสุดในสภาวะที่มีปริมาตรอาหารเหลว 50 ml ในขวด flask ขนาด 250 ml โดยผลิตได้ 0.386 g/g carbon source ตามด้วยสภาวะที่มีอาหารเหลว 100 ml และ 150 ml ตามลำดับ (ตารางที่ 10.,ภาพที่ 13.)

<u>การผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์โดยการเติมอาหารเสริม</u>

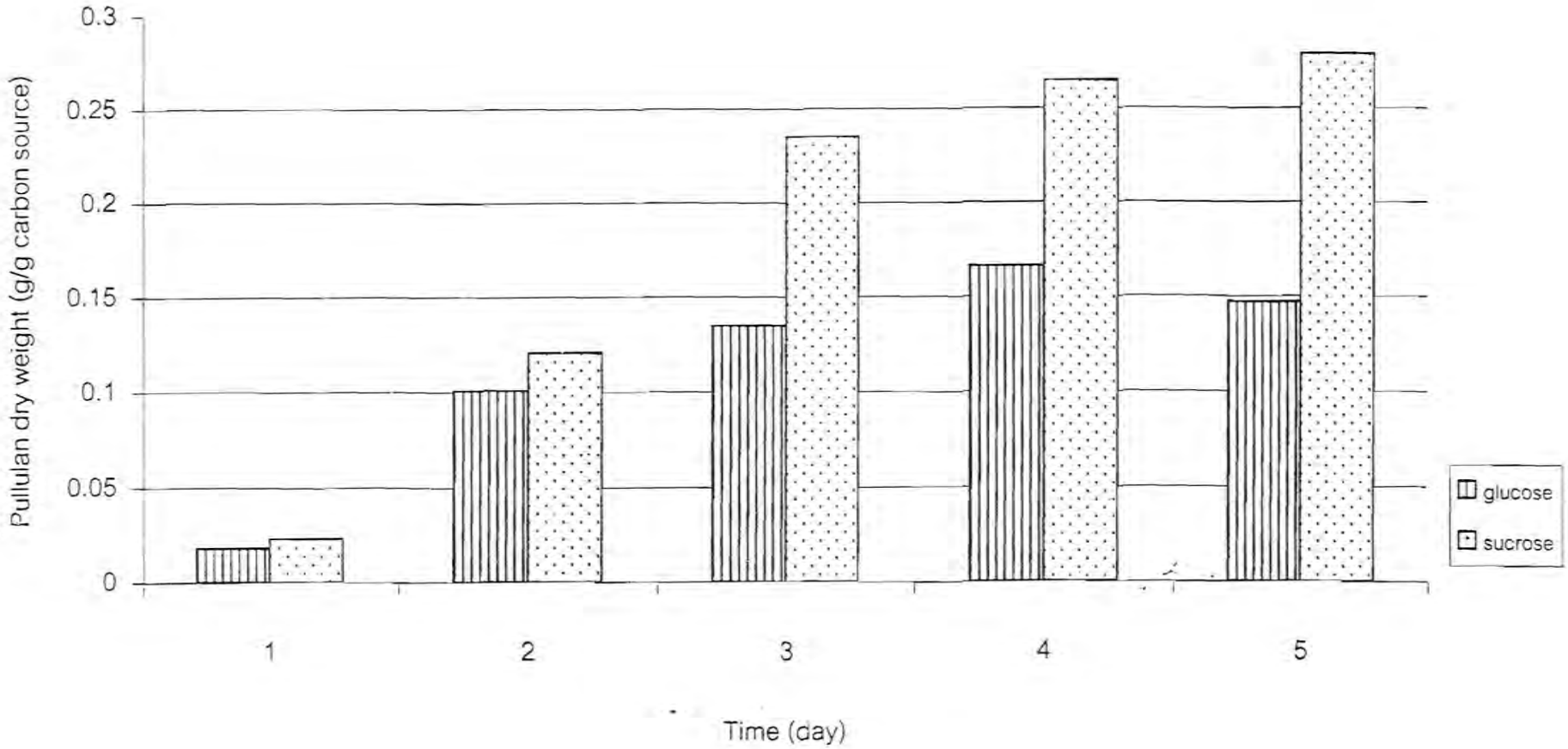
อาหารเสริมที่ใช้คือ casein peptone พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRLที่ผลิตในสภาวะอื่นเหมาะสมแล้ว เมื่อมีอาหารเสริมก็จะทำให้การผลิตมีผลผลิตสูงขึ้นเป็น 0.322 g/g carbon source ในระยะเวลา 5 วัน เทียบกับที่ไม่มีอาหารเสริม (ตารางที่ 11.,ภาพที่ 14.) ส่วน *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR เมื่อมีอาหารเสริมจะผลิตได้สูงสุดถึง 0.463 g/g carbon source ใน 5 วัน เมื่อเทียบกับที่ไม่ได้เติมอาหารเสริม (0.376 g/g carbon source) (ตารางที่ 12., ภาพที่ 15.)

ตารางที่ 5. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะแหล่งคาร์บอนต่างๆ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL

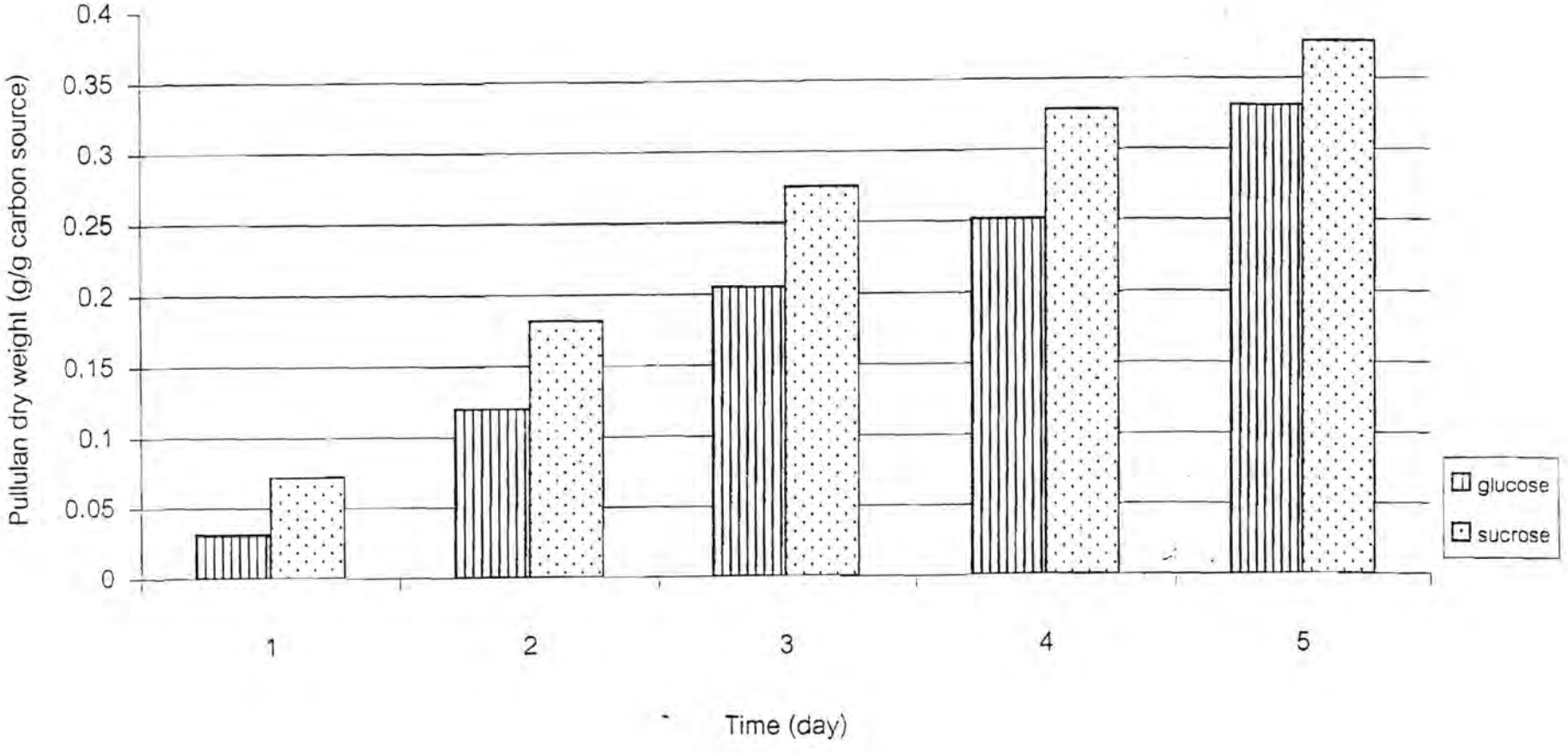
แหล่งคาร์บอน	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
	1	2	3	4	5
Glucose	0.018	0.101	0.135	0.166	0.147
Sucrose	0.023	0.121	0.235	0.265	0.279

ตารางที่ 6. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะแหล่งคาร์บอนต่างๆ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR

แหล่งคาร์บอน	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
	1	2	3	4	5
Glucose	0.031	0.120	0.205	0.251	0.331
Sucrose	0.072	0.182	0.275	0.328	0.376



ภาพที่ 8. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* NRRLในสภาวะของแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด



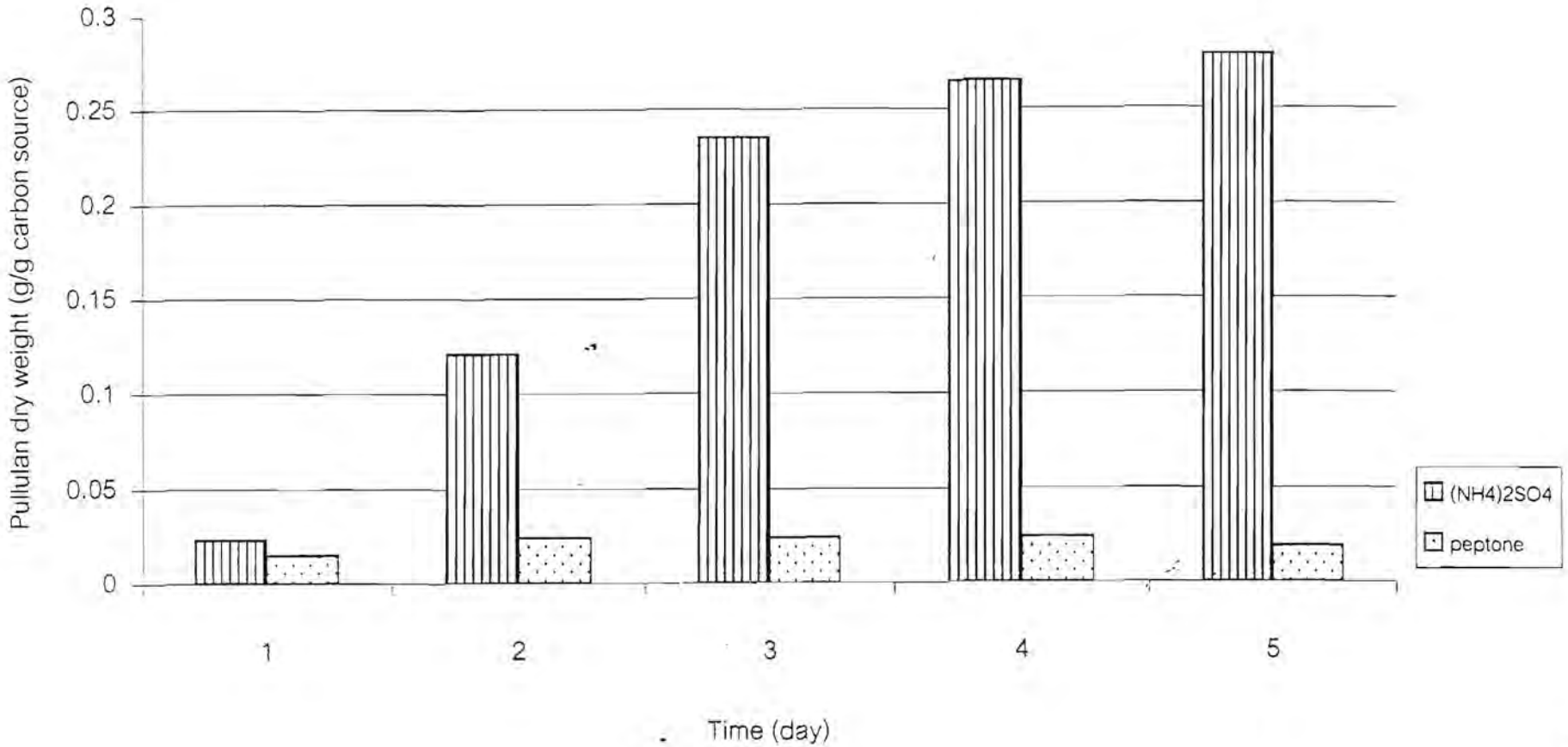
ภาพที่ 9. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* TISTR ในสภาวะของแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด

ตารางที่ 7. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL

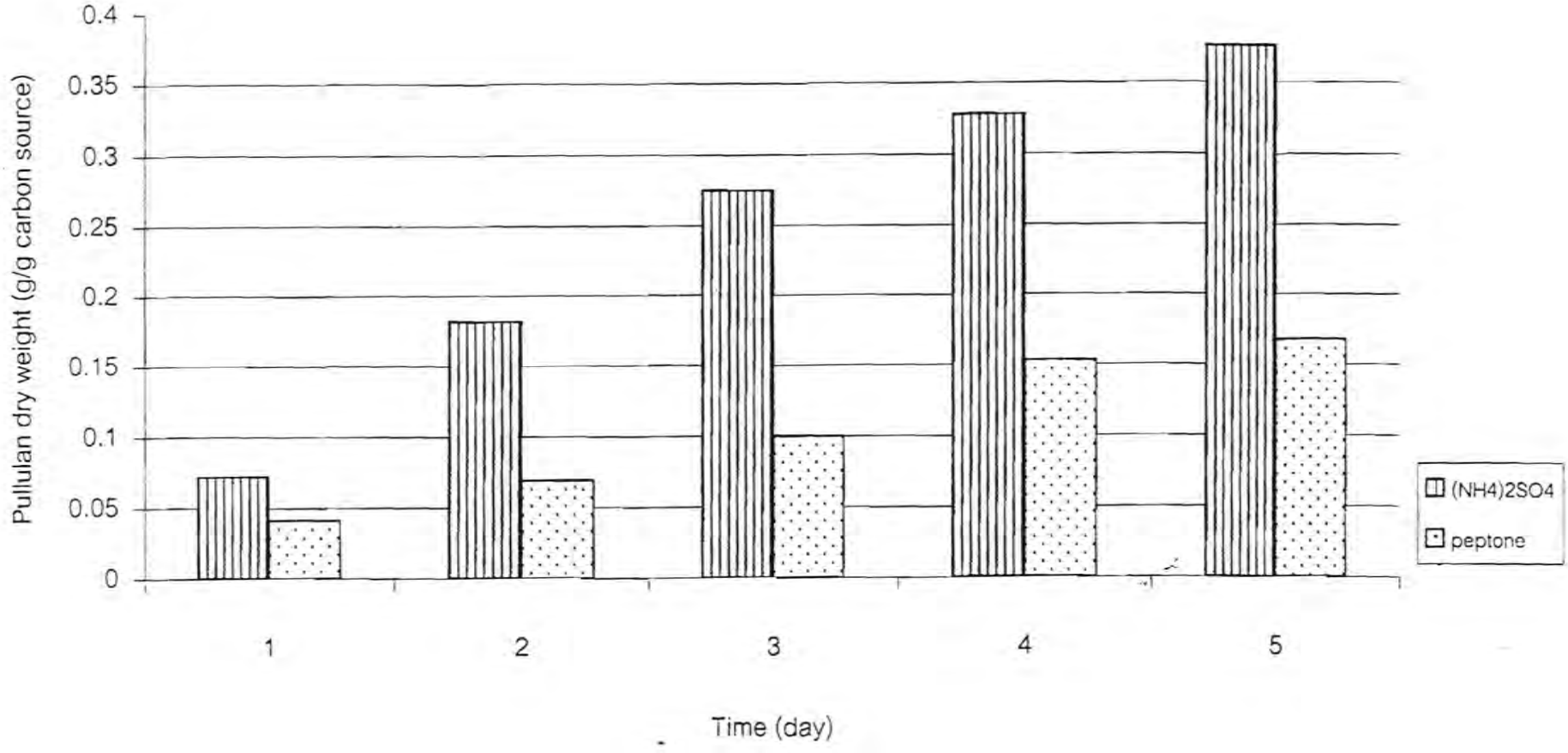
แหล่งไนโตรเจน	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
	1	2	3	4	5
$(NH_4)_2SO_4$	0.023	0.121	0.235	0.265	0.279
Peptone	0.015	0.024	0.024	0.024	0.019

ตารางที่ 8. ผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ที่สภาวะแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR

แหล่งไนโตรเจน	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
	1	2	3	4	5
$(NH_4)_2SO_4$	0.072	0.182	0.275	0.328	0.376
Peptone	0.041	0.069	0.100	0.153	0.168



ภาพที่ 10. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* NRRL ในสภาวะของแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด



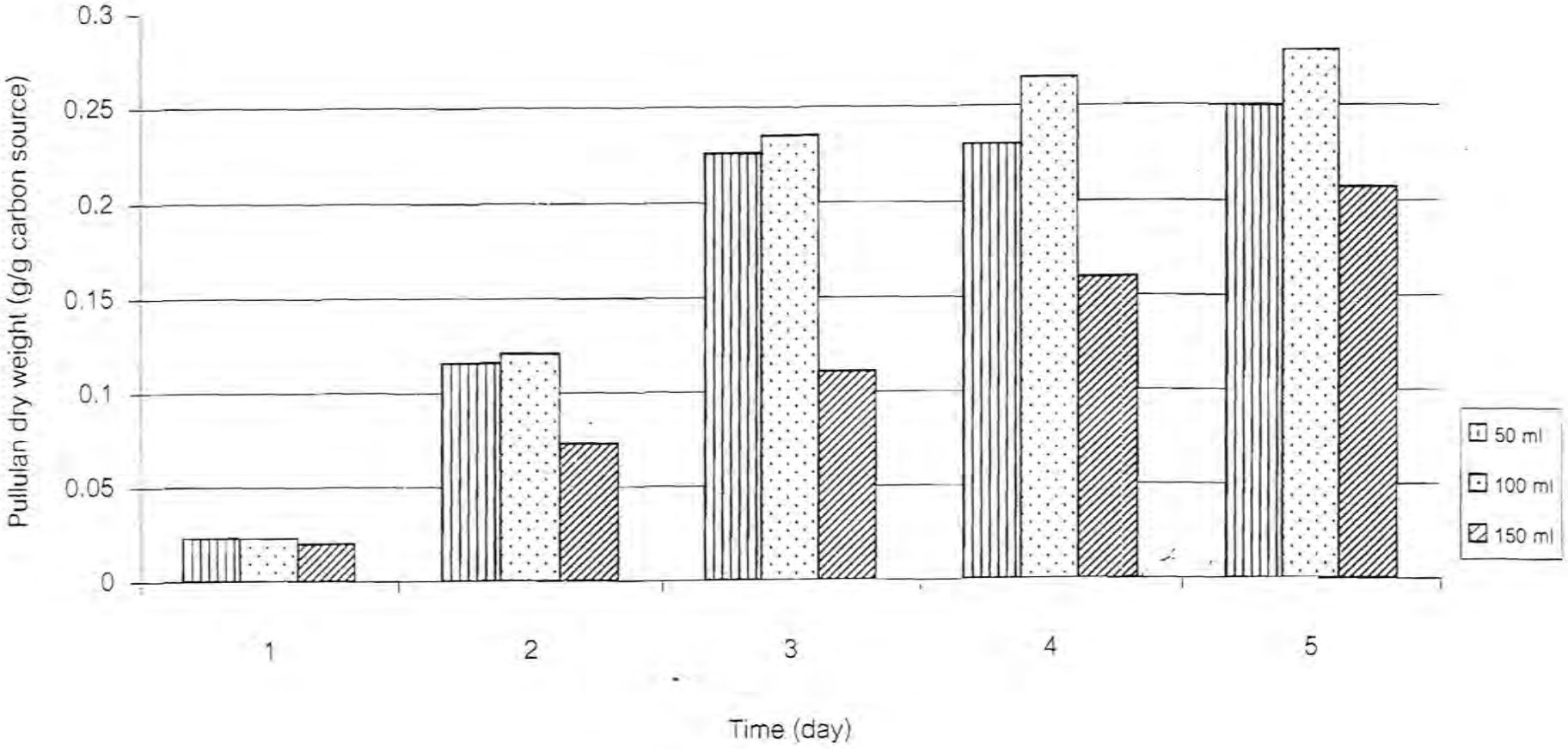
ภาพที่ 11. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* TISTR ในสภาวะของแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด

ตารางที่ 9. ผลของการมีปริมาณอากาศต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL

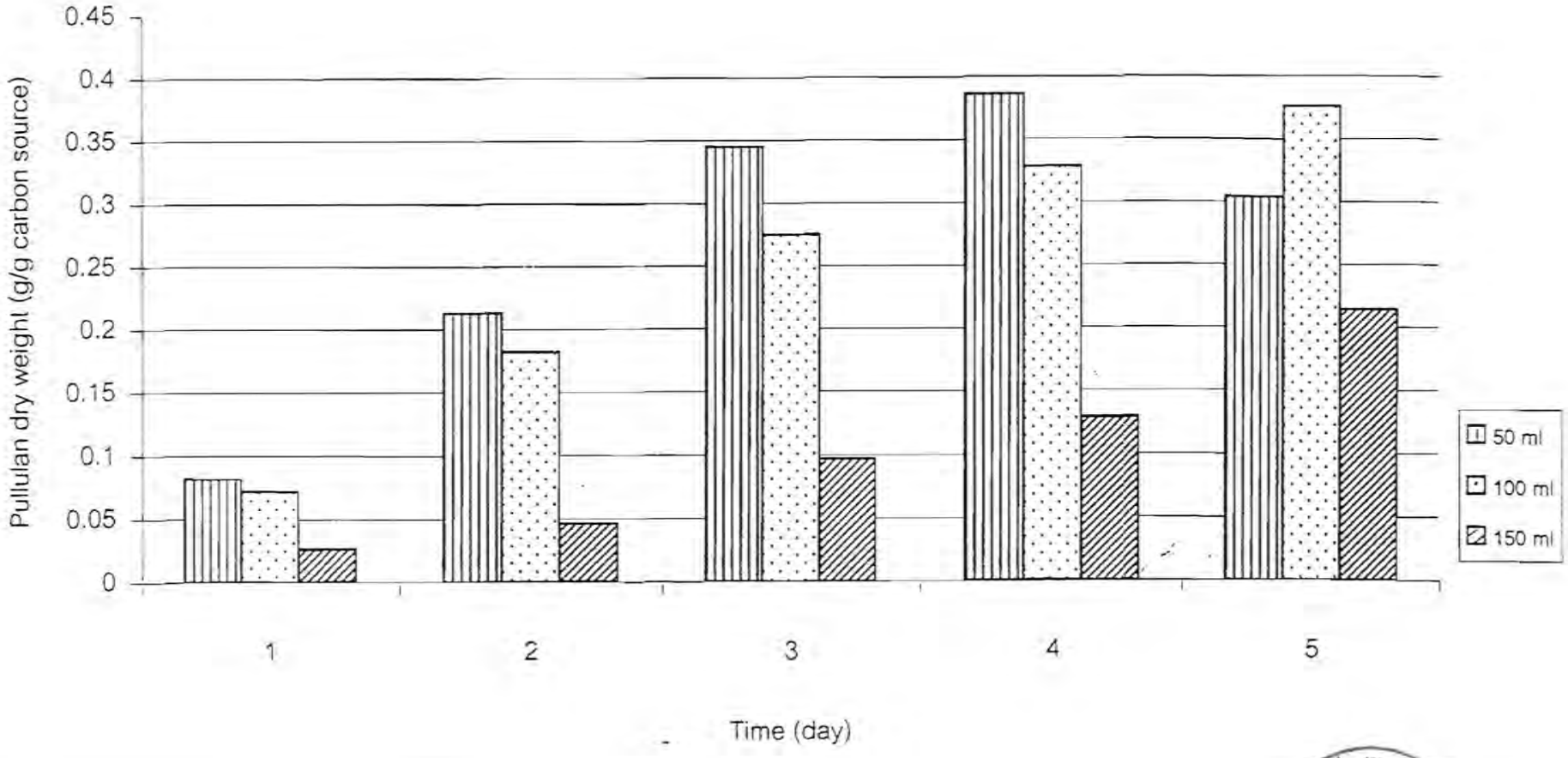
ปริมาณอากาศ	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
จากอาหาร	1	2	3	4	5
50 ml	0.023	0.116	0.226	0.230	0.250
100 ml	0.023	0.121	0.235	0.265	0.279
150 ml	0.020	0.073	0.111	0.160	0.207

ตารางที่ 10. ผลของการมีปริมาณอากาศต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR

ปริมาณอากาศ	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
จากอาหาร	1	2	3	4	5
50 ml	0.082	0.213	0.345	0.386	0.304
100 ml	0.072	0.182	0.275	0.328	0.376
150 ml	0.026	0.046	0.097	0.129	0.214



าพที่ 12. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. puliulans* NRRL ในสภาวะการมีปริมาณอากาศระดับต่าง ๆ



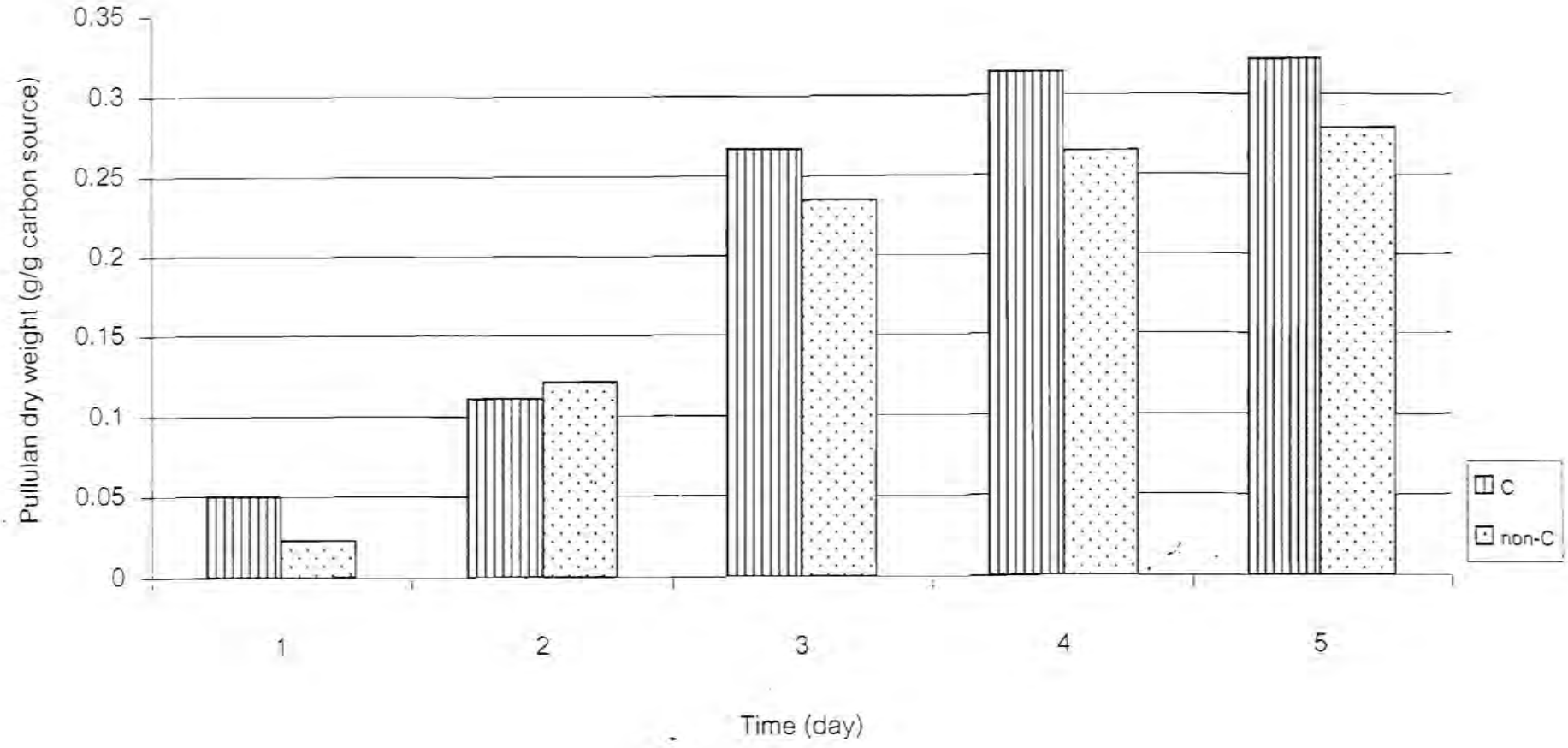
ภาพที่ 13. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ *A. pullulans* TISTR ในสภาวะการมีปริมาณอากาศระดับต่างๆ

ตารางที่ 11. ผลของการเติมอาหารเสริม casein peptone ที่มีต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL

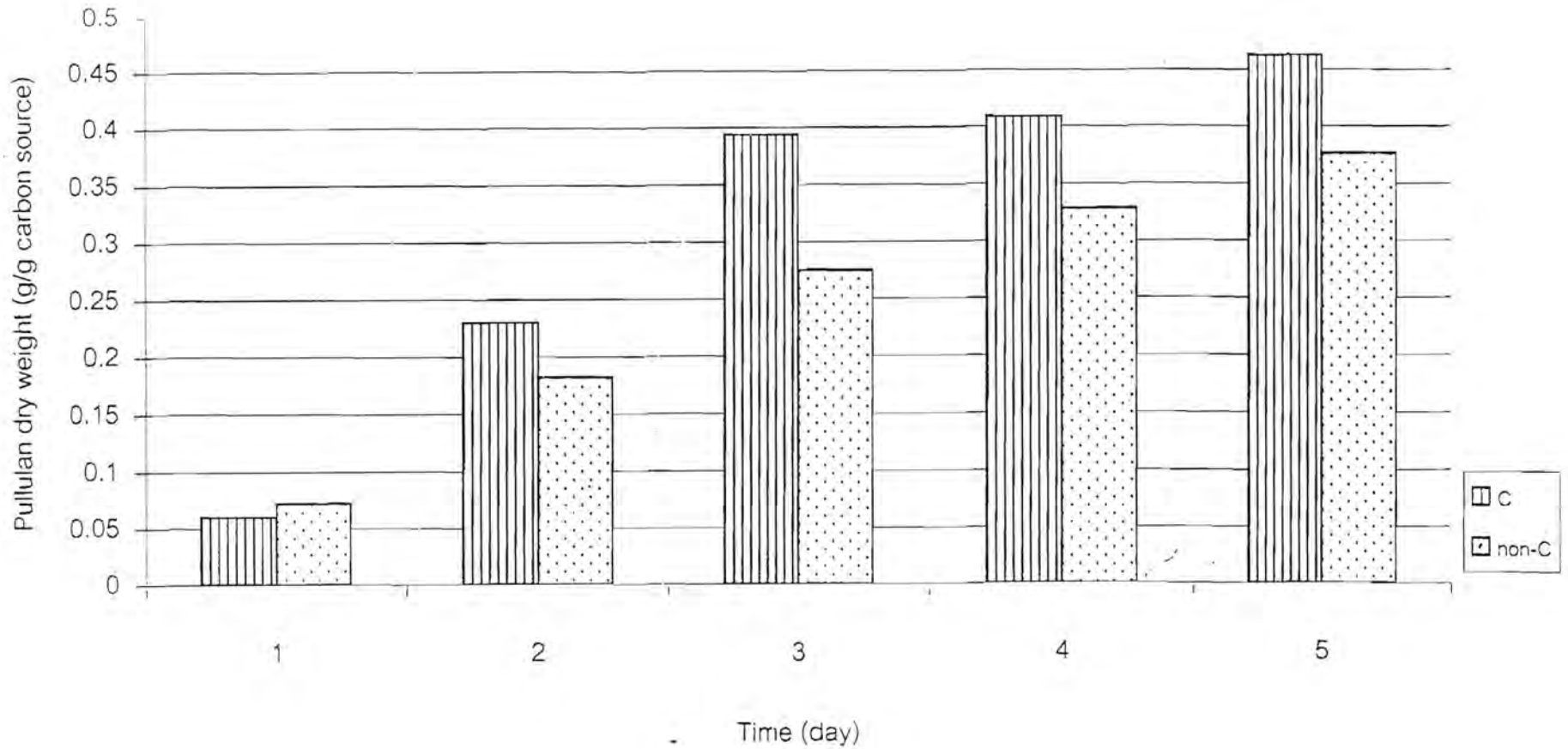
อาหารเสริม	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
	1	2	3	4	5
Casein peptone	0.050	0.111	0.267	0.314	0.322
control	0.023	0.121	0.235	0.265	0.279

ตารางที่ 12. ผลของการเติมอาหารเสริม casein peptone ที่มีต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR

อาหารเสริม	พูลูแลนพอลิเมอร์ (g/g carbon source) ผลิตเมื่ออายุ (วัน)				
	1	2	3	4	5
Casein peptone	0.060	0.230	0.394	0.409	0.463
control	0.072	0.182	0.275	0.328	0.376



ภาพที่ 14. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* NRRL ในสภาวะเหมาะสมที่มีการเติมอาหารเสริม



ภาพที่ 15. กราฟแสดงผลผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ *A. pullulans* TISTR ในสภาวะเหมาะสมที่มีการเติมอาหารเสริม

ผลของการวิเคราะห์และการทดสอบพูลูแลนพอลิเมอร์

การวิเคราะห์ทางเคมี

พูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตและสกัดได้ถูกนำไปทำเป็นแท่งอบแห้ง (ภาพที่ 16.) แล้วนำไปวิเคราะห์ว่าเป็นพูลูแลนพอลิเมอร์จริง โดยใช้วิธี IR-spectrophotometry IR curves ที่ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับพูลูแลนพอลิเมอร์มาตราฐานที่ผลิตจาก *A. pullulans* ของบริษัท Sigma, USA (ภาพที่ 17.) ว่าเป็นพูลูแลนพอลิเมอร์จริง โดยมีลักษณะ IR curves profile ของพูลูแลนพอลิเมอร์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL แสดงในภาพที่ 18. และ IR curves profile ของพูลูแลนพอลิเมอร์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR แสดงในภาพที่ 19. functional groups ของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ได้แสดงถึงการมี alkyl group, hydroxy หรือ amino compound และ aliphatic alcohol (ภาคผนวก)

คุณสมบัติของการละลาย

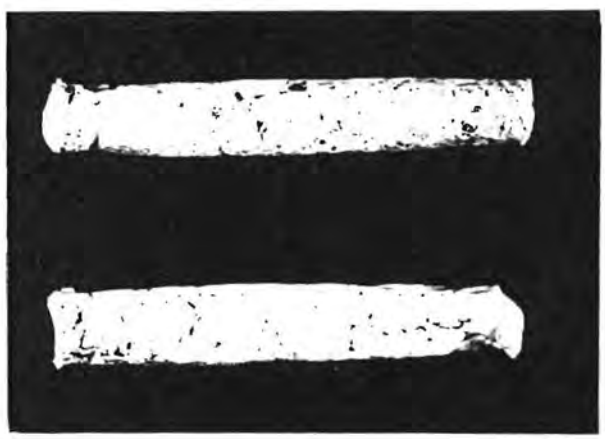
เมื่อทดสอบคุณสมบัติของการละลายของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ในตัวทำละลาย 3 ชนิด คือ น้ำกลั่น น้ำมันพืชและเอทธานอล พบว่าพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากทั้งสองสายพันธุ์มีคุณสมบัติของการถูกละลายเหมือนกันคือละลายได้ในน้ำกลั่น ไม่ละลายในน้ำมันพืชที่ใช้ทดสอบและเอทธานอล แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการถูกละลายไม่เท่ากัน คือพูลูแลนพอลิเมอร์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL ใช้เวลาถูกละลาย 15 นาที ขณะที่พูลูแลนพอลิเมอร์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ TISTR ใช้เวลาถึง 45 นาที (ตารางที่ 13.)

ผลการทดสอบการถูกย่อยสลายในธรรมชาติ

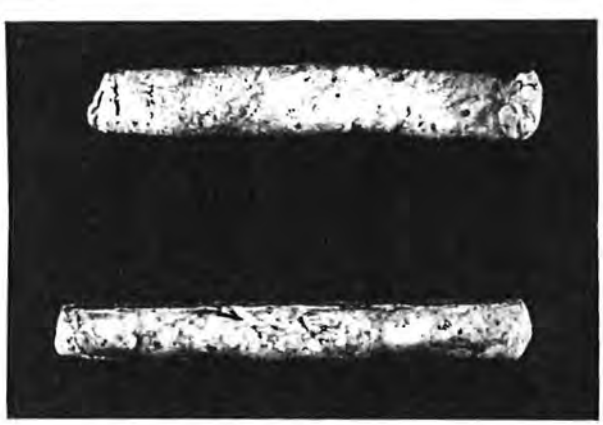
จากการสังเกตสภาพการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เมื่อได้วางแท่งพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผ่านการอบอัดแห้งไว้บนผิวดินที่มีความชื้นตามธรรมชาติ พบว่าแท่งพูลูแลนพอลิเมอร์จะเริ่มดูดซับความชื้นจากผิวดินและเปลี่ยนสีไป มีเส้นใยของราจากเชื้อราอื่นๆ ที่อาศัยอยู่ในดินลักษณะของราสร้างสปอร์สีเขียวมาขึ้น จนถึงวันที่ 5 เส้นใยของราเติบโตมากขึ้นขณะที่แท่งพูลูแลนพอลิเมอร์มีลักษณะโทรมเห็นการถูกย่อยสลายได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 20.)

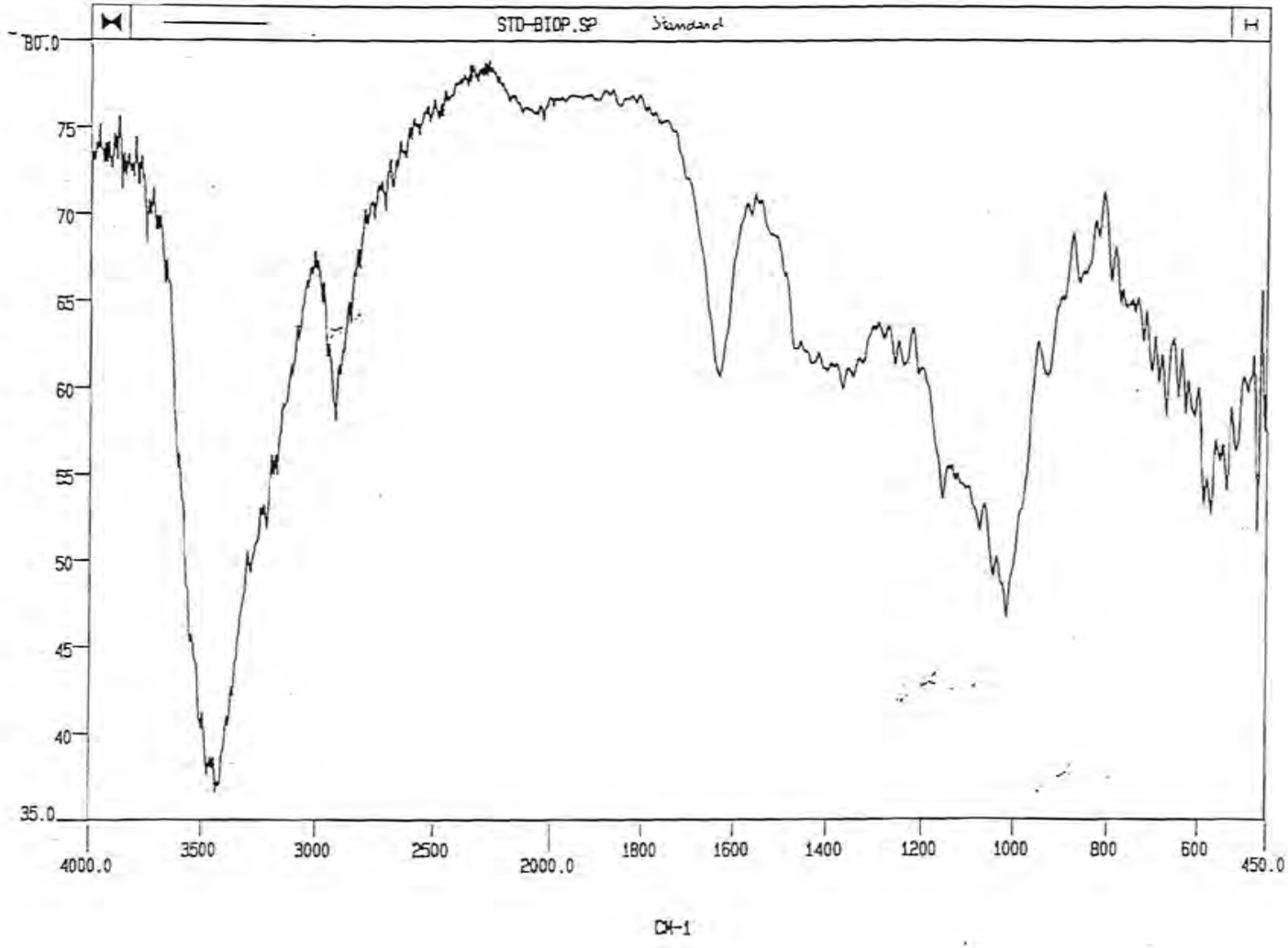
ภาพที่ 16. ลักษณะของแท่งพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

ก. *A. pullulans* NRRL

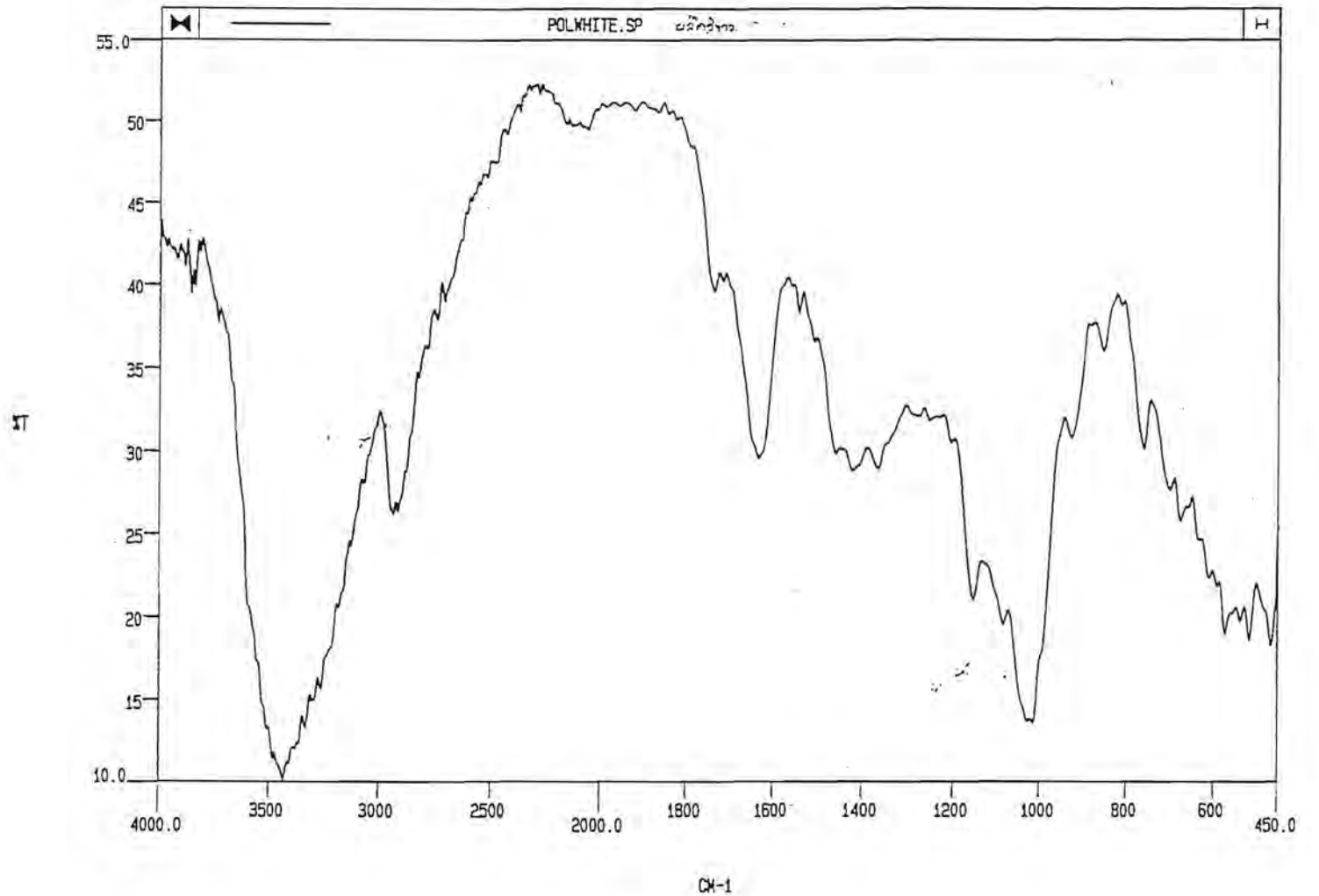


ข. *A. pullulans* TISTR

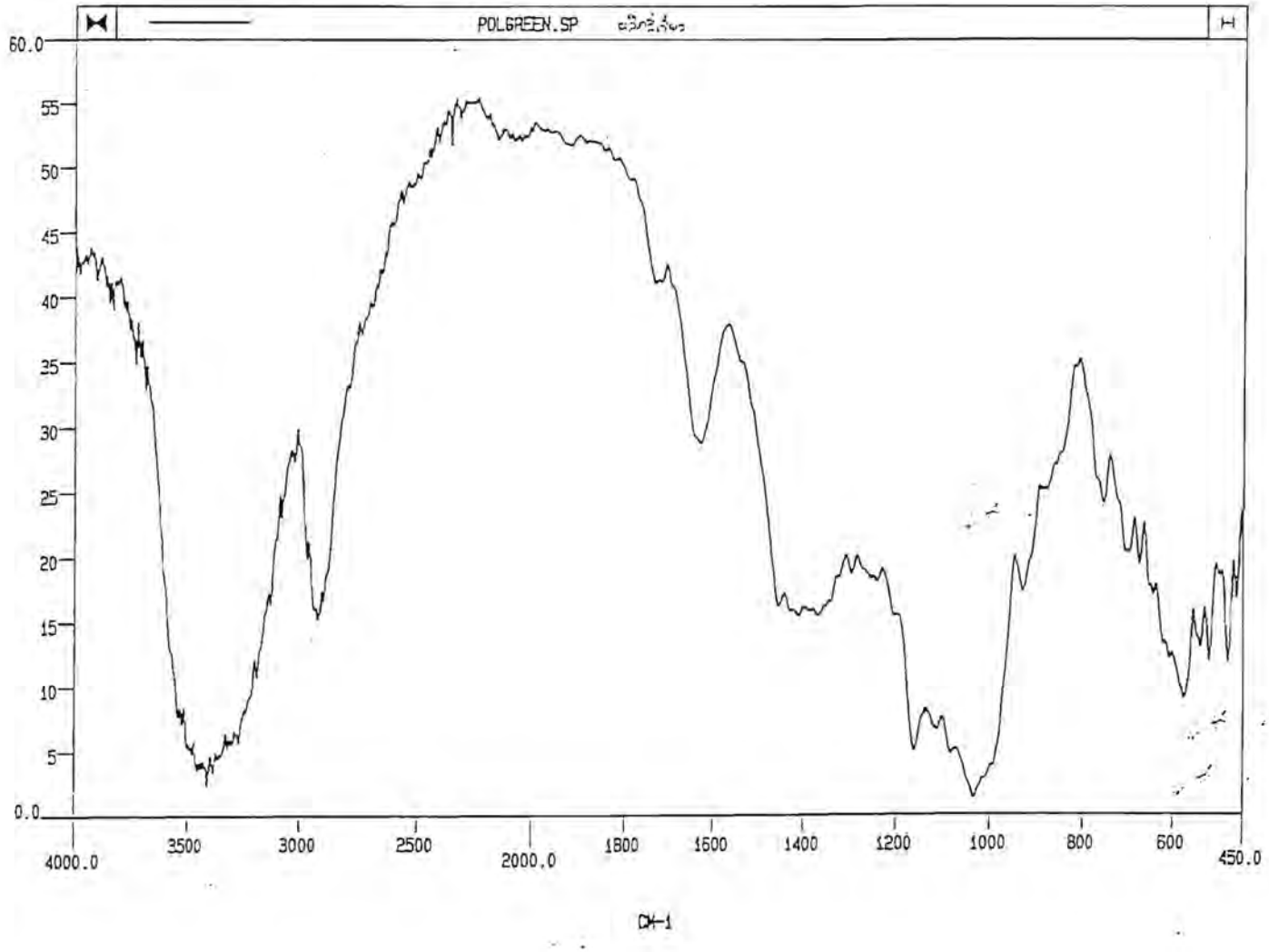




ภาพที่ 17. IR spectrum ของพูลูแลนพอลิเมอร์มาตรฐาน (Sigma, USA)



ภาพที่ 18. IR spectrum ของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL



ภาพที่ 19. IR spectrum ของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* TISTR

ตารางที่ 13. ผลการทดลองคุณสมบัติการถูกละลายของพูลูแลนพอลิเมอร์ ในตัวทำละลายขนาดต่างๆ

ชนิดของ	การถูกละลายในสารละลาย		
พูลูแลนพอลิเมอร์	น้ำ	เอทธานอล	น้ำมันถั่วเหลือง
A. pullulans NRRL	+++	-	-
A. pullulans TISTR	+	-	-

หมายเหตุ

+++ = 0.1 กรัม ถูกละลายหมดภายใน 15 นาที

\+ = 0.1 กรัม ถูกละลายหมดภายใน 45 นาที

\- = ไม่ถูกละลาย

ภาพที่ 20. ลักษณะของแท่งพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ถูกย่อยสลายในธรรมชาติ

ก. *A. pullulans* NRRL

ข. *A. pullulans* TISTR

การอภิปรายผลการทดลอง

A. pullulans ทั้งสองสายพันธุ์ เป็นเชื้อราชนิดเดียวกัน ดังนั้นลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงเหมือนกันแต่อาจต่างกันไปตามธรรมชาติของการเป็น polymorphism คือสายพันธุ์ TISTR เมื่อเจริญในวุ้นจะมีลักษณะเป็น pseudohyphae มากกว่าสายพันธุ์ NRRL ซึ่งดูเป็นลักษณะของโคโลนียีสต์มากกว่า นอกจากนั้นสายพันธุ์ TISTR ยังมีการสร้าง melanin pigment สีออกเขียวซึ่งจะติดมายังสีของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ด้วย ต่างกับสายพันธุ์ NRRL ที่จะให้พูลูแลนพอลิเมอร์สีขาวกว่า ลักษณะของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตได้เมื่อนำมาอัดแท่งแล้วอบแห้งจะมีลักษณะเป็นสารคล้ายพลาสติค แข็งแรง ผิวเรียบเป็นมัน ความที่เป็นเชื้อราชนิดเดียวกันความต้องการสภาวะที่เหมาะสมก็มักจะคล้ายกัน เช่น pH เป็น 6.5 เหมือนกัน แต่ TISTR จะผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ได้ดีในช่วง pH ที่กว้างกว่า อาทิเช่นที่ pH 4.5 ก็จะได้ผลผลิตไม่ต่างจากที่ pH 6.5 นัก ขณะที่สายพันธุ์ NRRL จะมีความจำเพาะที่ pH 6.5 มากกว่า

การทดสอบสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม พบว่าทั้งสองสายพันธุ์ชอบอุณหภูมิ 30°C คือให้ผลผลิตสูงสุด แต่ที่น่าสนใจคือ เมื่อเลี้ยงไปนานถึง 5 วัน สายพันธุ์ NRRL จะเริ่มให้ผลผลิตดีกว่าที่ 25°C NRRL เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับจากสหรัฐอเมริกา ดังนั้นจึงอาจมีการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาวะของเมืองหนาวมากกว่า TISTR

การทดสอบหาสภาวะอาหารที่เหมาะสม เลือกทดสอบ carbon sources 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคสกับน้ำตาลซูโครส เนื่องจากว่ากลูโคสเป็นน้ำตาลมาตรฐานที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ทั่วไป แต่ซูโครสนั้นคือน้ำตาลทราย ดังนั้นข้อมูลที่ได้จึงสามารถใช้เป็นแนวทางการใช้น้ำตาลทรายซึ่งเป็นวัตถุดิบราคาถูกมาใช้ในการผลิตเพื่ออุตสาหกรรมได้ ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลผลิตจากน้ำตาลซูโครสได้เหนือกว่าน้ำตาลกลูโคส การที่ *A. pullulans* สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้อย่างดีนั้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อราชนิดนี้มีเอนไซม์ invertase มีประสิทธิภาพดีที่เปลี่ยน invert sugar ได้ (Catly, 1971)

ในการทดสอบชนิดของแหล่งไนโตรเจน เลือกทดสอบ 2 ชนิด คือ $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งเป็น inorganic nitrogen และ peptone ซึ่งเป็น organic nitrogen ได้ผลชัดเจนว่า ทั้งสองสายพันธุ์ชอบ $(NH_4)_2SO_4$ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าสามารถนำ $(NH_4)_2SO_4$ ไปใช้ได้ง่ายกว่า peptone ซึ่งมีความซับซ้อนในองค์ประกอบ

การทดสอบเพื่อหาสภาวะการมีปริมาณอากาศที่เหมาะสม มีการวางแผนการทดลองโดยใช้ปริมาตรของอาหารเหลวเป็นตัวกำหนด Erlenmeyer flask ที่ใช้มีขนาดมาตรฐาน 250

ml ดังนั้น flask ที่บรรจุอาหารเหลว 50 ml ก็จะมีเนื้อที่ว่างให้อากาศถ่ายเทได้มากกว่า flask ที่บรรจุอาหารเหลว 100 ml และ 150 ml ตามลำดับ การปรับปริมาตรอาหารเหลวเพื่อให้ได้ปริมาณ Oxygen ในระดับต่างๆ เป็นวิธีการทดสอบนี้เป็นที่ยอมรับและใช้กันในเชื้อราอื่นๆ อาทิเช่น *Pachysolen tannophilus* (Schneider, 1983) ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าความต้องการอากาศในระดับปานกลางคือปริมาตรอาหารเหลว 100 ml โดยทั่วไปจะเหมาะสมกับทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ TISTR ในระยะช่วง 4 วันแรกจะต้องการสภาวะการมีอากาศเป็นแบบ aerobic มากกว่า คือ ชอบที่ปริมาตร 50 ml

งานวิจัยนี้ใช้ระบบการหาสภาวะที่เหมาะสมแล้วนำข้อมูลที่ได้มาทดสอบหาสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อเป็นลำดับ ดังนั้นจึงได้วางแผนการทดลองให้มีการทดสอบการมี nutrient supplement เป็นอันดับหลัง ซึ่งก็พบว่า casein peptone ที่เติมไปเป็นอาหารเสริม สามารถทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นจริง โดยสายพันธุ์ NRRL ให้ผลผลิตเพิ่ม 1.15 เท่า ขณะที่สายพันธุ์ TISTR ให้ผลผลิตเพิ่ม 1.23 เท่า casein peptone เป็นอาหารเสริมที่มีแร่ธาตุและสารอาหารประเภท amino acid จากนมที่ถูกย่อยสกัดแล้ว จึงอาจทำให้เชื้อรานำไปใช้เสริมกระบวนการ metabolism ในการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ได้

นอกเหนือจากการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์แล้วความสำคัญของงานวิจัยนี้คงอยู่ที่ตรงการพิสูจน์ว่าสารที่มีลักษณะคล้ายพลาสติคนั้น เป็นพูลูแลนพอลิเมอร์จริง การใช้ IR-spectrum เปรียบเทียบกับพูลูแลนพอลิเมอร์มาตรฐานทำให้เห็น IR-curves อย่างชัดเจนว่าเป็นพูลูแลนพอลิเมอร์ที่มีองค์ประกอบด้วยหมู่ functional groups สอดคล้องกับโครงสร้างของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่มีผู้พบว่าเป็น maltotriose polymer (Pollock, 1992) การใช้ IR spectrophotometry มาทดสอบพูลูแลนพอลิเมอร์เป็นแนวความคิดใหม่ที่งานวิจัยชิ้นนี้ได้พบซึ่งเป็นแนวทางสำคัญในการช่วยวิเคราะห์เชิงคุณภาพของพูลูแลนพอลิเมอร์ได้เป็นอย่างดี

การทดสอบคุณสมบัติบางประการของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ ทำโดยการเลือกทดสอบคุณสมบัติการถูกละลายและการย่อยสลาย เนื่องจากเป็นคุณสมบัติสำคัญของการนำไปใช้ประโยชน์ในสภาพของ biodegradable plastic ตัวทำละลายที่ทดสอบมีน้ำซึ่งมีทั่วไปในสิ่งแวดล้อม เอทธานอลซึ่งเป็น organic solvent และน้ำมันพืชซึ่งใช้กันทั่วไปในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ละลายได้ดีในน้ำ ไม่ละลายในเอทธานอลและน้ำมันพืช จึงเป็นข้อมูลบ่งชี้ถึงการสลายตัวได้ดีในธรรมชาติและการนำไปใช้เป็นวัสดุห่อหุ้มอาหารประเภทไขมันได้ (Pollock, 1992) การทดสอบการย่อยสลายในธรรมชาติบนผิวดินแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าวัสดุนี้เป็น biodegradable คือมีเชื้อราอื่นมาขึ้นและย่อยสลายไป ไม่เป็นปัญหาตกค้างในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ ต่างกับพลาสติคทั่วไป

ข้อสรุปและเสนอแนะ

สภาวะเหมาะสมต่อการผลิตพูลูแลนพอลิเมอร์ของ *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์ คือที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 30°C, แหล่งคาร์บอน sucrose แหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ในสภาวะ aerobic โดยสายพันธุ์ TISTR ชอบสภาวะ aerobic มากกว่าสายพันธุ์ NRRL และถ้ามีอาหารเสริม casein peptone ก็จะช่วยให้ได้ผลผลิตดีขึ้น โดยทั่วไปผลผลิตจากสายพันธุ์ TISTR จะได้สูงกว่าสายพันธุ์ NRRL เมื่อดูลักษณะพบว่า *A. pullulans* NRRL ให้พูลูแลนพอลิเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายพลาสติคสีขาว ส่วนสายพันธุ์ TISTR ให้พูลูแลนพอลิเมอร์ที่มีลักษณะคล้ายพลาสติก มีสีเขียวของ melanin ปนเล็กน้อย เมื่อวิเคราะห์จาก IR spectrum พบว่าสารที่มีลักษณะคล้ายพลาสติกที่ผลิตได้เป็นพูลูแลนพอลิเมอร์จริง มี IR curves ลักษณะเดียวกับสารพูลูแลนมาตรฐาน สารที่ผลิตได้ดี มีคุณสมบัติละลายน้ำ ไม่ละลายในเอทธานอลและน้ำมันพืช สามารถถูกย่อยสลายได้โดยกระบวนการทางชีวภาพ เมื่อวางทิ้งไว้บนผิวดินในธรรมชาติ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความสำเร็จอย่างดีในแง่ของการผลิตและการทราบสภาวะที่เหมาะสมอันจะเป็นแนวทางสำคัญต่อการผลิตทางการค้าและอุตสาหกรรม นอกจากนั้นยังได้รับความสำเร็จทางด้านความร่วมมือจากในประเทศและต่างประเทศด้านเชื้อรา สายพันธุ์ NRRL ที่ได้มีคุณสมบัติดีให้สารพอลิเมอร์ที่มีสีขาว ขณะเดียวกันก็ได้พบว่าสายพันธุ์ TISTR ของไทย ก็ให้ผลผลิตสูงเป็นที่น่าสนใจ ข้อเสนอแนะคือควรที่จะมีการวิจัยต่อในด้านของการขยายขนาดการผลิต (scale up) เพื่อให้เหมาะสมต่อการเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังควรวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณสมบัติทางกายภาพในเชิงวัสดุศาสตร์ของพอลิเมอร์ การ process เช่นการทำแผ่น การขึ้นรูปของพลาสติก เป็นต้น ในทางชีวภาพก็สามารถทำการปรับปรุงสายพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีผลผลิตดีขึ้นหรือหลายหลากมากขึ้นในเชิงคุณสมบัติและลักษณะของเม็ดสีอันจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อไป

บรรณานุกรม

Catley, B. J. 1971.Utilization of carbon sources by *Pullularia pullulans* for the elaboration of extracellular polysaccharides. **Applied Microbiology** 22(4): 641-649

Emerging technology series. 1996. New, advanced and improved traditional materials and processes. United Nations Industrial Development Organization, Austria

Lacroixt, C., LeDuy, A., Noel, G., and Choplin, L. 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. **Biotechnology and Bioengineering** 27: 202-207

Leathers, T. D., Nofsingerm, G.W., Kurtzman, C. P., and Bothast, R. J. 1988. Pullulan production by color variant strains of *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters** 15(11): 1167-1172

Pollock, T.J. 1992. Pullulan from polymorphic *Aureobasidium pullulans*. **Society for Industrial Microbiology News** 42(4): 147-155

Schneider, J. 1983. The production of ethanol from D-xylose by yeasts. **Proceedings: International Symposium on ethanol from biomass**, Winnipeg, Canada

Schuster, R., Wenzig, E., and Mersmann, A. 1993. Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 39: 155-158

Simon, L., Vaugien, C. C., and Bouchnneau, M. 1993 Relation between pullulan production, morphology state and growth condition in *Aureobasidium pullulans*: new observations. **Journal of General Microbiology** 139: 979-985

Strohfus, B. and West, T.P. 1998. Column bioreactor production of the fungal polysaccharide pullulan using immobilized cells. Program and abstracts. Society for Industrial Microbiology, Denver, USA.

The Amylase Research Society of Japan (ed). 1998. **Handbook of amylases and related enzymes**, pp. 221-224. Great Britain: Pergamon Press.

West, T.P. and Reed-Hamer, B. 1993. Polysaccharide production by a reduced pigmentaton mutant of the fungus *Aureobasidium pullulans*. **FEMS Microbiology Letters** 113: 345-350

ภาคผนวก

ค่า IR spectrum ของพูลูแลนพอลิเมอร์มาตรฐาน (sigma, USA)

standard

STD-DIOP.SP 3551 4000.0 450.0 36.59 78.90 %T 20 5

REF: 4000 71.75 2080 76.55

3946.0	72.91	3931.0	72.98	3900.0	72.65	3886.0	73.14
3864.0	71.42	3846.0	72.17	3812.0	72.13	3791.0	71.71
3753.0	68.26	3736.0	69.96	3713.0	69.00	3701.0	69.06
3671.0	66.01	3608.0	55.43	3501.0	40.31	3473.0	37.65
3453.0	37.99	3435.0	36.59	3286.0	49.29	3216.0	51.87
3188.0	55.03	3170.0	55.03	3080.0	62.80	2980.0	64.93
2954.0	61.88	2919.0	58.12	2856.0	63.72	2819.0	66.88
2791.0	69.40	2761.0	69.75	2713.0	70.24	2685.0	71.59
2638.0	73.30	2574.0	74.61	2538.0	75.39	2493.0	75.58
2350.0	77.74	2320.0	77.72	2047.0	75.45	1636.0	68.65
1369.0	59.91	1283.0	62.77	1268.0	61.38	1241.0	61.22
1157.0	53.52	1077.0	51.71	1047.0	49.09	1017.0	46.70
920.0	68.64	862.0	65.97	821.0	68.71	794.0	66.14
774.0	64.85	743.0	64.32	724.0	62.62	705.0	68.93
688.0	68.31	672.0	58.38	645.0	59.46	629.0	58.51
618.0	58.32	589.0	53.31	573.0	52.78	554.0	55.81
539.0	54.09	519.0	56.36	493.0	59.73	471.0	51.65
455.0	57.47						

221 ALKYL GROUP - POSSIBLY METHOXY OR HYDROXYMETHYL SUBSTITUENT
223 ALKYL GROUP - HYDROXY OR POSSIBLY AMINO SUBSTITUENT
401 HYDROXY COMPOUND - NON-BONDED HYDROXYL GROUP

PSUs above may be subject to interference. Consult Manual.

ค่า IR spectrum ของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL

```
POLWHITE.SP  3551  4000.0  450.0  10.06  52.26  %T  10  S

REF:  4000 41.17   2000  51.07
  3919.0   41.50    3085.0   41.05    3855.0   39.41    3037.0   39.87
  3016.0   41.96    3734.0   37.60    3431.0   10.06    3325.0   13.24
  3256.0   15.50    2935.0   26.12    2740.0   37.02    2707.0   30.91
  2281.0   51.60    2063.0   49.37    1923.0   50.61    1869.0   50.46
  1736.0   39.51    1634.0   29.51    1541.0   38.25    1420.0   28.68
  1366.0   28.81    1276.0   31.95    1154.0   28.93    1084.0   19.47
  1014.0   13.49     927.0   30.71     853.0   35.89     759.0   38.03
   699.0   27.54     675.0   25.67     573.0   10.00     530.0   19.63
   516.0   18.49     466.0   18.16
END  34 PEAK(S) FOUND


  201 ALKYL GROUP - GENERAL
  223 ALKYL GROUP - HYDROXY OR POSSIBLY AMINO SUBSTITUENT
  251 ALKYNE SUBSTITUENT OR TERMINAL ACETYLENE
  511 ALIPHATIC ALCOHOL - PRIMARY OR SECONDARY OR POSSIBLY CYCLIC HYDROXY

PSUs above may be subject to interference. Consult Manual.
```

ค่า IR spectrum ของพูลูแลนพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* TISTR

ผลิตรีเฟอา

POLGREEN.SP 3551 4000.0 450.0 1.26 55.47 %T 10 S

REF: 4000 42.27 2000 53.45

3982.0	41.79	3950.0	42.54	3908.0	41.25	3869.0	40.87
3854.0	39.56	3836.0	38.99	3790.0	39.19	3778.0	38.90
3763.0	37.49	3735.0	34.84	3715.0	35.36	3692.0	32.94
3543.0	7.71	3526.0	7.15	3470.0	4.83	3453.0	3.48
3407.0	2.34	3379.0	3.34	3315.0	5.24	3266.0	5.65
3185.0	10.73	3124.0	16.33	3076.0	23.03	3025.0	27.33
2972.0	19.93	2925.0	15.16	2901.0	16.61	2741.0	37.14
2569.0	47.25	2536.0	40.43	2447.0	50.07	2415.0	52.03
2359.0	51.80	2320.0	53.86	2155.0	52.15	2053.0	51.98
1920.0	51.71	1733.0	41.01	1629.0	28.76	1457.0	16.15
1411.0	15.37	1370.0	15.42	1295.0	18.65	1241.0	18.06
1161.0	4.96	1112.0	6.59	1034.0	1.26	931.0	17.27
755.0	24.04	697.0	20.23	674.0	19.30	644.0	17.02
577.0	8.96	544.0	12.90	524.0	11.91	483.0	11.77
465.0	16.81						

END 57 PEAK(S) FOUND

201 ALKYL GROUP - GENERAL
223 ALKYL GROUP - HYDROXY OR POSSIBLY AMINO SUBSTITUENT
402 HYDROXY OR AMINO COMPOUND - GENERAL
511 ALIPHATIC ALCOHOL - PRIMARY OR SECONDARY OR POSSIBLY CYCLIC HYDROXY

PSUs above may be subject to interference. Consult Manual.