ผลของภาวะการผลิตที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนที่ผลิตจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

นางสาวปริศนา มังสา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
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 Graduate School.

EFFECTS OF PRODUCTION CONDITIONS ON MOLECULAR WEIGHT OF PULLULAN PRODUCED FROM A TROPICAL ISOLATE OF *Aureobasidium pullulans*

Miss Prissana Mangsa

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของภาวะการผลิตที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนที่ผลิตจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน
โดย	นางสาวปริศนา มังสา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. กฤษณา ศิรเลิศมุกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. กฤษณา ศิรเลิศมุกุล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ สุขใจ ชูจันทร์)

ปริศนา มังสา : ผลของภาวะการผลิตที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนที่ผลิตจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน (EFFECTS OF PRODUCTION CONDITIONS ON MOLECULAR WEIGHT OF PULLULAN PRODUCED FROM A TROPICAL ISOLATE OF *Aureobasidium pullulans*) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ หลัก: ผศ.ดร. สีหนาท ประสงค์สุข, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, อ.ดร. กฤษณา ศิรเลิศมุกุล, 86 หน้า.

พูลลูแลน (pullulan) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ และมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายด้าน เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้สามารถผลิตได้จากยีสต์ *Aureobasidium pullulans* การศึกษานี้ มุ่ง เน้น ค้นคว้าวิจัยเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณผลผลิตพูลลูแลน ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน และศึกษาผลการเติมอาหารเสริมที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนที่เหมาะสมต่อการนำไปขึ้นรูปฟิล์ม โดยศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และอาหารเสริม (ชนิดและความเข้มข้น)โดยใช้ *A. pullulans* จำนวน 5 สายพันธุ์ที่ ผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณสูง คือสายพันธุ์ NRRL 58530 (CU17) NRRL 58533 (CU20) NRRL 58537 (CU24) NRRL 58555 (CU44) และ NRRL 58556 (CU45) พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ให้ผลผลิตพูลลูแลนสูงสุดที่ 42.08±0.19 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่ 234:1 ค่าความเป็นกรดด่าง เริ่มต้นที่ 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง และอาหารเสริมที่เหมาะสมคือน้ำมันมะกอกที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น นำพูลลูแลนมา วิเคราะห์สมบัติ ได้แก่ โครงสร้าง ความหนืด น้ำหนักโมเลกุล ความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส พบว่าโครงสร้างไม่แตกต่างจากโครงสร้างของพูลลูแลนซิก ม่าและไม่มีการปนเปื้อน ของสารอื่นๆ เมื่อเติมแหล่งอาหารเสริม ความหนืดและน้ำหนักโมเลกุ ลมีแนวโน้ม ลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นจาก วันที่ 1 ถึงวันที่ 9 และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีระดับต่ำ เมื่อทดสอบสมบัติของพูลลูแลนฟิล์ม พบว่าฟิล์มที่ผลิตจาก พูลลู แลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า ให้ค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงสูงกว่าฟิล์มที่ผลิตจากพูลลูแลนที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ .....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2554.....ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5272706923: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: *Aureobasidium pullulans* / pullulan

PRISSANA MANGSA : EFFECTS OF PRODUCTION CONDITIONS ON MOLECULAR WEIGHT OF PULLULAN PRODUCED FROM A TROPICAL ISOLATE OF *Aureobasidium pullulans*. ADVISOR: ASST. PROF. SEHANAT PRASONGSUK, Ph.D.,CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D., KRISANA SIRALEARTMUKUL, Ph.D., 86 pp.

Pullulan is an exopolysaccharide that could be naturally decomposed which is useful in many industries and can be produced by a yeast *Aureobasidium pullulans*. In this study aims to determine the optimum conditions for enhancement of pullulan yield produced from tropical *A. pullulans* strains and investigate the effects of supplement on molecular weight of pullulan suitable for forming the film by varying carbon and nitrogen sources, carbon/nitrogen (C/N ratio), pH, temperature and nutrient supplements (type and concentration) using high-yielding 5 strains of *A. pullulans* including NRRL 58530 (CU17) NRRL 58533 (CU20) NRRL 58537 (CU24) NRRL 58555 (CU44) and NRRL 58556 (CU45). It was found that strain CU44 gave the highest pullulan at 42.08±0.19 g/l under the condition of sucrose as a carbon source, peptone as a nitrogen source, carbon/nitrogen at 234:1, initial pH 6.5, at room temperature, and 5% (v/v) of olive oil as a nutrient supplement in the culture shaken at 150 rpm for 7 days. Structure of pullulan, viscosity, molecular weight and enzyme sensitivity were then analyzed and amylase activity in the culture supernatant was also quantified. The structure of pullulan was not different and was not contaminated when adding the nutrient supplement. The viscosity and molecular weight trended to decrease over time from day 1 to 9 while amylase activity was very low. The test of properties of pullulan film showed that the film made from higher molecular - weight pullulan had higher tensile strength than those made from lower - molecular weight pullulan.

Field of Study : ….Biotechnology……Student's Signature.....

Academic Year : ...2011……Advisor's Signature.....

Co-Advisor's Signature.....

Co-Advisor's Signature.....

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ…… จ

กิตติกรรมประกาศ…… ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง…… ญ

สารบัญภาพ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ…… 1

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…… 4

3 วิธีดำเนินการวิจัย…… 18

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย…… 18

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย…… 19

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย…… 20

วิธีดำเนินงานวิจัย…… 20

1. ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณสูง…… 20

2. ศึกษาการเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน..... 21

3. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน…… 21

4. วิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน 22

5. ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน…… 24

4 ผลการทดลอง…… 26

1. ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณสูง…… 26

2. ศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน..... 30

บทที่ หน้า

3. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน 33
3.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม..... 33
3.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม..... 33
3.3 ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน..... 35
3.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม 37
3.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม 41
3.6 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมชนิดต่างๆที่เหมาะสม 42
4. วิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน..... 43
4.1 วิเคราะห์โครงสร้างของพูลลูแลน..... 47
4.2 วิเคราะห์ความหนืดของพูลลูแลน..... 47
4.3 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน..... 53
4.4 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ..... 54
4.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส..... 55
5. ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44... 56
5.1 ทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มที่ผลิต..... 56
5.2 ทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มที่ผลิต..... 57
5.3 ศึกษาลักษณะพื้นผิวของพูลลูแลนโดยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด..... 60
5 การอภิปรายผลการวิจัย..... 61
3.7 ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณสูง..... 61
3.8 ศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน..... 61
3.9 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน..... 61
3.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม..... 61
3.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม..... 62
3.3 ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน..... 63

บทที่ หน้า

3.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม 63
3.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม 64
3.6 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมชนิดต่างๆที่เหมาะสม 64
4. วิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน..... 65
4.1 วิเคราะห์โครงสร้างของพูลลูแลน..... 65
4.2 วิเคราะห์ความหนืดของพูลลูแลน..... 65
4.3 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน..... 65
4.4 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ..... 66
4.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส..... 66
5. ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44... 67
5.1 ทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มที่ผลิต..... 67
5.2 ทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มที่ผลิต..... 68
5.3 ศึกษาลักษณะพื้นผิวของพูลลูแลนโดยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด..... 68
6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 69
1 ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณสูง..... 69
2 ศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน..... 69
3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน..... 69
3.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม..... 69
3.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม..... 69
3.3 ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน..... 69
3.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม 69
3.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม 69
3.6 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมชนิดต่างๆที่เหมาะสม..... 69

บทที่ หน้า

4. วิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน..... 69
4.1 วิเคราะห์โครงสร้างของพูลลูแลน..... 69
4.2 วิเคราะห์ความหนืดของพูลลูแลน..... 70
4.3 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน..... 70
4.4 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ..... 70
4.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส..... 70
5. ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44... 71
5.1 ทดสอบสมบัติทางการภาพของของฟิล์มพูลลูแลน..... 71
5.2 ทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มที่ผลิต..... 71
5.3 ศึกษาลักษณะพื้นผิวของพูลลูแลนโดยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์.
อิเล็คตรอนแบบส่องกราด..... 71
5.4 ข้อเสนอแนะ..... 71
รายการอ้างอิง..... 72
ภาคผนวก..... 78
ภาคผนวก ก..... 79
ภาคผนวก ข..... 81
ภาคผนวก ค..... 84
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 86

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แหล่งคาร์บอนและสายพันธุ์ *A. pullulans* ที่มีความสัมพันธ์ต่อปริมาณพูลลูแลน……..	9
2	อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ pullulanase α-amylase glucoamylase และ cellulose……	23
3	ผลของน้ำหนักพูลลูแลน(กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU17 CU20 CU24 CU44 และCU45……	27
4	ผลของจำนวนเซลล์ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU20 และ CU44 ในอาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน……..	32
5	ผลของน้ำหนักพูลลูแลน และน้ำหนักเซลล์ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอนคือ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส โดยใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน……	34
6	ผลของน้ำหนักพูลลูแลน และน้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหาร สูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอนคือ ซูโครส โดยใช้เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟตโพแทสเซียมไนเตรทและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน……..	36
7	ผลของน้ำหนักพูลลูแลน และน้ำหนักเซลล์ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหารสูตร PM ที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ระดับ 526:1, 410:1, 351:1, 293:1, 234:1, 162:1, 176:1, 117:1 และ 59:1……	39
8	ผลของน้ำหนักพูลลูแลน และน้ำหนักเซลล์ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหารสูตร PM ที่ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH 6.0 6.5 และ 7.0…….....	41
9	ผลของน้ำหนักพูลลูแลน และน้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้อุณหภูมิห้อง 25 และ 35 องศาเซลเซียส……..	42
10	ผลของน้ำหนักพูลลูแลน และน้ำหนักเซลล์ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เมื่อเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว และน้ำกะทิ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตร โดยปริมาตร)……..	44
11	ผลของน้ำหนักพูลลูแลน และน้ำหนักเซลล์ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เมื่อเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3และ7 (ปริมาตรโดยปริมาตร)……..	46

ตารางที่		หน้า
12	ตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก FTIR สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของพูลลูแลน….	47
13	ตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก ^{1}H –NMR สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของพูลลูแลน……	50
14	ความหนืดของสารละลายพูลลูแลนที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ได้จากสูตร ซูโครส/ เปปโตน และ สูตร ซูโครส/ เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม.....	52
15	ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน……	54
16	ความไวต่อเอนไซม์ α-amylase pullulanase glucoamylase และ cellulose……	55
17	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส……	55
18	แสดงสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม……	56

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 โครงสร้างของพูลลูแลน..... 1

2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans*..... 6

3 กลไกการสังเคราะห์พูลลูแลนของเชื้อ *A. pullulans*..... 8

4 ผลของน้ำหนักพูลลูแลน ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU17 CU20 CU24 CU44 และCU45..... 29

5 แสดงการเจริญของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU20..... 30

6 แสดงการเจริญของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44..... 30

7 ผลของน้ำหนักพูลลูแลน(กรัมต่อลิตรของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอนคือ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส โดยใช้เปป โตนเป็นแหล่งไนโตรเจน..... 34

8 ผลของน้ำหนักพูลลูแลน ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอนคือ ซูโครส โดยใช้เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟตโพแทสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน..... 37

9 ผลของน้ำหนักพูลลูแลน ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เมื่อเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว และน้ำกะทิ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร)..... 45

10 FT-IR spectrum ของพูลลูแลน sigma..... 48

11 FT-IR spectrum ของสารสกัดจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44..... 48

12 FT-IR spectrum ของฟิล์มของ*สารสกัดจาก A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 (วันที่ 7 อาหารสูตรซูโครส/เปปโตน)..... 48

13 FT-IR spectrum ของฟิล์มของสารสกัดจา*ก A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 (วันที่ 8 อาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน)..... 49

14 FT-IR spectrum ของฟิล์มพูลลูแลนผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 (วันที่ 7 อาหารสูตรซูโครส/เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอก)..... 49

15 H^1-NMR spectrum ของสารพูลลูแลนมาตรฐาน(sigma)..... 50

16 H^1-NMR spectrum ของ สารสกัด จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 (อาหารสูตรซูโครส/ เปปโตน)..... 51

ภาพที่ หน้า

17 H^1-NMR spectrum ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 (อาหารสูตร ซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอก)…… 51
18 เปอร์เซ็นต์การยืดตัว..... 57
19 การทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มพูลลูแลน…… 57
20 ลักษณะพื้นผิวของพูลลูแลนฟิล์มและพูลลูแลนโดยภาพถ่ายแบบส่องกราด..... 60
21 ปริมาณกลูโคสมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 20 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... 82
22 ปริมาณกลูโคสมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 200 – 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร..... 83

บทที่ 1

บทนำ

พูลลูแลน (pullulan) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายโมเลกุลหรือพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีโครงสร้างเป็นสายตรง (linear) ของน้ำตาลกลูโคส โดยหน่วยของพูลลูแลนคือ น้ำตาลมอลโตไตรโอส (maltotriose) หรือน้ำตาลกลูโคส 3 โมเลกุล ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ แอลฟา -1,4 (α-1,4 linkages) และระหว่างน้ำตาลมอลโตไตรโอส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6- ไกลโคซิดิก (α-1,6-glycosidic linkages) พูลลูแลนผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์ *Aureobasidium pullulans* (Leather, 2003) ซึ่งมีชื่อสามัญว่า "ยีสต์ดำ" หรือ "black yeast" เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดสีดำของ เมลานินออกมาได้ ทำให้เห็นโคโลนีมีสีดำ เมลานินนี้เป็นปัญหาต่อการผลิตพูลลูแลนในระดับอุตสาหกรรมโดยจะปนเปื้อนในระหว่ างการผลิตทำให้ต้องทำการกำจัดออก ซึ่งส่งผลให้ค่าใช้จ่ายเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามในประเทศเขตร้อน เช่น ประเทศไทย มีการค้นพบ *A. pullulans* ชนิดที่มีสีแตกต่างกันไปเรียกว่า "color variant" คือเป็น *A. pullulans* ที่มีการผลิตเม็ดสีสีอื่นที่ไม่ใช่สีดำ ทำให้โคโลนีไม่เป็นสีดำ (Prasongsuk และคณะ, 2005) และเมื่อนำ *A. pullulans* ที่คัดแยกได้มาผลิตพอลิเม อร์ ก็พบว่าพอลิเมอร์ที่ได้เป็นพูลลูแลน มีผลผลิตค่อนข้างสูง และมีการปนเปื้อนของเมลานินต่ำ (Prasongsuk และคณะ, 2007) การค้นพบนี้อาจนำไปสู่การลดขั้นตอนในการกำจัดเมลานิน ทำให้มีส่วนช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ แม้ว่าพูลลูแลนจะมีรา คาสูงกว่าพลาสติกทั่วไปแต่มีข้อดีคือ สามารถที่จะรับประทานได้และย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ พูลลูแลนที่จำหน่ายทางการค้าจะมีลักษณะเป็นผงสีขาว สามารถละลายน้ำได้อย่างรวดเร็วทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น ไม่มีความเป็นพิษไม่มีสีไม่มีกลิ่นและรส (Yuen,1974) พูลลูแลนมีคุณสม บัติพิเศษคือ ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อราแต่ไม่สามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์อะไมเลสในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้ วยนม ดังนั้นพูลลูแลนจึงจัดเป็นพอลิเมอร์ที่ให้พลังงานต่ำมาก และสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสำหรับคนที่ต้องการลดน้ำหนัก สำหรับการศึกษาล่าสุดยังพบว่าพูลลูแลนที่ใช้เป็นอาหารนั้นสามารถทำหน้าที่

เป็นพรีไบโอติก (prebiotics) คือสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มไบฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria) (Leather, 2003) เมื่อละลายผงพูลลูแลนในรูปของสารละลายจะได้สารละลายที่ความหนืดและความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นพูลลูแลนจึงสามารถใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารได้ เช่น เครื่องดื่มชนิดต่างๆ และอาหารจำพวกไส้กรอก เป็นต้น ยังมีรายงานกล่าวถึงการใช้พูลลูแลนเป็นสารเติมแต่งในเครื่องสำอาง โลชั่น และแชมพู นอก จากนี้พูลลูแลนยังมีคุณสมบัติในการเชื่อมยึด (adhesive property) ได้ดี จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์โดยใช้เป็นส่วนผสมในสารที่ใช้รักษาบาดแผล (wound healing) และใช้ในการ ยึดฟันปลอม (denture adhesive) ตลอดจนสามารถใช้เป็นสารเชื่อมและสารคงความเสถียรในอาหารบางชนิด เช่น ใช้ยึดส่วนผสมในขนมคุกกี้ เป็นต้น (Leather, 2003) โมเลกุลของพูลลูแลนอาจมีทั้งสายสั้นและสายยาว โดยน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 50,000 – 3,000,000 ดาลตัน ซึ่งปัญหาอีกอย่างหนึ่งที่พบในการผลิตพูลลูแลนคือ เอนไซม์ที่เชื้อชนิดนี้สร้างขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์อะไมเลส (amylase) มีรายงานว่าเชื้อ *A. pullulans* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในช่วงที่มีการผลิตพูลลูแลน ซึ่งจะเป็นปัญหาต่อคุณภาพของพูลลูแลนที่ผลิตได้ เนื่องจากโครงสร้างของพูลลูแลนนั้นมีลักษณะคล้ายโครงสร้างอะไมโลส (amylose) ในแป้งเอนไซม์ชนิดนี้จึงสามารถย่อยพูลลูแลนได้ ดั้งนั้นในช่วงของการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตพูลลูแลน การย่อยสลายของเอน ไซม์อะไมเลส จะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนลดลง ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของพูลลูแลน (Leathers, 2003; Prasongsuk และคณะ, 2007)

ดังนั้นเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน ในการผลิตพูลลูแลนทางอุตสาหกรรม การศึกษานี้จึงต้องการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตและศึกษาการเติมอาหารเสริม ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนในเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน นี้ และสมบัติของพูลลูแลน ความสามารถใน การขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้ตลอดจนศึกษาสมบัติเคมี (น้ำหนักโมเลกุล) และกายภาพ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของภาวะการผลิตที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน
2. เพื่อวิเคราะห์ลักษณะสมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้

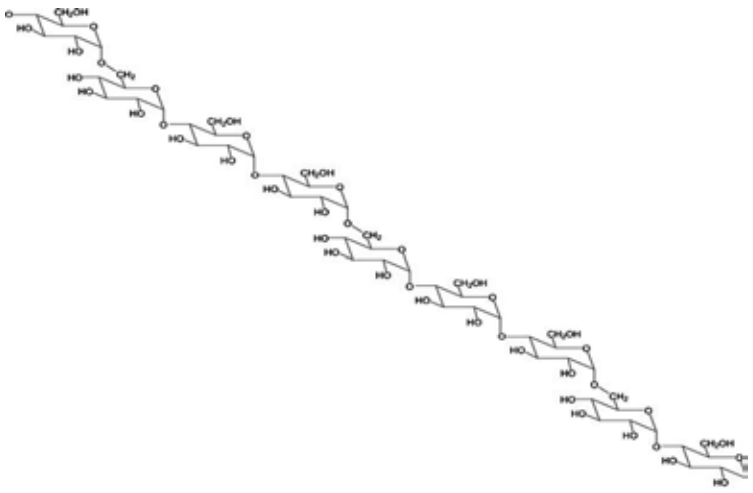
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถหาภาวะการผลิตที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พอลิเมอร์ชีวภาพพูลลูแลน

พูลลูแลน (pullulan) เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่ประกอบด้วยน้ำตาลหลายโมเลกุลหรือพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีโครงสร้างเป็นสายตรง (linear) ของน้ำตาลกลูโคส โดยหน่วยของพูลลูแลนคือ น้ำตาลมอลโตไตรโอส (maltotriose) หรือน้ำตาลกลูโคส 3 โมเลกุล ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ แอลฟา -1,4 (α-1,4 linkages) และระหว่างน้ำตาลมอลโตไตรโอสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6- ไกลโคซิดิก (α-1,6-glycosidic linkages) โมเลกุลของพูลลูแลนอาจมีทั้งสายสั้นและสายยาว ดังแสดงในภาพที่ 1 และยังมีน้ำตาลมอลโตเตตราโอส (maltotretraose) หรือน้ำตาลกลูโคส 4 โมเลกุล แทรกอยู่ในโมเลกุลของพูลลูแลนด้วย โดยมีอยู่ในปริมาณน้อยและอยู่อย่างสุ่มในโครงสร้าง (Catley and Whelan., 1966; สีหนาท ประสงค์สุข , 2552) โดยน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 50,000 – 3,000,000 ดาลตัน โดยทั่วไปพูลลูแลนจะมีลักษณะเป็นผงสีขาว สามารถละลายน้ำได้ทั้งในน้ำร้อนและน้ำเย็น สามารถรับประทานได้ ไม่มีความเป็นพิษไม่มีสีไม่มีกลิ่นและรส (Yuen, 1974)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของพูลลูแลน (Leather, 2003)

2.2 รา *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans เป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) มีชื่อสามัญว่า “ยีสต์ดำ” หรือ “Black yeast” เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ได้ในระหว่างการเจริญ ทำให้โคโลนีมีสีดำ เดิม *A. pullulans* มีการจัดจำแนกอยู่ใน Class Deuteromycetes (Fungi imperfecti) Order Moniliales Family Dermatiacae (Cooke, 1959; Ramos และ Acha, 1975) ปัจจุบันมีการจัดจำแนก *A. pullulans* ไว้ ดังนี้ (Yurlova และคณะ, 1999; De Hoog และคณะ, 1999)

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Dothideomycetes

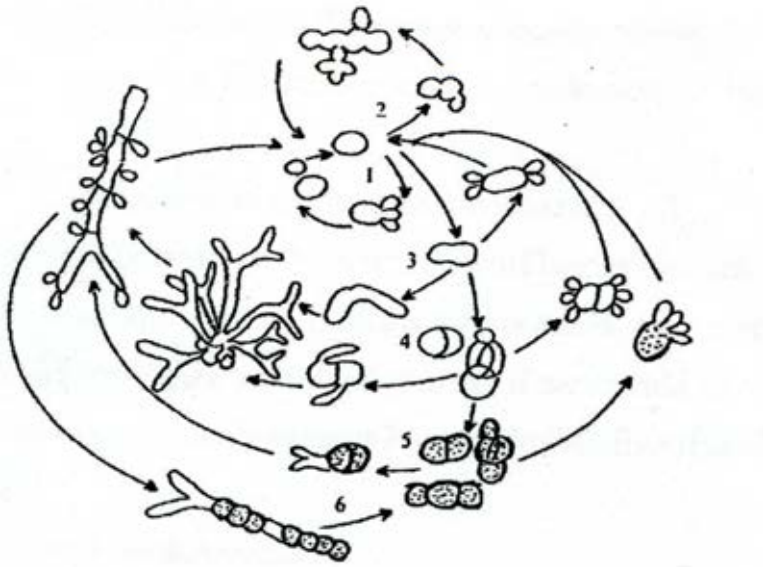
Order Dothideales

Family Dothideaceae

Genus *Aureobasidium*

Species *Aureobasidium pullulans*

A. pullulans มีชื่อเรียกหลายชื่อด้วยกัน เช่น *Pullularia pullulans*, *Dermatium pullulans*, *A. vitis*, *P. fermentans* เป็นต้น (Cooke, 1959; Ramos และ Acha, 1975; Hermanides-nijhof, 1977) *A. pullulans* มีรูปร่างได้หลายลักษณะ เช่น บลาสโตสปอร์ (blastospore) เซลล์พอง (swollen cell) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เส้นใยแท้ (hyphae) หรือ เส้นใยเทียม (pseudohyphae) เป็นต้น (Ramos และ Acha, 1975) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* 1. การสร้างบลาสโตสปอร์ใหม่โดยการแตกหน่อ 2. การสร้างบลาสโตสปอร์ใหม่โดยไม่สร้างผนังกั้น (aseptate) 3. บลาสโตสปอร์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์พอง และเริ่มสร้างเส้นใย 4. บลาสโตสปอร์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์พอง และเซลล์พองเริ่มสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น เปลี่ยนเป็น คลาไมโดสปอร์ 5. คลาไมโดสปอร์เริ่มสร้าง germ tubes และเส้นใย และ 6. เส้นใยสร้างเม็ดสีและผนังเซลล์ให้หนาขึ้น (ที่มา: Romos and Acha, 1975)

การจัดจำแนก *A. pullulans* แต่เดิมนั้น ใช้หลายวิธีประกอบกัน ทั้งทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา เช่น ลักษณะของโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Hermanides-nijhof, 1977) การใช้แหล่งอาหารต่างๆกัน (substrate utilization) การสร้างเมลานิน (Dennis และ Buhagiar, 1973) การสร้างโคนิเดีย (conidiogenesis) ภาวะการสร้างพอลิแซคคาไรด์ (De Hoog และ Yurlova, 1994) และลักษณะของเส้นใย (Takeo และ De Hoog, 1991) เป็นต้น ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ร่วมในการจัดจำแนก ซึ่งทำให้การจัดจำแนกมีความสะดวกขึ้น สามารถแยกความแตกต่างได้ในระดับชนิด (species) เทคนิคที่นิยมใช้ ได้แก่ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal DNA internal transcribed

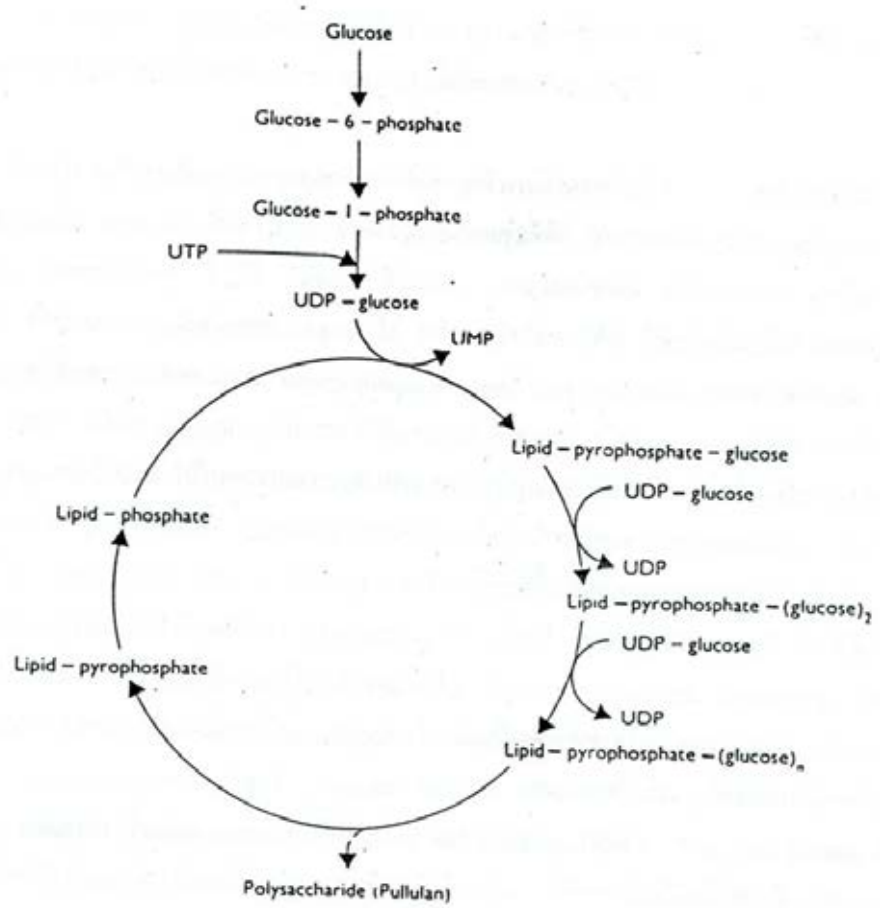
spacer (ITS) และบริเวณของยีนตำแหน่งอื่นเช่น intergenic sequence *(IGS1)*, translation elongation *(EF-1α),* beta-tubulin *(BT2),* และ RNA polymerase II gene (*RPB2*) (Manitchotpisit และคณะ, 2009); (Yurlova และคณะ, 1999; Punnapayak และคณะ, 2003)

เมื่อ *A. pullulans* เจริญเติบโตบนอาหารกึ่งแข็ง Malt Extract Agar (MEA) เป็นเวลา 7 วัน โคโลนีของ *A. pullulans* จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีเรียบและเป็นเมือก มีสีครีมหรือชมพูในระยะแรกที่เลี้ยง เมื่อเวลาผ่านไปโคโลนีอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นหรือเปลี่ยนเป็นสีอื่น เช่น สีเขียวมะกอก สีแดง เหลือง น้ำตาลอ่อน และดำ เป็นต้น มีเส้นใยสั้นๆขึ้นรอบๆโคโลนี ลักษณะของเส้นใยเรียบ โปร่งใส เห็นผนังกั้นชัดเจน ความกว้างเส้นใยประมาณ 3-12 ไมโครเมตร เมื่อเลี้ยงนานขึ้นอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้ม และมีผนังเซลล์หนาขึ้น เรียกว่าเป็น คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) มีการสร้างโคนี เดียจากภายใน (endoconidia) ด้านข้าง หรือปลายของเส้นใย (Hermanides-nijhof, 1977) ลักษณะโคนิเดียปฐมภูมิ (primary conidia) เป็นเซลล์เดี่ยว ค่อนข้างกลม โปร่งใส ผนังเรียบ มีรูปร่างหลากหลายและมีขนาดแตกต่างกัน มักสร้างโคนิเดียทุติยภูมิ (secondary conidia) ขนาดเล็ก หรือ budding cell โดยอาจสร้าง secondary conidia ขนาดเล็กหลายเซลล์โดยยังติดอยู่กับเซลล์แม่ มีรูปร่างคล้ายกับนิ้วมือ และเมื่อ secondary conidia หลุดออกไป ในบางเซลล์อาจปรากฏแผลจากการหลุดออกของโคนิเดีย (bud scar) (Hermanides-nijhof, 1977; Domsch และคณะ, 1993)

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา *A. pullulans* เป็นราที่มีแหล่งที่อยู่หลากหลายในธรรมชาติ สามารถพบได้ทั่วไป บนผิวใบพืชและผลไม้ ดิน (Ramos และ Acha, 1975) เศษฟางหญ้าแห้ง (Cooke, 1959) หรือในสถานที่ที่มีความชื้นสูง เช่น ผนังห้องน้ำ (Prasongsuk และคณะ , 2005) หรือแม้แต่ในฟองน้ำทะเล (Shigemori และคณะ, 1998) *A. pullulans* ยังสามารถพบได้ทั้งในแถบประเทศเขตร้อน เช่น บราซิล อินเดีย มาเลเซีย และจาไมกา ในประเทศไทย พบว่าสามารถคัดแยก *A. pullulans* ได้จากเขตกรุงเทพมหานคร และป่าสนเขาในประเทศไทย (Punnapayak และคณะ , 2003) แถบประเทศเขตอบอุ่น เช่น เยอรมนี แคนาดา เดนมาร์ก เนเธอร์แลนด์ ออสเตรีย อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา หรือในเขตแห้งแล้ง เช่น อียิปต์ อิรัก ปากีสถาน และ อัฟริกาใต้ (Deshpande, Rale และ Lynch, 1992)

2.3 กลไกการสังเคราะห์พูลลูแลน

กลไกการสังเคราะห์พูลลู แลนในระดับเซลล์ของ *A. pullulans* เกิดจาก UDP-glucose เป็นตัวชักนำให้เกิดปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) จนได้พูลลูแลน จากนั้นจะส่งพูลลูแลน ผ่านผนังเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ การเคลื่อนย้าย UDP-glucose สู่โมเลกุลพาหะ (carrier molecule) จะอยู่ในรูปไฮโดรโฟบิคโมเลกุล (hydrophobic molecule) ซึ่งทำให้ง่ายต่อการเคลื่อนย้ายพูลลูแลนออกสู่ผนังเซลล์ (Berry, 1988) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 กลไกการสังเคราะห์พูลลูแลนของ *A. pullulans* (Berry, 1988)

2.4 แหล่งอาหารและภาวการณ์ผลิตพูลลูแลน

ในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* นั้นแหล่งอาหาร และปัจจัยของภา วะทางกายภาพมีความสำคัญต่อคุณภาพ และปริมาณของพู ลลูแลนที่สังเคราะห์ขึ้น (Reeslev และ Jorgensen 1993 ; และคณะ, 1993; Simon, Vaugien และ Bouchonneau, 1993) โดยมีข้อมู ลที่ได้ทำการศึกษาไว้ดังนี้

2.4.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อก ารเจริญเติบโตและการสังเคราะห์พู ลลูแลนของ *A. pullulans* โดยทั่วไป *A. pullulans* สามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิดในการเจริญเติบโตทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Catlay, 1971) เช่น น้ำตาลไซโลส (xylose) แรมโนส (rhamnose) กาแลคโตส (galactose) กลูโคส (glucose) ฟรุคโตส (fructose) ซูโคส (sucrose) มอลโตส (maltose) เซลโลไบโอส (cellobiose) แลคโตส (lactose) แต่ที่นิยมใช้สำหรับผลิตพูลลูแลนคือ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ไซโลส มอลโตส และซูโคส จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนแ ละสายพันธุ์ *A. pullulans* ที่มีความสัมพันธ์ต่อปริมาณพูลลูแลน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แหล่งคาร์บอนและสายพันธุ์ *A. pullulans* ที่มีความสัมพันธ์ต่อปริมาณพูลลูแลน

สายพันธุ์ *A. pullulans*	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณพูลลูแลน	เอกสารอ้างอิง
P. pullulans QM 3092	ซูโครส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)	14.8 กรัมต่อลิตร	Catley (1971)
A. pullulans Y-12, 996	แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)	10.2 กรัมต่อลิตร	Leathers และคณะ (1988)
A. pullulans NRRL Y-12,974	Corn fiber ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร) Corn condensed	0.9 กรัมต่อลิตร	Leathers และ Gupta (1994)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สายพันธุ์ *A. pullulans*	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณพูลลูแลน	เอกสารอ้างอิง
A. pullulans *NRRL Y-12,974*	distilled' s solubled ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักแห้งต่อปริมาตร	4.5 กรัมต่อลิตร	Leathers และ Gupta (1994)
A. pullulans QM 3092	ซูโครส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)	6.9 กรัมต่อลิตร	Reeslev และคณะ (1997)
A. pullulans *NRRL 6220*	Hydrolyzed potato starch waste เข้มข้นร้อยละ 20 (น้ำหนักต่อปริมาตร)	69 กรัมต่อลิตร	Barnett และคณะ (1999)
A. pullulans MTCC 2195	น้ำกระทิที่ความเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร	58.0 กรัมต่อลิตร	Thirumavalavan และคณะ (2009)

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนนั้นมีความ สำคัญต่อ การเจริญเติบโตของเซลล์ และการสังเคราะห์พูลลูแลนเช่นกัน ชนิดของไนโตรเจนที่แตกต่างกันจะส่งผลให้กา รเจริญเติบโต และการสังเคราะห์พูลลูแลนของ *A. pullulans* แตกต่างกัน Seviour และ Kristiansen (1983) ผลิตพอลิแซกคาไรด์จาก *A. pullulans* ในถังหมักขนาด 6 ลิตร พบว่า การผลิตพอลิแซกคาไรด์ขึ้นกับระดับของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ที่ระดับไนโตรเจนที่สูงเกินความจำเป็นจะส่งผลให้อัตราการผลิตพอลิแซคคาไรด์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด West และ Reed-Hamer (1991) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนช นิดต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตพู ลลูแลนจาก *A. pullulans* ATCC 42023 ได้แก่

แอมโมเนียมไนเตรท (ammonium nitrate) แอมโมนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) แอมโมเนียม ทาเทรต (ammonium tartrate) โซเดียมไนเตรท (sodium nitrate) แอสพาราจีน (asparagines) และยูเรีย (urea) โดยพบว่าแอมโมเนียมทาเทรตให้ผลผลิตพู ลลูแลนสูงสุดที่ 10.05 กรัม/ลิตร ขณะที่แหล่งไนโตรจนเชิงซ้อนเช่น ทริปโตน (tryptone) เปปโตน (peptone) ซอยโตน (soytone) และน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ให้ผลผลิตพูลลูแลนที่สูงกว่า โดยซอยโตนให้ผลผลิตพู ลลูแลนสูงสุดที่ 14.38 กรัมต่อลิตร (Reed-Hamer และ West 1994) เมื่อใช้ *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ต่างออกไป ในการผลิต ของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตพู ลลูแลนก็แตกต่างกันไป เช่น *A. pullulans* M-u 1 ให้ผลผลิตพูลลูแลนสูงสุดในอาหารที่มีแห ล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต (12.2 กรัมต่อลิตร) ขณะที่ *A. pullulans* NRM 2 ซึ่งคัดแยกได้ในประเทศไทย สามารถใช้ เปปโตนได้ดีกว่าแอมโมเนี ยมและโซเดียมไนเตรตโดยให้ผลผลิต สูงสุดที่ 25.1 กรัมต่อลิตร (Prasongsuk และคณะ 2007)

2.4.3 **อุณหภูมิ** (temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัย หนึ่งที่สำคัญต่อการสังเคราะห์พู ลลูแลนเช่นกัน Ueda และคณะ(1963) พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตพู ลลูแลนสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คือ 2.26 และ 0.38 กรัมต่อ 100 มล. ตามลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิทั้งสองระดับมีอัตราการเจริญเติบโตของ *A. pullulans* ไม่แตกต่างกัน Mcneil และคณะ (1989) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่ออัตรา การผลิตพอลิแซคคาไรด์ ของ *A. pullulans* ในช่วง 20 องศาเซลเซียส ถึง 36 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ ที่เหมาะสม ต่อการสังเคราะห์พู ลลูแลนคืออุณหภูมิที่ 24 องศาเซลเซียส West และ Hamer (1993) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิในการผลิตพู ลลูแลนโดย *A. pullulans* พบว่าการสังเคราะห์พู ลลูแลนเมื่อบ่มด้วยอุณหภูมิต่างๆจาก 23 องศาเซลเซียส ถึง 33 องศาเซลเซียส พบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตพู ลลูแลนคือ อุณหภูมิที่ 26 องศาเซลเซียส ระดับความเข้มข้นของพู ลลูแลนต่ำสุดเมื่อเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส และน้ำหนักเซลล์ต่ำสุดเมื่อเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส น้ำหนักเซลล์แห้งจะสูงขึ้นเสมอเมื่ออุ ณหภูมิสูงขึ้นในขณะที่การผลิตพูลลูแลนจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น สำหรับอุณหภูมิการผลิตพูลลูแลนไม่ขึ้นกับการเติบโตของเซลล์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมโยทั่วไปคือ 24-26 องศาเซลเซียส

2.4.4 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ปัจจัยของ pH นับว่ามีอิทธิพลต่อ การสังเคราะห์พู ลลูแลนเช่นเดียวกัน pH ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์พูลลูแลนจะขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ *A. pullulans* อย่างไรก็ตามในการผลิตพู ลลูแลน pH จะลดลง ระหว่างการผลิต อันเนื่องมาจากตัวพอลิเมอร์เอง ตลอดจน กรดอินทรีย์ และอนินทรีย์บางชนิดที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ Ono และคณะ (1977) รายงานว่าระดับของ pH เริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตมีความสำคัญมากต่อความสามารถของ *A. pullulans* สายพันธุ์ s-1 ในการผลิตพู ลลูแลน โดยไม่พบการผลิตพู ลลูแลนที่ระดับ pH เริ่มต้นเป็น 2-2.5 แต่ถ้าเลี้ยงที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.0 จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นผลผลิตได้ในอัตรา 50-60 % และระดับ pH เริ่มต้นจะลดลงอย่างรวดเร็วในระหว่างการเลี้ยง Imshetskii และคณะ (1981) pH ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์พู ลลูแลนโดย *A. pullulans* คือ 8.0 Lee และ Yoo (1993) ศึกษาผลกระทบของ pH ต่อขนาดโมเลกุลของพู ลลูแลนจาก *A. pullulans* พบว่าความเข้มข้นของพูลลูแลนสูงสุดเมื่อผลิตด้วย pH เริ่มต้นที่ 6 โดยพูลลูแลนจะมีขนาดโมเลกุล 50,000-600,000 DP เมื่อผลิตด้วย pH เริ่มต้นที่ 3.0 ขณะที่พูลลูแลนจะมีขนาดโมเลกุล 200,000-300,000 DP เมื่อผลิตที่ pH สูงกว่า 4.5 เมื่อ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 จะได้จำนวนโมเลกุลและความเข้มข้นของผลผลิตสูงที่สุด และระดับ pH จะเปลี่ยนเป็น 3.0 เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน Lacroixt และคณะ (1985) ศึกษาผลกระทบจากระดับ pH เริ่มต้นในการหมักด้วย *A. pullulans* 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ 2552 และ 140 B ในการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสังเคราะห์ พอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า pH ในอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วจากระดับ pH เริ่มต้นที่ 5.5 สู่ระดับ pH สุดท้ายคงที่ที่ระดับ pH 2.5 ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อทดลองใช้ pH เริ่มต้นที่ต่ำคือ pH 2 พบว่าพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยมาก Mcneil และคณะ (1989) พบว่าที่ pH ช่วง 3.0-6.3 ยีสต์ของ *A. pullulans* เป็นเซลล์พื้นฐานในการสังเคราะห์พู ลลูแลนและ อัตราการสังเคราะห์พู ลลูแลนจะขึ้นอยู่กับระดับ pH เริ่มต้นที่ใช้โดยระดับ pH จะส่งผลกระทบต่อสัดส่วนของการเกิดรูปร่างเซลล์แบบยีสต์ West และคณะ (1993) ศึกษาผลของ pH ของการผลิตพูลลูแลนในความสัมพันธ์ของแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดของอาหารสูตร growth medium โดยศึกษา pH ต่างๆ กันที่ pH 2.0 ถึง pH 7.5 ในอาหารสูตรใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เป็น เวลา 5 วัน โดยพบว่า ที่ pH 6.5 ให้ปริมาณพูลลูแลนสูงสุดที่ 8.37 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 5 วัน

2.4.5 แหล่งอาหารเสริมและวิตามิน

วิตามินเป็นสารอินทรีย์ที่ เชื้อต้องการในปริมาณน้อยเพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งวิตามินมีหน้าที่เป็น coenzyme หรือเป็นส่วนประกอบของ coenzyme ที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ วิตามินที่เชื้อต้องการเพื่อการเจริญเติบโต สารอินทรีย์หลายชนิดที่เชื้อราต้องการในปริมาณน้อย แต่ในระดับความเข้มข้นที่มากกว่าวิตามิน มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา คือ สารที่เป็น growth factor ได้แก่ amino acids, fatty acids, succinic acid, sterols, inositol, purine, pyrimidine และ choline สารแต่ละชนิด อาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อราชนิดต่างๆ ได้แตกต่างกัน จากงานวิจัยศึกษาการเติมแหล่งอาหารเสริมดังนี้ Lazaridou และคณะ ศึกษาการผลิต และลักษณะของพูลลูแลน จากกากน้ำตาล บีทโดยใช้สายพันธุ์ nonpigmented จาก *Aureobasidium pullulans* เพาะเลี้ยงแบบกะ โดยศึกษาการเติมแหล่งอาหารเสริมคือน้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตรและ tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตรโดยปริมาตร Roukas (1999) ได้ทำการศึกษาการผลิตพูลลู แลนจากของเสียโรงงานเบียร์ โดย *A. pullulans* ในงานทดลองทำการศึกษาผลของการเติมแหล่งอาหาร โดยพบว่าในสูตรปกติที่ไม่ได้เติมแหล่งอาหารเสริมให้ปริมาณพูลลูแลน 6.0±0.3 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตร และทวีน 80 ร้อยละ 0.5 ปริมาตรโดยปริมาตร ให้ปริมาณพูลลูแลน 8.5±0.3 กรัมต่อลิตร Thirumavalavan และคณะ (2009) ทำการศึกษาการผลิตพูลลูแลนโดย *A. pullulans* MTCC 2195 ในงานทดลองทำการศึกษาผลของการเติมน้ำก ะทิเป็นแหล่งอาหารเสริม พบว่าปริมาณพูลลูแลนที่ผลิตได้ 58.0 กรัมต่อลิตร Silva และคณะ (2007) ศึกษาผลกระทบของน้ำมันถั่วเหลืองและ Tween 80 ในการผลิต botryosphaeran โดย *Botryosphaeria rhodina* MAMB – 05 โดยศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสที่ 10-50 กรัมต่อลิตร น้ำมันถั่วเหลืองที่ 0-10 มิลลิลิตรต่อลิตรและ Tween 80 ที่ 0-5 กรัมต่อลิตร โดยบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่เร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของกลูโคสที่ 40 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วเหลืองที่ 10 มิลลิลิตรต่อลิตรและ Tween 80 ที่ความเข้มข้น 4.5 กรัมต่อลิตร Sena และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มผลผลิตพูลลูแลนโดยเชื้อ *A. pullulans* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ NRRL Y-2311-1 และNRRL Y-6220 โดย

เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร complex nitrogen broth (Pollock และคณะ, 1992) เติมน้ำมันถั่วเหลืองเป็นอาหารเสริมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 1 2 3 4 และ5 บ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 96 และ120 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 เวลา 96 ชั่วโมงให้ผลผลิต เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรค์ได้ในปริมาณสูงที่สุดคือ 29.58 และ27.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยในการศึกษานี้ สนใจแหล่งอาหารเสริม 3 ชนิดคือน้ำ มันมะพร้าว น้ำมันมะกอก และ น้ำกะทิโดยมีรายละเอียดดังนี้

น้ำมันมะพร้าว (coconut oil) คือ น้ำมันที่สกัดจากเนื้อมะพร้าวโดยน้ำมันมะพร้าวที่ดีจะต้องมีลักษณะที่ใส ไม่มีสี ไม่มีตะกอน มีกลิ่นหอมของมะพร้าว และไม่มีกลิ่นหืน จากการศึกษา Nima และคณะ, (2004) พบว่าน้ำมันมะพร้าวประกอบด้วยไขมันอิ่มตัวประมาณ ร้อยละ 92 โดยร้อยละ 70 เป็นกรดไขมันอิ่มตัวสายปานกลาง (Medium Chain Fatty Acid) ที่มี C อยู่ระหว่าง 8 - 12 ซึ่งมีลักษณะที่สาม ารถ แตกตัว ถูกย่อยและดูดซึมไปใช้งานได้ง่ายกว่ากรดไขมันสายยาว ร้อยละ 6 เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsatured fatty acid) ร้อยละ 2 เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid) กรดไขมันในมะพร้าวนี้ ร้อยละ 44 เป็นกรดลอริค (Lauric acid) ร้อยละ 16 กรดไมริสติก (myristic) ร้อยละ 8 ปาล์มิติก (Palmitic) และร้อยละ 8 กรดคาไพรลิก(Caprylic)

น้ำมันมะกอก (olive oil) คือ น้ำมันที่สกัดจากผลมะกอก กรดไขมันอิ่มตัวร้อยละ 8 - 27 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวร้อยละ 55 - 83 กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนร้อยละ 3.5 - 22 จากการศึกษา Kachouri และคณะ, (2003) น้ำมันมะกอก ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เช่น โทโคเฟอรอล (tocopherols) โดยเฉพาะที่มีมากคือ อัลฟา- โทโคเฟออล ซึ่งอยู่ในรูปของวิตามินอี และมีคาโรทีนในรูปของโปรวิตามินเอ รวมทั้งมีฟีนอลสาร เช่น กรดคาเฟอิก (caffeic) กรดวานิลลิก (vanillic) กรดพีคูมาริก (p-coumaric) กรดไซรินจิก (syringic) กรดเฟรูลิก (ferulic) และ กรดโฮโมวานิลลิก(homovanillic)

Jirapeangtong และคณะ, (2008) กะทิเป็นอิมัลชันของน้ำมันในน้ำตามธรรมชาติ ที่สกัดจาก endosperm ของมะพร้าว แก่ สีขาวขุ่นมีอิมัลชัน อิมัลชันของโปรตีนมะพร้าว คือ globulins albumins และ phospholipids โดยในกะทิประกอบด้วยไขมันร้อยละ 35 และร้อยละ 11 เป็นของแข็งที่ไม่ใช่น้ำมัน

ประโยชน์และความสำคัญของพูลลูแลน

พูลลูแลนมีคุณสมบัติ พิเศษคือ ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ อะไมเลสจากเชื้อรา แต่ไม่สามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์อะไมเลสในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ดังนั้นพูลลูแลนจึงจัดเป็นพอลิเมอร์ที่ให้พลังงานต่ำมาก และสามารถนำไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสำหรับคนที่ต้องการลดน้ำหนัก สำหรับการศึกษาล่าสุดยังพบ ว่าพูลลูแลนที่ใช้เป็นอาหารนั้นสามารถทำหน้าที่เป็นพรีไบโอติก (prebiotics) คือ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มไบฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria) (Leathers, 2003) เมื่อละลายผงพูลลูแลนในรูปของสารละลาย จะได้สารละลายที่ความหนืดและความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น พูลลูแลนจึงสามารถใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารได้ เช่น เครื่องดื่มชนิดต่างๆ และอาหารจำพวกไส้กรอก เป็นต้น ยังมีรายงานกล่าวถึงการใช้พูลลูแลนเป็นสารเติมแต่งใน เครื่องสำอาง โลชั่น และแชมพู นอก จากนี้พูลลูแลนยังมี คุณสมบัติ ในการเชื่อมยึด (adhesive property)ได้ดี จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์โดยใช้เป็นส่วนผสมในสารที่ใช้รักษาบาดแผล (wound healing) และใช้ในการยึดฟันปลอม (denture adhesive) ตลอดจนสามารถใช้เป็นสารเชื่อมและสารคงความเสถียรในอาหารบางชนิด เช่น ใช้ยึดส่วนผสมในขนมคุกกี้ เป็นต้น (Leathers, 2003)

แผ่นฟิล์มของพูลลูแลนนั้นมีคุณสมบัติคล้ายพลาสติกสังเคราะห์ แม้ว่าพูลลูแลนจะมีราคาสูงกว่าพลาสติกทั่วไป แต่มีข้อดีคือสามารถที่จะรับประทานได้และย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งแผ่นฟิล์มมีคุณสมบั ติในการป้องกันการเกิ ดออกซิเดชัน (oxidation) โดยสามารถต้านทานต่อการผ่านเข้าออกของออกซิเจนได้ดี นอกจากนี้แผ่นฟิล์มของพูลลูแลนมีคุณสมบัติละลายน้ำได้อย่างรวดเร็วจึงนำไปเคลือบสารสำหรับใช้ในการฆ่าเชื้อโรคในปาก ซึ่งมีการวางขายสินค้าชนิดนี้

ตามท้องตลาดทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย โดยผลิตภั ณฑ์ดังกล่าวมีชื่อว่า Cool Mint Listerine Pocket packs จำหน่ายโดยบริษัท Pfizer นอกจากนี้ในปัจจุบันบริษัท ฮายาชิบารา ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่คือแคปซูลจากพูลลูแลนสำหรับใช้ในการบรรจุภัณฑ์ยา (Deshpande และคณะ., 1992; Leathers, 2003; สีหนาท ประสงค์สุข, 2009)

การศึกษา *A. pullulans* ในประเทศไทย

สำหรับในประเทศไทย Manitchotpisit และคณะ, (2009) คัดแยก *A. pullulans* จำนวน 45 สายพันธุ์ จาก 15 จังหวัด และศึกษาความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรค์ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร production medium (PM) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามี 5 สายพันธุ์ที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรค์ได้ในปริมาณสูง คือซึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์ NRRL 58530 NRRL 58533 NRRL 58537 NRRL 58555 และ NRRL 58556 มีผลผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรค์อยู่ในช่วง 22 - 29 กรัมต่อลิตร

Prasongsuk และคณะ, (2005) ศึกษาลักษณะของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรค์ที่ผลิตได้โดย *A. pullulans* ซึ่งคัดแยกได้ใน ประเทศไทย จากการศึกษาน้ำหนักเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรค์ น้ำหนักโมเลกุลและค่าความหนืดของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรค์ที่ผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์ BK6 และ NRM2 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลและค่าความหนืดของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรค์ในวันที่ 3 ให้ค่าสูงกว่าในวันที่ 7 แต่ผลผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรค์ *A. pullulans* สายพันธุ์ BK6 และ NRM2 พบว่าวันที่ 7 ให้ผลผลิตสูงที่สุด

Punnapayak และคณะ, (2003) ศึกษาการคัดแยก *A. pullulans* ในประเทศไทย 3 สายพันธุ์ และศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ปริมาณพูลลูแลนสูงสุดที่ 26.2 กรัมต่อกรัมคาร์บอน

Prasongsuk และคณะ, (2007) ศึกษาลักษณะ การผลิตพูลลูแลน ที่ผลิตได้โดย *A. pullulans* ซึ่งคัดแยกได้ใน ประเทศไทย จากการศึกษา การผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRM2 ให้ผลผลิตสูงที่สุด คือ 25.2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์	บริษัท / ประเทศ
เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น SPL15	Labcon/The Republic of South Africa
เครื่องเขย่าแบบบ่ม (incubator shaker)	Vision scientific CO., LTD/ South Korea
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)	Ta Chang Medical Instrument Factory/ Taiwan
เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (Rotary Vacuum Evaporator)	Eyela, Japan
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PP-50	Sartorius/ Germany
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610	Sartorius/ Germany
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205	Denver Instrument Company/ USA
ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV 123	ISSOC/ Thailand
ตู้อบ (hot air oven)	Binder / USA
อุปกรณ์นับเซลล์ (haemacytometer)	Boeco, Germany
กล้องจุลทรรศน์รุ่น CH 30 RF200	Olympus/Japan
กล้องจุลทรรศน์รุ่น BX-51	Olympus/Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงรุ่น Rotofix32	Hettich/ Germany
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS spectrophotometer) รุ่น 2800	Unico/USA
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS spectrophotometer) รุ่น HP 8453	Agilent/USA

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	**บริษัท / ประเทศ**
ยีสต์สกัด (yeast extract)	HiMedia/India
เปปโตน (peptone)	Difco/ USA
กลูโคส (glucose)	Sigma/ USA
ฟรุคโตส (fructose)	Sigma/ USA
ซูโครส (sucrose)	Ajax/ Australia
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	Ajax/ Australia
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	Ajax/ Australia
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	Ajax/ Australia
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Merck/ Germany
ทวีน 80 (Tween 80)	Fluka/ Switzerland
เอทธานอล 95%	Alcohol/Thailand
น้ำมันมะกอก (olive oil)	Naturel/Spain
น้ำมันมะพร้าว (coconut oil)	Agrilife /Thailand
น้ำกะทิ (coconut milk)	Chaokoh /Thailand

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

Aureobasidium pullulans จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ NRRL 58530(CU17) NRRL 58533(CU20) NRRL 58537(CU24) NRRL 58555(CU44) และ NRRL 58556(CU45) จากคลังเชื้อของ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. **ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณสูง**

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ CU17 CU20 CU24 CU44 และ CU45 ในอาหารสูตร PM ปริมาตร 95 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเป็นจำนวน 9 วัน ตั้งแต่วันที่ 5 ถึงวันที่ 9 ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำ สารละลายส่วนใสมาตกตะกอนพูลลูแลนด้วยเอทธานอล (95%) ส่วนตะกอนเซลล์แขวนลอยด้วยน้ำกลั่นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำพูลลูแลนที่ได้จากการตกตะกอนและตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งที่ได้คงที่ วัดน้ำหนักของ พูลลูแลนที่ผลิตได้ และน้ำหนักเซลล์แห้ง (Prasongsuk และคณะ, 2005; Manitchotpisit และคณะ, 2009) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58530 NRRL 58533 NRRL 58537 NRRL 58555 และ NRRL 58556 เป็น stock culture โดยเก็บใน 30% กลีเซอรอล ที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับ short-term storage และทำเป็น freeze dried stock เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บรักษาในระยะยาว

2. **ศึกษาการเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน**

เลี้ยง *A. pullulans* จากสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 1 จำนวน 2 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณมาก 2 อันดับแรกในอาหารสูตร PM ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 ชั่วโมง ใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นเก็บทุกๆ 6 ชั่วโมงจนครบ 9 วัน ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. **ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน**

คัดเลือก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 2 ที่สามารถผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณมากที่สุด 1 สายพันธุ์ มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดดังนี้

3.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06

3.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่ง ไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5

3.3 ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM โดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 และที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 ตามลำดับ ที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่อัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 526:1, 409:1, 351:1, 293:1, 234:1, 175:1, 162:1, 117:1 และ 59:1

3.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM ที่ปรับได้จากข้อ 3.3 โดยศึกษาที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.0 6.5 และ 7.0

3.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM ที่ปรับได้จากข้อ 3.4 โดยศึกษาอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง(30±2) 25 และ 35 องศาเซลเซียส

3.6 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM ที่ปรับได้จากข้อ 3.5 โดยเติมน้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว และน้ำกะทิ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 5 และ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร) เป็นแหล่งอาหารเสริม

4. **วิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน**

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 2 ในภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3 นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนพูลลูแลนตามวิธีในข้อ 2 นำพูลลูแลนที่ได้มาบดเป็นผงและนำไปวิเคราะห์ ดังนี้

4.1 วิเคราะห์โครงสร้างของพูลลูแลน

วิเคราะห์โครงสร้างของพูลลูแลน ชนิดผง และฟิล์มของพูลลูแลน ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปคโตรสโคปี (Infrared-spectroscopy) และวิเคราะห์โครงสร้างของพูลลูแลนชนิดเป็นผง ด้วยเทคนิค นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนสเปค โตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) ชนิด ^{1}H (Prasongsuk และคณะ, 2007; Manitchotpisit และคณะ, 2009) เปรียบเทียบกับพูลลูแลนมาตรฐานจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.2 วิเคราะห์ความหนืดของพูลลูแลน

วิเคราะห์ความหนืดของพูลลูแลน ผงโดยนำมาละลายน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)แล้วนำมาวัดความหนืด ด้วยเครื่องวัดความหนืด Brookfield Viscometer โดยใช้เข็มเบอร์ 18 ที่อุณหภูมิ 28.4 องศาเซลเซียส (Prasongsuk และคณะ, 2005; Manitchotpisit และคณะ, 2009)

4.3 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน ผงโดยนำพูลลูแลนผงมาละลายน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วจึงนำมา วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วย วิธีโครมาโตกราฟีแบบ Gel Permeation Chromatography (GPC)

สภาวะที่ใช้ในการทดสอบ Eluent: water, Flow rate: 1.0 ml/min, Injection volume: 20 µl, Temperature: 40.0 ºC, Column: PL aquagel – OH 50 8µm 300x7.5 mm, Polymer standard: Pullulan (MW 48,800-342 Dalton), Calibration method: Pullulan standard calibration, Detector: Refractive Index Detector

4.4 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ (Leathers และคณะ, 1988)

นำพูลลูแลนผง 0.01 กรัม ละลายด้วย 0.05 M sodium acetate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยใช้อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ชนิดนั้น

ดังตาราง ที่ 2 อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ pullulanase α-amylase glucoamylase และ cellulase

ชนิดของเอนไซม์	pH	อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)
pullulanase	5.0	25
α-amylase	6.9	20
glucoamylase	4.5	55
cellulase	4.5	45

โดยใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.1 U/ml นำไปบ่มเป็นเวลา 15 ชั่วโมง และทำการวัดน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

4.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

จากการเพาะเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 2 ในภาวะที่เลือกได้จากข้อ 3 ในอาหารสูตร PM โดยนำสารละลายส่วนใสมาเติม 1% borohydride-reduced starch ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่ม 30 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี Somogyi Nelson

5. ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

นำพูลลูแลนผงที่ผลิตจากภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 3 มาขึ้นรูปฟิล์ม โดยนำพูลลูแลนผงมาละลายด้วยน้ำกลั่น ที่ ความเข้มข้นร้อยละ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ศึกษาสมบัติทางฟิสิกส์ของฟิล์มที่ขึ้นรูปไว้เปรียบเทียบกับ เปรียบเทียบกับพูลลูแลนมาตรฐานสำหรับขึ้นฟิล์มจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา ดังนี้

5.1 ทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มที่ผลิต (Kristo และคณะ, 2007)

ศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์มได้แก่ ความทนแรงดึง (tensile strength) และความสามารถในการยืด ตัว(elongation) กำหนดสภาวะของเครื่อง โดยใช้ load cell ขนาด 5 กิโลกรัม ชุดหัวกดเจาะแบบยาง spherical probe แท่นยึดตัวอย่างฟิล์มที่มีช่องเปิดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร ความเร็วในการเคลื่อน probe ที่ 10 มิลลิเมตรต่อนาที ตัวอย่างฟิล์มที่ทดสอบมีขนาดกว้าง 6 มิลลิเมตร ยาว 25 มิลลิเมตร โดยเปรียบเทียบกับพูลลูแลนมาตรฐานจากบริษัท sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.2 ทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มที่ผลิต (Teramoto และ Shibata, 2006)

นำแผ่นฟิล์ม พูลลูแลนมาตัดให้มีขนาดเท่าๆ กันคือ กว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 3 เซนติเมตร เทน้ำกลั่นลงไปให้ท่วมแผ่นฟิล์มแล้วทำการจับเวลาจนกระทั่งแผ่นฟิล์ม บวมตัวและละลายจนหมด

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณสูง

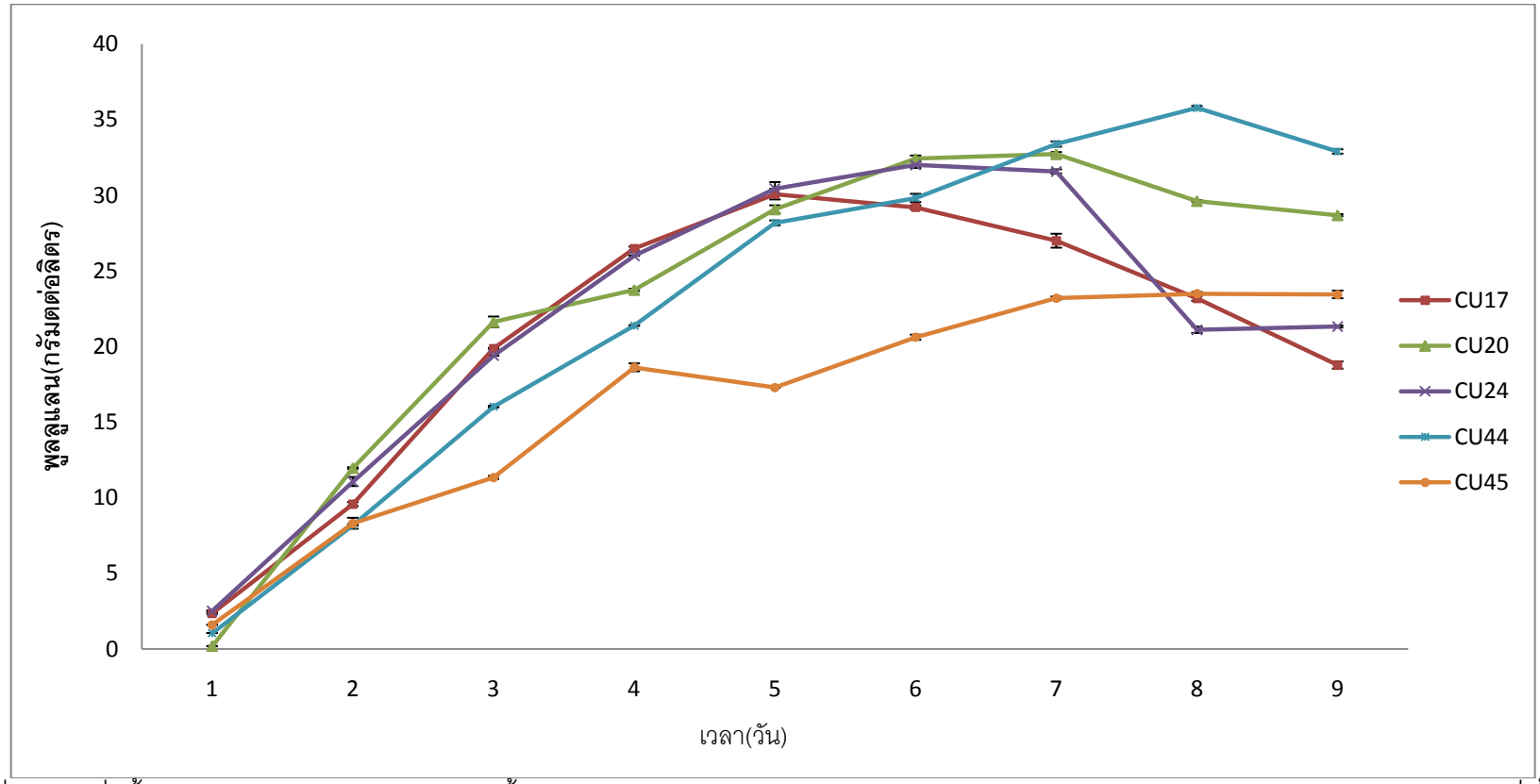
จากการเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ CU17 CU20 CU24 CU44 และ CU45 ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน pHเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส) พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ CU17 โดยในวันที่ 5 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 30.07±0.35 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.40±0.01 กรัมต่อลิตร สายพันธุ์ CU20 โดยในวันที่ 7 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 32.7±0.13 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.50±0.01 กรัมต่อลิตร สายพันธุ์ CU24 โดยในวันที่ 6 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 31.90±0.2 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.50±0.02 กรัมต่อลิตร สายพันธ์ CU44 โดยในวันที่ 8 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.32±0.01 กรัมต่อลิตร และ สายพันธุ์ CU45 โดยในวันที่ 8 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 23.49±0.11 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.47±0.01 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3 และภาพที่ 4) โดยมี 2 สายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนสูงสุด คือ สายพันธุ์ CU20 ในวันที่ 7 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 32.7±0.13 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.50±0.01 กรัมต่อลิตร และ CU44 ในวันที่ 8 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.32±0.01 กรัมต่อลิตร จึงนำมาศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักพูลลูแลน (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU17 CU20 CU24 CU44และCU45 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

day	CU17		CU20		CU24	
	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
1	2.36±0.04	2.53±0.04	1.9±0.01	1.53±0.02	2.52±0.03	2.03±0.01
2	9.58±0.13	3.66±0.03	12.0±0.05	2.84±0.02	11.07±0.3	3.14±0.04
3	19.87±0.03	4.30±0.01	21.6±0.36	3.35±0.00	19.42±0.02	3.92±0.03
4	26.47±0.13	4.89±0.04	23.7±0.07	3.67±0.02	26.0±0.01	4.52±0.02
5	30.07±0.35	5.40±0.01	29.1±0.26	3.74±0.01	30.43±0.44	5.01±0.01
6	29.20±0.12	5.89±0.01	32.4±0.20	3.69±0.02	31.90±0.2	5.50±0.02
7	26.99±0.46	5.31±0.07	32.7±0.13	3.50±0.01	31.57±0.14	5.91±0.01
8	23.17±0.16	5.67±0.04	29.6±0.05	3.76±0.01	21.14±0.21	5.58±0.01
9	18.77±0.24	5.83±0.03	28.7±0.07	3.63±0.01	21.32±0.07	5.67±0.04

ตารางที่ 3 (ต่อ)

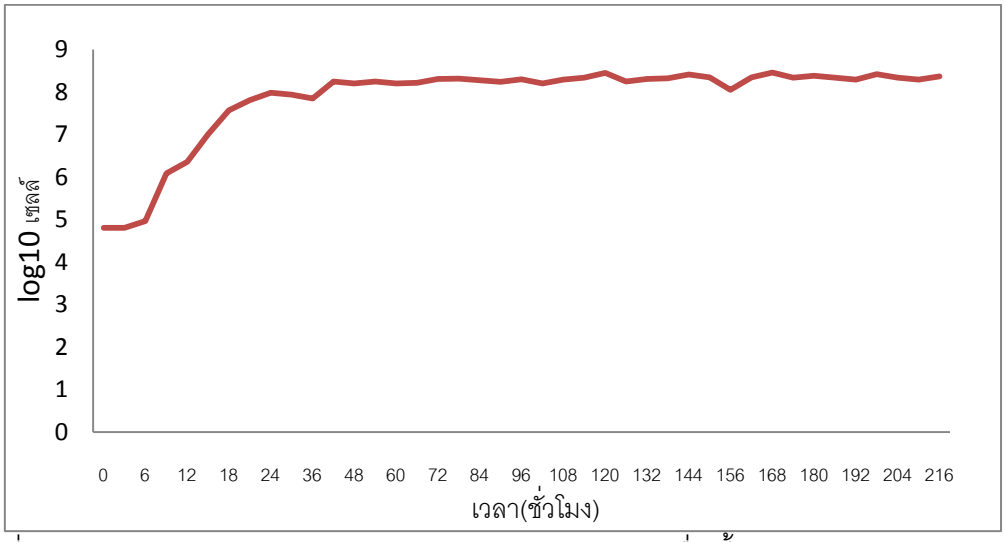
day	CU44		CU45	
	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
1	1.05±0.00	1.19±0.02	1.60±0.01	1.01±0.01
2	8.2±0.05	2.43±0.01	8.31±0.36	2.71±0.01
3	16.02±0.05	3.24±0.01	11.34±0.1	3.47±0.02
4	21.38±0.03	3.56±0.00	18.62±0.26	4.21±0.01
5	28.17±0.16	4.40±0.04	17.29±0.02	4.83±0
6	29.82±0.27	5.52±0.02	20.61±0.17	4.95±0.01
7	33.38±0.18	4.23±0.22	23.20±0.1	5.33±0.03
8	35.78±0.12	4.32±0.01	23.49±0.11	5.74±0.01
9	32.89±0.14	4.72±0.08	23.44±0.25	6.09±0.03



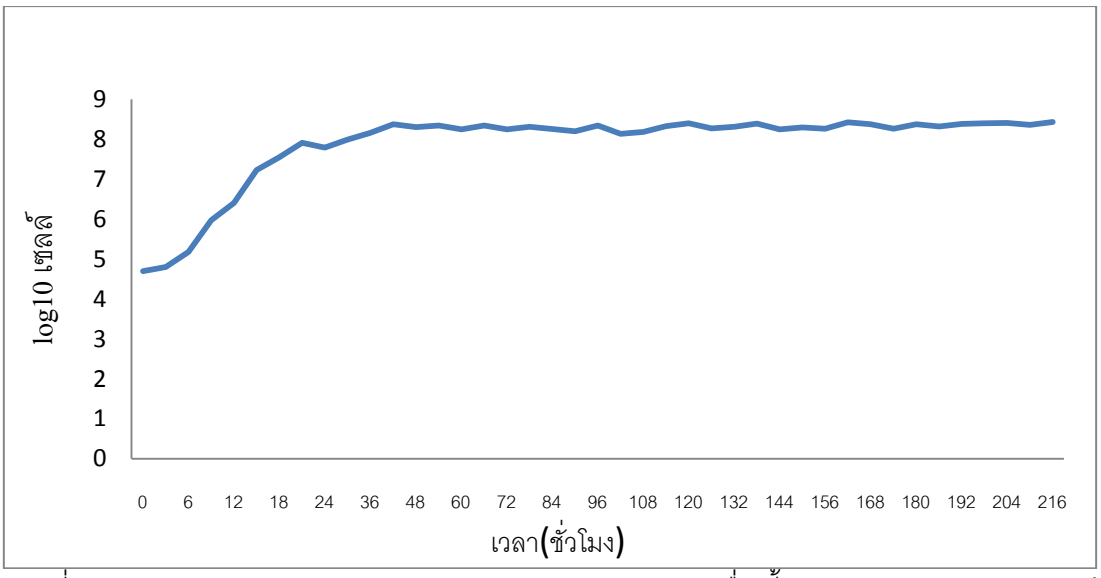
ภาพที่ 4 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักพูลลูแลน(กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU17 CU20 CU24 CU44และCU45 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

2. ศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU20 และ CU44

คัดเลือก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ปริมาณมากจำนวน 2 สายพันธุ์จากข้อ 1 คือสายพันธุ์ CU20 และ CU44 ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน pHเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) พบว่า สายพันธุ์ CU20 และ CU44 มีการเจริญเติบโตในช่วง lag phase ใช้เวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นจะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วเข้าสู่ช่วง log phase และให้จำนวนเซลล์ 8.24 และ 8.38 $\log_{10}$เซลล์ ภายใน 42 ชั่วโมง หลังจากนั้น พบว่า เซลล์มีการเจริญคงที่ (stationary phase) (ตารางที่ 4 และภาพที่ 5-6)



ภาพที่ 5 Log จำนวนเซลล์ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU20 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน pHเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)



ภาพที่ 6 Log จำนวนเซลล์ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน pHเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

ตารางที่ 4 ผลของจำนวนเซลล์ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU20 และ CU44 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน pHเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

เวลาของการเลี้ยง(ชั่วโมง)	0	3	6	9	12	15	18	21	24	30	36	42	48	54
$\log_{10}$ เซลล์ CU20	4.8	4.8	4.96	6.08	6.35	7	7.57	7.81	7.98	7.94	7.85	8.24	8.2	8.25
$\log_{10}$ เซลล์ CU44	4.7	4.8	5.18	5.97	6.41	7.23	7.55	7.91	7.79	7.99	8.16	8.38	8.3	8.34

ตารางที่ 4 (ต่อ)

เวลาของการเลี้ยง(ชั่วโมง)	60	66	72	78	84	90	96	102	108	114	120	126	132	138
$\log_{10}$ เซลล์ CU20	8.2	8.21	8.31	8.31	8.28	8.24	8.29	8.2	8.29	8.33	8.45	8.24	8.3	8.32
$\log_{10}$ เซลล์ CU44	8.24	8.34	8.24	8.31	8.25	8.2	8.34	8.14	8.19	8.32	8.4	8.27	8.31	8.4

ตารางที่ 4 (ต่อ)

เวลาของการเลี้ยง(ชั่วโมง)	144	150	156	162	168	174	180	186	192	198	204	210	216
$\log_{10}$ เซลล์ CU20	8.41	8.34	8.05	8.34	8.45	8.34	8.38	8.34	8.29	8.42	8.33	8.29	8.37
$\log_{10}$ เซลล์ CU44	8.25	8.3	8.26	8.42	8.38	8.27	8.37	8.32	8.38	8.4	8.41	8.36	8.43

3. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

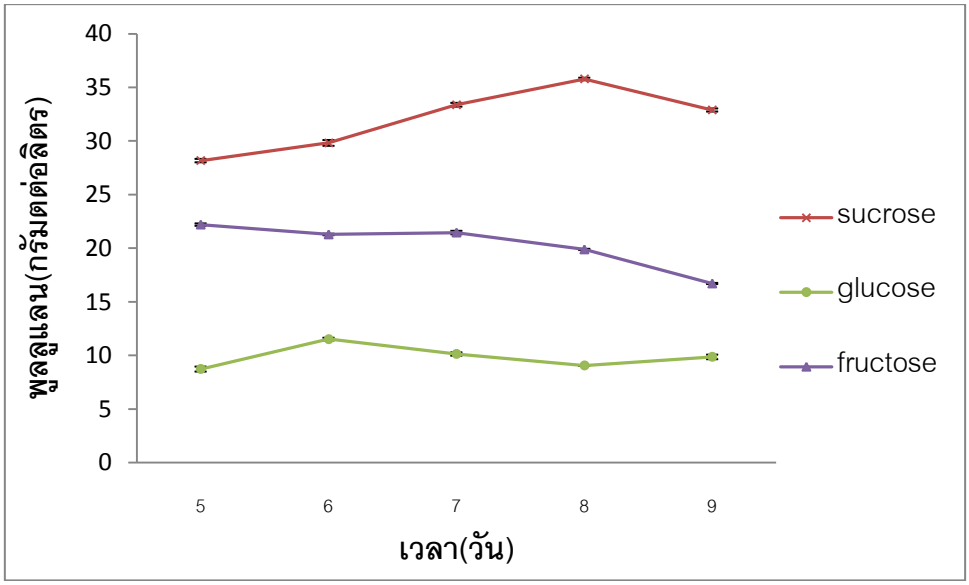
คัดเลือก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่สามารถผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณมาก 1 สายพันธุ์จากข้อ 2 คือสายพันธุ์ CU44 มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนที่ให้ผลผลิตสูงที่สุดในแต่ละภาวะดังนี้

3.1 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน โดยศึกษาแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส โดยใช้เปปโตนเป็นแหล่งโตรเจน พบว่าแหล่งคาร์บอนต่างๆ มีผลต่อการผลิตพูลลูแลนโดยในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อด้วย ซูโครส/เปปโตน ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.32±0.01 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อด้วย กลูโคส /เปปโตน ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 11.52±0.07 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.56±0.07 กรัมต่อลิตร และในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อด้วย ฟรุคโตส /เปปโตน ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 22.2±0.23 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 2.71±0.07 กรัมต่อลิตร โดยในวันที่ 8 จะให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร ของการเลี้ยงเชื้อด้วย ซูโครส/เปปโตน และในวันที่ 6 ให้น้ำหนักพูลลูแลนต่ำสุดที่ 11.52±0.07 กรัมต่อลิตร ของการเลี้ยงเชื้อด้วยกลูโคส/เปปโตน (ตารางที่ 5 และรูปที่ 7) ดังนั้นจึงเลือกซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาต่อไปเนื่องจาก ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 5 น้ำหนักพูลลูแลน(กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน pHเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

วัน	ซูโครส		กลูโคส		ฟรุคโตส	
	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
5	28.17±0.16	4.40±0.04	8.73±0.11	8.02±0.02	22.20±0.23	2.71±0.07
6	29.82±0.27	5.52±0.02	11.52±0.07	4.56±0.07	21.28±0.12	3.66±0.05
7	33.38±0.18	4.23±0.22	10.13±0.17	6.49±0.11	21.46±0.15	7.23±0.02
8	35.78±0.12	4.32±0.01	9.06±0.06	8.35±0.07	19.88±0.04	7.57±0.08
9	32.89±0.14	4.72±0.08	9.86±0.05	9.08±0.12	16.71±0.21	6.69±0.13



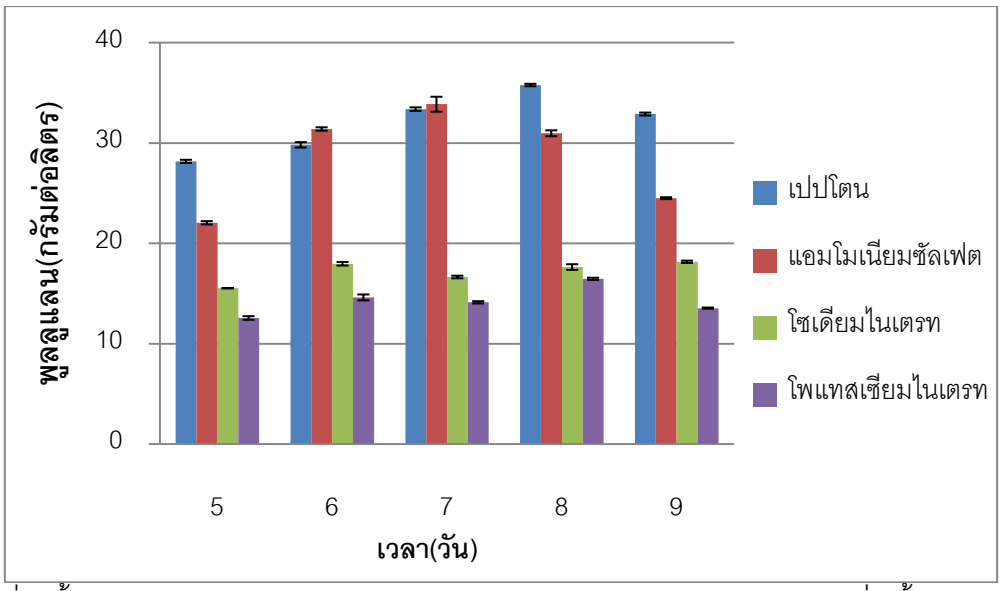
รูปที่ 7 น้ำหนักพูลลูแลน(กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

3.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษาแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิดคือ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)พบว่าแหล่งไนโตรเจนต่างๆ มีผลต่อการผลิตพูลลูแลนโดยในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อด้วย เปปโตน ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.32±0.01 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 33.87±0.74 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.90±0.02 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อด้วย โพแทสเซียมไนเตรท ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 16.47±0.11 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 7.12±0.21 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อด้วย โซเดียมไนเตรท ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 18.17±0.12 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.57±0.09 กรัมต่อลิตร โดยในวันที่ 8 จะให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร ของการเลี้ยงเชื้อด้วยซูโครส/เปปโตน และในวันที่ 8 ให้น้ำหนักพูลลูแลนต่ำสุดที่ 16.47±0.11 กรัมต่อลิตร ของการเลี้ยงเชื้อด้วย ซูโครส / โพแทสเซียมไนเตรท (ตารางที่ 6 และภาพที่ 8) ดังนั้นจึงเลือกเปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจนในการศึกษาต่อไปเนื่องจากให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 6 น้ำหนักพูลลูแลน(กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียม ไนเตรท และโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน pHเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

วัน	ซูโครส/เปปโตน		ซูโครส/แอมโมเนียมซัลเฟต		ซูโครส/โพแทสเซียมไนเตรท		ซูโครส/โซเดียมไนเตรท	
	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
5	28.17±0.16	4.40±0.04	22.05±0.17	4.68±0.09	12.57±0.18	7.18±0.06	15.53±0.01	5.63±0.1
6	29.82±0.27	5.52±0.02	31.40±0.17	4.46±0.02	14.62±0.29	5.68±0.04	17.97±0.18	4.93±0.11
7	33.38±0.18	4.23±0.22	33.87±0.74	4.90±0.02	14.13±0.11	5.86±0.02	16.65±0.13	5.17±0.01
8	35.78±0.12	4.32±0.01	30.97±0.29	5.49±0.01	16.47±0.11	7.12±0.21	17.64±0.28	4.94±0.01
9	32.89±0.14	4.72±0.08	24.51±0.10	5.69±0.01	13.55±0.06	8.86±0.05	18.17±0.12	4.57±0.09



ภาพที่ 8 น้ำหนักพูลลูแลน (กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียม ไนเตรท และโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน pHเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

3.3 ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

จากการเลี้ยง A. pullulans ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันอัตราส่วนที่อัตราส่วน 526:1, 409:1, 351:1, 293:1, 234:1, 175:1, 162:1, 117:1 และ 59:1 พบว่าที่อัตราส่วน 526:1 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 7.62±0.13 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.70±0 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ที่อัตราส่วน 409:1 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 20.79±0.13 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.40±0.01 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ที่อัตราส่วน 351:1 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 21.41±0.04 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.42±0.01 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ที่อัตราส่วน 293:1 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 19.94±0.20 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.37±0.01 กรัมต่อลิตร ใน วันที่ 8 ที่อัตราส่วน 234:1 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.32±0.01 กรัมต่อลิตร ที่อัตราส่วน 175:1 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 18.47±0.24 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.28±0.01 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ที่ระดับ 162:1 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 18.44±0.13 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.04±0.03กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ที่อัตราส่วน 117:1ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 10.44±0.13

กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.06±0.13 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ที่อัตราส่วน 59:1 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 10.44±0.13 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.06±0.03 กรัมต่อลิตร โดยในวันที่ 8 จะให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร ของการเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่อัตราส่วน 234:1 และในวันที่ 6 ให้น้ำหนักพูลลูแลนต่ำสุดที่ 1.27±0.07 กรัมต่อลิตร ของการเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วนของคาร์บอนต่ อไนโตรเจนที่ระดับ 59:1(ตารางที่7)ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่อัตราส่วน 234:1 ในการศึกษาต่อไปเนื่องจากให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 7 น้ำหนักพูลลูแลน และน้ำหนักเซลล์ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้เปปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ระดับ 526:1, 410:1, 351:1, 293:1, 234:1, 162:1, 176:1, 117:1 และ 59:1 pHเริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

วัน	526:1		409:1		351:1	
	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
5	7.62±0.13	3.73±0	15.38±0.04	4.93±0.00	14.68±0.29	4.96±0.03
6	4.84±0.05	3.88±0.01	16.50±0.06	5.48±0.01	15.33±0.14	5.57±0.01
7	6.89±0.01	3.85±0	18.21±0.20	5.89±0.15	18.09±0.21	6.09±0.03
8	6.85±0.03	4.00±0.01	19.09±0.14	5.82±0.03	17.91±0.17	6.29±0.02
9	6.75±0.12	3.89±0.01	20.79±0.13	6.36±0.01	21.41±0.04	6.42±0.01

ตารางที่ 7(ต่อ)

วัน	293:1		234:1		175:1	
	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
5	4.87±0.01	28.17±0.16	18.44±0.13	14.12±0.09	4.40±0.04	5.04±0.03
6	5.25±0.01	29.82±0.27	14.38±0.05	16.39±0.1	5.52±0.02	5.30±0.03
7	5.37±0.01	33.38±0.18	17.66±0.01	19.94±0.20	4.23±0.22	5.41±0.03
8	5.31±0.01	35.78±0.12	13.50±0.03	15.78±0.10	4.32±0.01	5.60±0.02
9	5.83±0.01	32.89±0.14	15.38±0.12	17.85±0.64	4.72±0.08	5.63±0.01

ตารางที่ 7(ต่อ)

วัน	162:1		117:1		59:1	
	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
5	14.38±0.18	4.28±0.01	9.51±0.05	4.34±0.02	1.06±0.04	3.31±0.01
6	15.47±0.50	4.43±0.01	10.44±0.13	4.06±0.03	3.65±0.06	3.50±0.03
7	13.56±0.11	4.74±0.00	7.43±0.06	3.91±0.01	1.27±0.07	3.37±0.03
8	10.33±0.16	4.84±0.02	4.82±0.30	3.61±0.01	1.14±0.10	3.17±0.04
9	8.32±0.11	4.64±0.02	2.26±0.10	3.59±0.01	0.30±0.00	3.05±0.03

3.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่อัตราส่วน 234:1 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2) แต่เปลี่ยนแปลงระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ 6.0 6.5 และ 7.0 พบว่าในวันที่ 7 ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ 6.0 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 15.41±0.08 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.78±0.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH 6.5 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.32±0.01 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH 7.0 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 15.12±0.17 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.73±0.47 กรัมต่อลิตร โดยในวันที่ 8 จะให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร ของการเลี้ยงเชื้อด้วยระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH 6.5 และในวันที่ 5 จะให้น้ำหนักพูลลูแลนต่ำสุดที่ 15.12±0.17 กรัมต่อลิตร ของการเลี้ยงเชื้อด้วยระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH 7.0 (ตารางที่ 8) ดังนั้นจึงเลือก pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH 6.5 ในการศึกษาต่อไปเนื่องจากให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 8 น้ำหนักพูลลูแลน และน้ำหนักเซลล์ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจนที่อุณหภูมิห้อง (30±2) แต่เปลี่ยนแปลงระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ 6.0 6.5 และ 7.0

วัน	pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0	
	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
5	14.14±0.11	4.50±0.03	28.17±0.16	4.40±0.04	15.12±0.17	4.73±0.47
6	14.47±0.04	4.33±0	29.82±0.27	5.52±0.02	13.93±0.18	5.03±0.5
7	15.41±0.08	4.78±0.03	33.38±0.18	4.23±0.22	14.04±0.4	5.42±0.54
8	14.89±0.13	4.71±0.03	35.78±0.12	4.32±0.01	12.42±0.19	5.43±0.54
9	11.32±0.02	5.06±0.05	32.89±0.14	4.72±0.08	10.74±0.02	5.50±0.55

3.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่อัตราส่วน 234:1 pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้อุณหภูมิห้อง (30±2) 25 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าในวันที่ 8 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 21.49±0.13 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.94±0.02 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2) ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.32±0.01 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 10.74±0.11 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.27±0.00 กรัมต่อลิตร โดยในวันที่ 8 จะให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตรของการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30±2) และในวันที่ 5 จะให้น้ำหนักพูลลูแลนต่ำสุดที่ 10.74±0.11 กรัมต่อลิตร ของการเลี้ยงเชื้อด้วยอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 9)ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้อง (30±2)ในการศึกษาต่อไปเนื่องจากให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 9 น้ำหนักพูลลูแลน และน้ำหนักเซลล์ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ อุณหภูมิห้อง 25 และ 35 องศาเซลเซียส

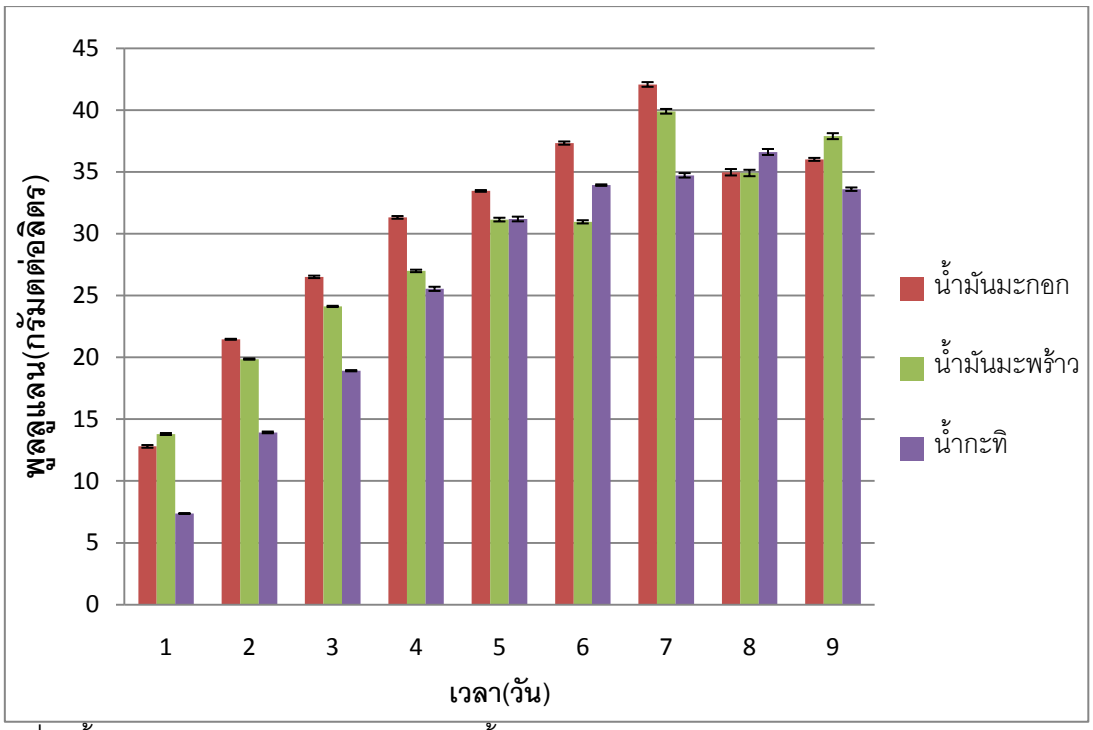
วัน	25 องศาเซลเซียส		อุณหภูมิห้อง(30±2)		35 องศาเซลเซียส	
	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
5	21.40±0.16	4.27±0.00	28.17±0.16	4.40±0.04	10.74±0.11	4.27±0.00
6	21.09±0.14	4.88±0.02	29.82±0.27	5.52±0.02	6.03±0.17	4.12±0.02
7	20.67±0.06	5.01±0.03	33.38±0.18	4.23±0.22	2.51±0.15	3.90±0.05
8	21.49±0.13	4.94±0.02	35.78±0.12	4.32±0.01	2.91±0.06	3.68±0.02
9	19.92±0.42	5.50±0.02	32.89±0.14	4.72±0.08	3.65±0.13	4.20±0.03

3.6 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมชนิดต่างๆที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่อัตราส่วน 234:1 pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2) เมื่อเติมอาหารเสริมชนิดต่างๆ ดังนี้น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว และน้ำกะทิ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร)พบว่า ในวันที่ 7 เมื่อเติมน้ำมันมะกอก ให้น้ำหนักพูลลูแล นสูงสุดที่ 42.08±0.19 กรัมต่อลิตรน้ำหนักเซลล์แห้ง 8.40±0.12 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 เมื่อเติมน้ำมันมะพร้าว ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 39.9±0.19 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 7.74±0.03 กรัมต่อลิตร และในวันที่ 8 เมื่อเติมน้ำกะทิ ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 36.61±0.24 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.35±0.06 กรัมต่อลิตร โดยในวันที่ 7 จะให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 42.08±0.19 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมน้ำมันมะกอก และโดยในวันที่ 8 จะให้น้ำหนักพูลลูและต่ำสุดที่ 36.61±0.24 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมน้ำกะทิ (ตารางที่ 10) จากผลพบว่าการเติมน้ำมันมะกอกให้ปริมาณพูลลูแลนสูงสุดจึงนำมาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมคือที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 และ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร) พบว่าในวันที่ 9 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 24.95±0.13 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 9.52±0.04 กรัมต่อลิตร และในวันที่ 9 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 7 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 29.32±0.03 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 10.22±0.12 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 11 และภาพที่ 9)ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร)ในการศึกษาต่อไปเนื่องจากให้ น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 42.08±0.19 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 10 น้ำหนักพูลลูแลน(กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2)เมื่อเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว และน้ำกะทิ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร)

วัน	น้ำมันมะกอก ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร)		น้ำมันมะพร้าว ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร)		น้ำกะทิ ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร)	
	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
1	12.86±0.11	6.00±0.24	13.80±0.08	11.81±0.19	7.37±0.01	3.16±0.04
2	21.46±0.04	8.43±0.08	19.86±0.05	6.82±0.01	13.93±0.07	5.48±0.04
3	26.51±0.1	4.09±0.02	24.12±0.05	5.56±0.06	18.92±0.05	6.40±0.09
4	31.32±0.11	4.19±0.01	26.99±0.1	5.45±0.04	25.54±0.17	6.73±0.01
5	33.46±0.07	4.83±0.05	31.14±0.15	7.66±0.22	31.19±0.19	7.63±0.01
6	37.33±0.13	6.36±0.2	30.96±0.13	10.18±0.08	33.93±0.06	7.47±0.02
7	42.08±0.19	8.40±0.12	39.90±0.19	7.74±0.03	34.72±0.18	8.23±0.01
8	34.97±0.26	8.77±0.15	34.91±0.26	7.95±0.07	36.61±0.24	8.35±0.06
9	36.01±0.12	8.97±0.07	37.89±0.24	7.63±0.1	33.60±0.14	8.43±0.02



รูปที่ 9 น้ำหนักพูลลูแลน (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2)เมื่อเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว และน้ำกะทิ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร)

ตารางที่ 11 น้ำหนักพูลลูแลน(กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์(กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ เปปโตน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง(30±2) เมื่อเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 5 และ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร)

วัน	น้ำมันมะกอก ความเข้มข้นร้อยละ 3 (ปริมาตรโดยปริมาตร)		น้ำมันมะกอก ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร)		น้ำมันมะกอก ความเข้มข้นร้อยละ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร)	
	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	พูลลูแลน (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
1	3.14±0.02	5.27±0.06	12.86±0.11	6.00±0.24	4.47±0.04	4.68±0.03
2	8.01±0.23	6.42±0.05	21.46±0.04	8.43±0.08	8.50±0.14	6.87±0.08
3	11.89±0.13	6.83±0.01	26.51±0.1	4.09±0.02	15.29±0.03	6.64±0.08
4	15.12±0.02	7.84±0.08	31.32±0.11	4.19±0.01	17.83±0.21	6.76±0.01
5	20.91±0.21	8.36±0.01	33.46±0.07	4.83±0.05	23.12±0.21	8.65±0.09
6	19.87±0.07	8.62±0.04	37.33±0.13	6.36±0.2	20.06±0.07	9.19±0.03
7	23.99±0.09	8.67±0.01	42.08±0.19	8.40±0.12	28.21±0.08	10.13±00
8	23.91±0.12	9.86±0.06	34.97±0.26	8.77±0.15	29.31±0.03	9.60±0.14
9	24.95±0.13	9.52±0.04	36.01±0.12	8.97±0.07	29.32±0.12	10.22±0.12

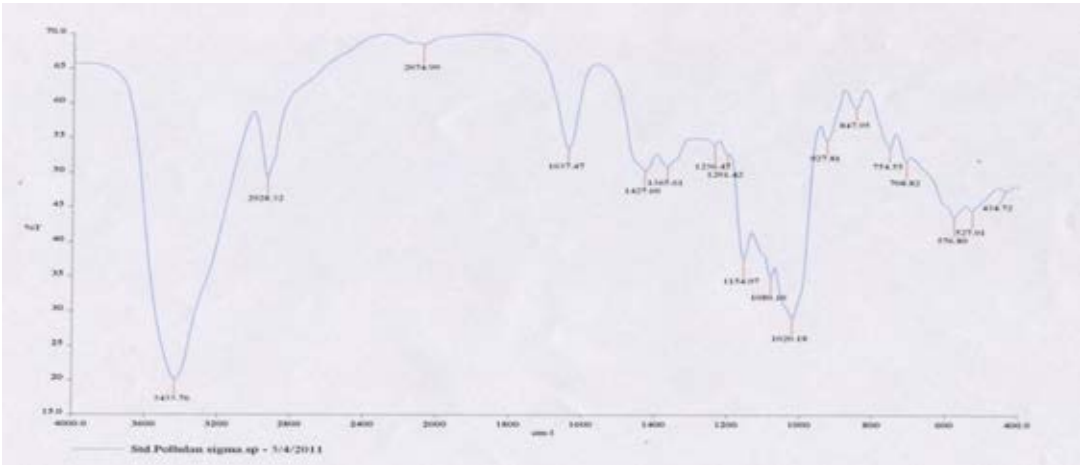
4. วิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

4.1 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของพูลลูแลน **ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม -สเปกโตรสโกปี** (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

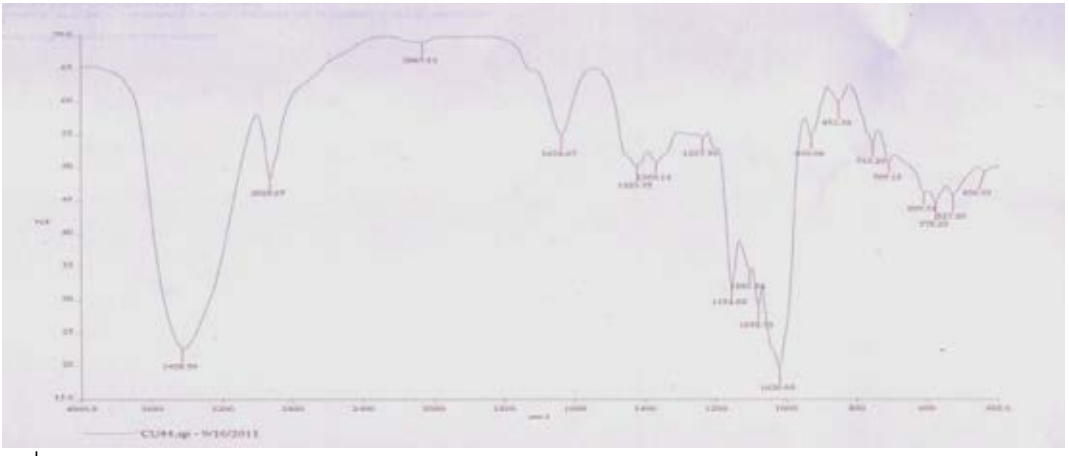
จากการตรวจสอบสมบัติเชิงโครงสร้างของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 (สูตรซูโครส/เปปโตน วันที่ 7) พูลลูแลนฟิล์มที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 (วันที่ 7 และ 8 อาหารสูตร ซูโครส /เปปโตน) และพูลลูแลนฟิล์มที่ผลิตได้ จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 (วันที่ 7 อาหารสูตร อาหารสูตร ซูโครส /เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งอาหารเสริม) เปรียบเทียบกับโครงสร้างพูลลูแลนมาตรฐาน (Sigma Chemical, USA) ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) (ตารางที่ 12) (ภาพที่ 10-14)

ตารางที่ 12 ตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก FTIR สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของพูลลูแลน

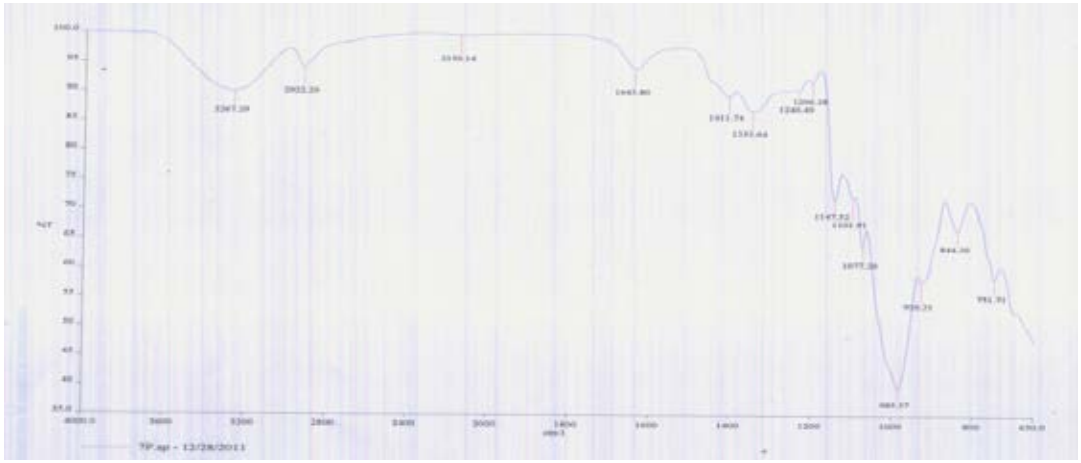
หมู่ฟังก์ชัน	ตำแหน่งพีกที่เลขคลื่น (cm^{-1})				
	พูลลูแลน (sigma)	พูลลูแลน CU 44 อาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน	พูลลูแลนฟิล์ม CU 44 (วันที่ 7 อาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน)	พูลลูแลนฟิล์ม CU 44 (วันที่ 8 อาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน)	พูลลูแลนฟิล์ม CU 44 (วันที่ 7 อาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอก
-OH	3433.76	3428.50	3267.29	3261.14	3252.49
-C-H	2928.32	2929.07	2922.29	2923.34	2922.80
C=O	2074.99	2067.12	2150.14	2150.60	2139.66
-C-OH	1427.60	1423.75	1411.74	1407.22	1410.93
-OH bonding in alcohol	1365.61	1369.14	1353.64	1354.68	1352.74
C-O	1080.10	1079.75	1077.20	1076.90	1077.25
α-configuration	847.95	852.38	844.30	843.33	843.92



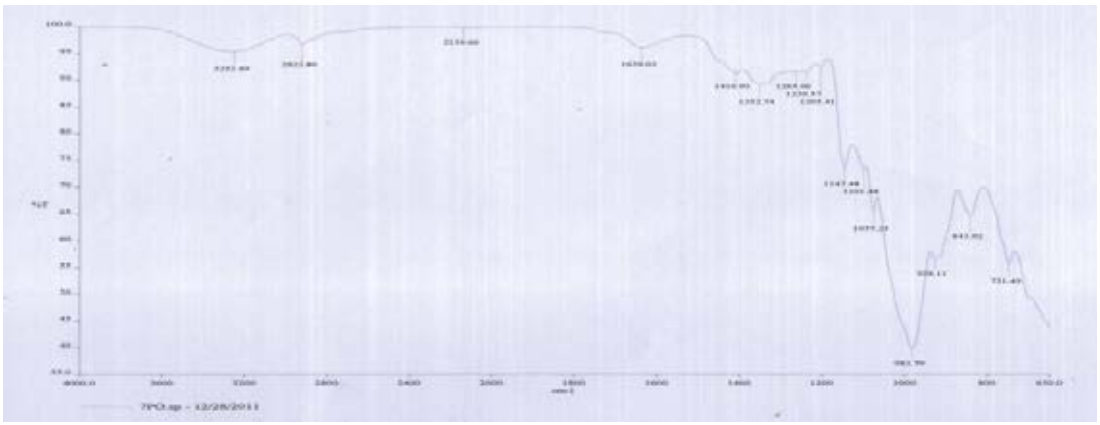
ภาพที่ 10 FT-IR spectrum ของพูลลูแลน sigma



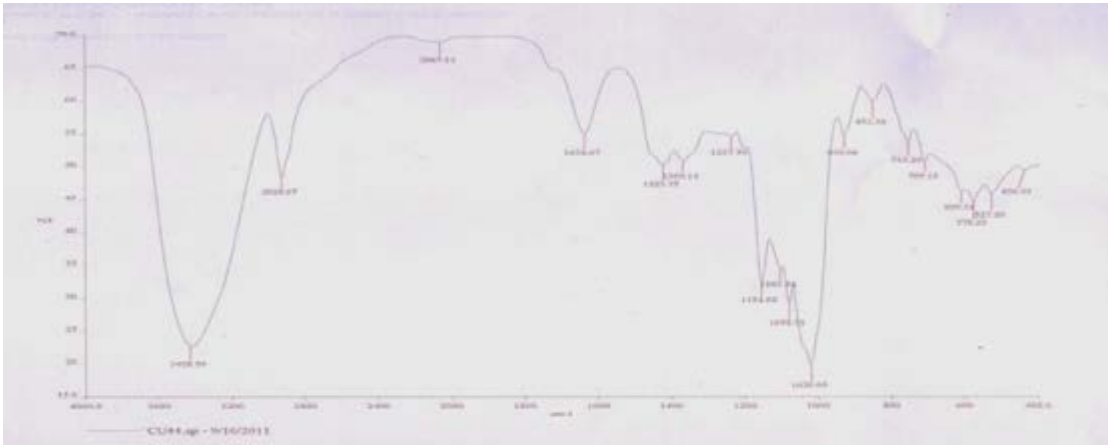
ภาพที่ 11 FT-IR spectrum ของสารสกัดจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44



ภาพที่ 12 FT-IR spectrum ของฟิล์มของ*สารสกัดจาก A. pullulans* สายพันธุ์ CU44(วันที่ 7 อาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน)



ภาพที่ 13 FT-IR spectrum ของฟิล์มของ*สารสกัดจาก A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 (วันที่ 8 อาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน)



ภาพที่ 14 FT-IR spectrum ของฟิล์มพูลลูแลนผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 (วันที่ 7 อาหารสูตรซูโครส/เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอก)

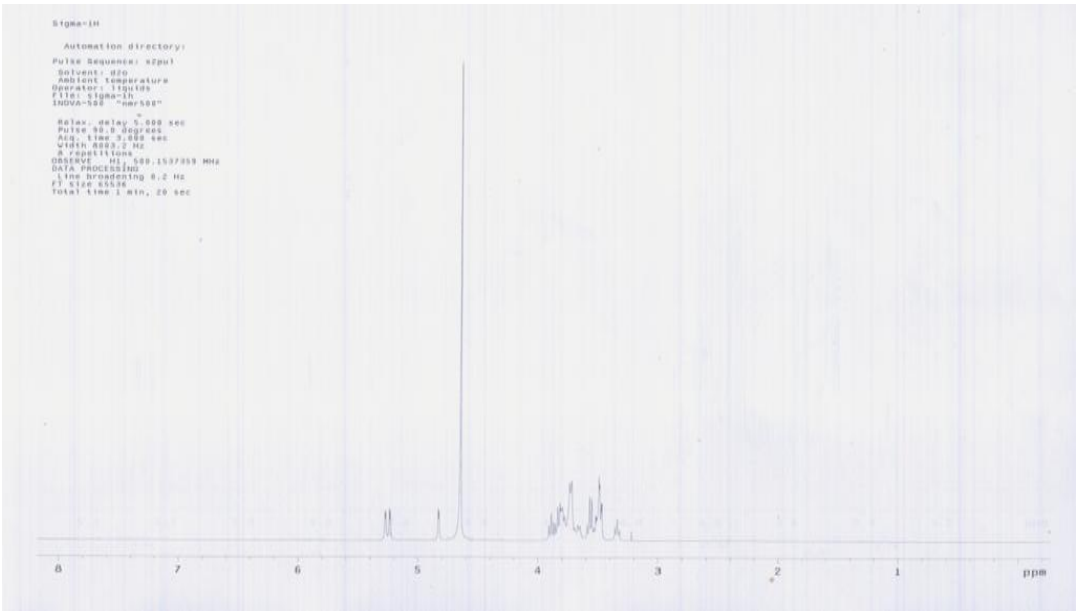
เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 กับโครงสร้างสารพูลลูแลนมาตรฐาน (Sigma Chemical, USA) พบว่ามีโครงสร้างหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ประกอบด้วย alkane, carbonyl, ether, hydroxyl, hydroxyl bonding in alcohol, primary alcohol และ α-configuration ที่ตรงกัน ทำให้สรุปได้ว่าสารที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ที่สูตรอาหารดังกล่าวข้างต้น เป็นสารพูลลูแลน

4.2 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างของพูลลูแลน **ด้วยเทคนิค**นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนสเปคโตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy)

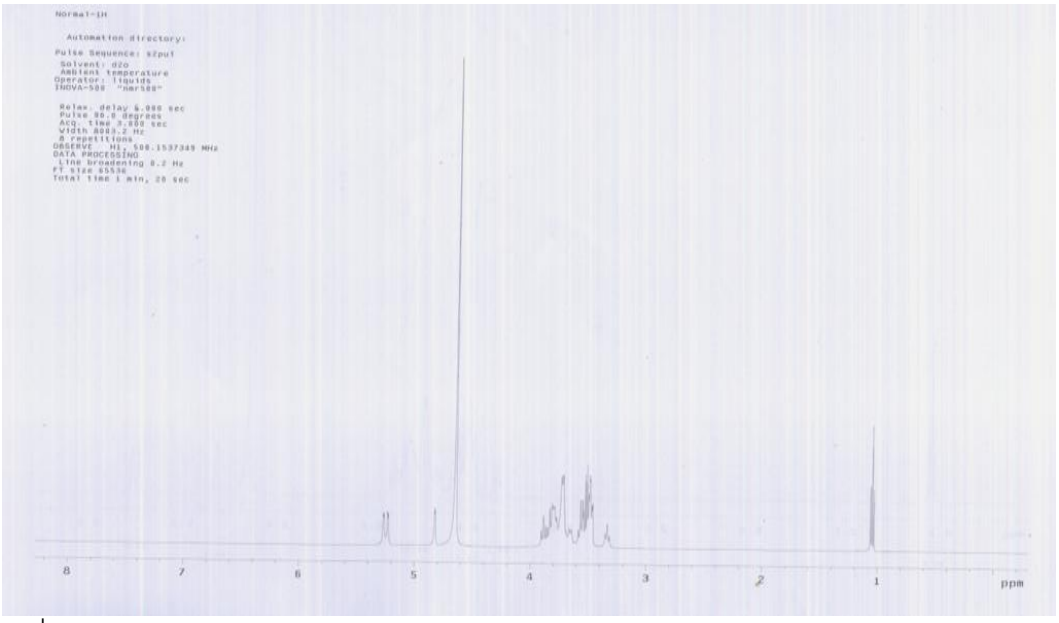
ในการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีของสารที่ ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เอ็น เอ็ม อาร์ สเปคโตรสโค รปี พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับ สารพูลลูแลนมาตรฐาน จากบริษัท Sigma ดังข้อมูลในตารางที่ 12 และภาพที่ 15-17 พบสัญญาณต่างๆ ที่ประกอบด้วย 2 สัญญาณของ **α**-1,4 และ **α**-1,6 glycosidic bonds ทำให้ระบุได้ว่า สารที่จุลินทรีย์ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ผลิตไดคือพูลลูแลน

ตารางที่ 13 ตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก ^{1}H –NMR สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของพูลลูแลน

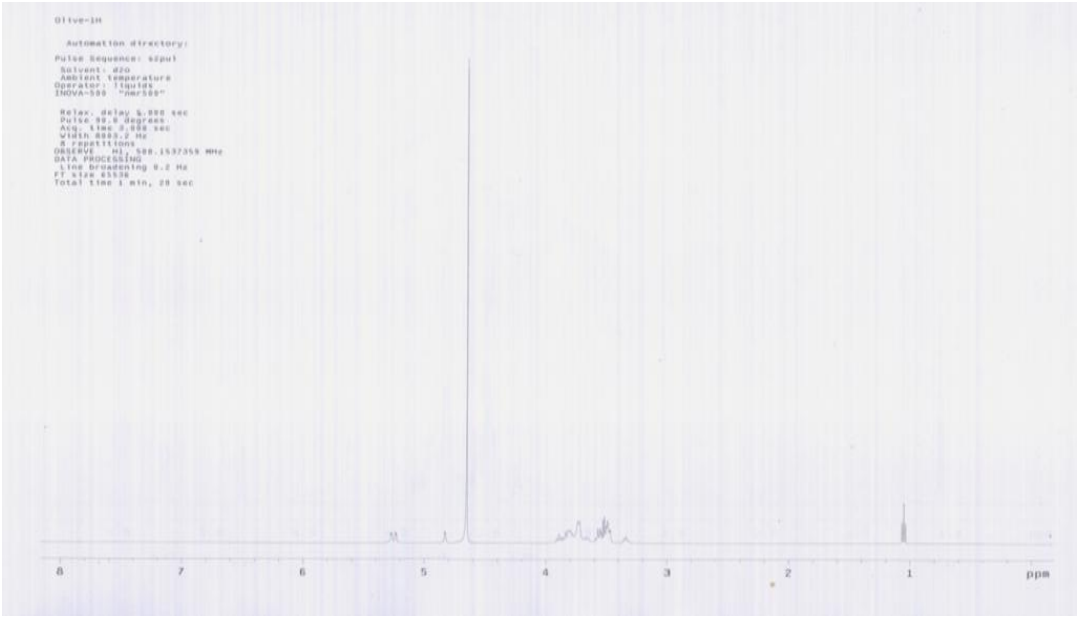
Signal	^{1}H –NMR chemical shift (ppm.)		
	พูลลูแลนมาตรฐาน (sigma)	พูลลูแลน CU 44 (อาหารสูตร ซูโครส/ เปปโตน)	พูลลูแลนฟิล์ม CU 44 (อาหารสูตร ซูโครส/ เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอก)
α-1, 4	5.277 และ 5.240	5.272 และ 5.236	5.273 และ 5.236
α-1, 6	4.832	4.828	4.830



ภาพที่ 15 H^{1}-NMR spectrum ของสารพูลลูแลนมาตรฐาน(sigma)



ภาพที่ 16 H^1-NMR spectrum ของ สารสกัด จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 (อาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน)



ภาพที่ 17 H^1-NMR spectrum ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 (อาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอก)

4.3 วิเคราะห์ความหนืดของพูลลูแลน

ในการทดสอบสมบัติค วามหนืดของ สาร พูลลูแลน ตัวอย่างที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ด้วยเครื่องวัดความหนืด Brookfield Viscometer ซึ่งมีความสัมพันธ์กับขนาดน้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน โดยพูลลูแลนที่ผลิตได้จากอาหารสูตรซูโครส/เปปโตนมีค่าความหนืดที่ลดลงตามระยะเวลาในการที่แยกสกัดจากจุลินทรีย์ที่วันต่าง ๆ กัน โดยมีค่าความหนืดในวันที่ 1 และวันที่ 9 เป็น 8.6 cP และ 2.03 ตามลำดับ ให้ผลเช่นเดียวกันกับในพูลลูแลนที่ผลิตได้จากอาหารสูตรซูโครส/เปปโตนและมีการเติมน้ำมันมะกอก คือค่าความหนืดที่ลดลง จาก 6.88 cP ในวันที่ 1 และลดลงเป็น 1.64 ในวันที่ 9 ดังตารางที่ 13, 14 ซึ่งค่าดังกล่าวนี้มีความสัมพันธ์กับขนาดน้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน

ตารางที่ 14 ความหนืดของสารละลายพูลลูแลน ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 2 ที่ได้จาก สูตรซูโครส/เปปโตน

สูตรอาหาร	**วันที่**	**ค่าความหนืด cP**	**%T**
ซูโครส/เปปโตน	1	8.61	57.3
	2	7.69	51.2
	3	7.37	49.1
	4	3.50	23.3
	5	2.27	15.1
	6	2.14	14.3
	7	2.08	13.9
	8	1.89	12.7
	9	2.03	13.6

ตารางที่ 14 (ต่อ)

สูตรอาหาร	วันที่	ค่าความหนืด cP	%T
ซูโครส/เปปโตน ผสมน้ำมันมะกอก	1	6.88	45.9
	2	6.22	41.5
	3	4.28	28.5
	4	2.51	16.8
	5	2.1	14.0
	6	2.03	13.5
	7	1.91	12.8
	8	1.76	11.8
	9	1.64	11.0

เมื่อ cP คือ ค่าความหนืดสารละลาย หน่วย centipoise

%T คือ Torge ความน่าเชื่อถือของข้อมูล (อยู่ระหว่าง 20-90 %)

สภาวะในการทดสอบสารตัวอย่างใช้สารตัวอย่างเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก วัดที่อุณหภูมิ 28.4 องศาเซลเซียส และใช้เข็มเบอร์ 18

4.3 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 ด้วย Gel Permeation Chromatography (GPC) โดยนำพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 มาวิเคราะห์ ขนาดน้ำหนักโมเลกุล เฉลี่ย พบว่า สารสกัดพูลลูแลนที่ได้จากอาหารสูตรซูโครส/เปปโตน ให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลสูงสุดคือ 14,431 ดาลตัน ในวันที่ 3 และต่ำสุดในวันที่ 7 คือ 3,432 ดาลตัน ในขณะที่สารสกัดพูลลูแลนที่ได้จาก อาหารสูตรซูโครส/เปปโตน ที่มีการเติมน้ำมันมะกอก ให้ค่าน้ำหนักโมเลกุลสูงสุดในวันที่ 5 คือ 39,810 ดาลตัน และต่ำสุดในวันที่ 7 คือ 29,187 ดาลตัน ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน

ตัวอย่าง	น้ำหนักโมเลกุล M_w (Daltons)	Polydispersity Index, Mw/Mn
P1	14,431	1.5
P2	8,933	1.8
P3	3,432	1.9
P6	39,810	1.5
P7	29,187	3.0

*** (P1) พูลลูแลนวันที่ 3 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตน,

(P2) พูลลูแลนวันที่ 5 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตน,

(P3) พูลลูแลนวันที่ 7 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตน,

(P6) พูลลูแลนวันที่ 5 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม

(P7) พูลลูแลนวันที่ 7 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม

Mw, คือ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (weight average molecular weight, Mw)

Mn คือ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (number average, Mn)

และ Polydispersity Index, PI คือ ค่ากระจายน้ำหนักโมเลกลมาก ถ้า PI อยู่ในช่วงกว้าง หมายถึง โมเลกุลมีขนาดแตกต่างกันมาก

จากผลการวิเคราะห์ค่า น้ำหนักโมเลกุล แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการแยกสกัดหรือเก็บสารพูลลูแลนจากเชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อขนาดน้ำหนักโมลกุล โดยที่ระยะเวลานานขึ้นส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลลดลง

4.4 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ (Leathers และคณะ, 1988)

ทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยย่อยพอลิแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ α-amylase pullulanase glucoamylase และ cellulase และทำการวัดน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) พบว่าพูลลูแลนที่ผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 มีความไวต่อเอนไซม์ α-amylase เป็น 0.53% ความไวต่อเอนไซม์ pullulanase เป็น 87.57% ความไวต่อเอนไซม์ glucoamylase เป็น 40.41% และความไวต่อเอนไซม์ cellulose เป็น 0% ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 16 ความไวต่อเอนไซม์ α-amylase pullulanase glucoamylase และ cellulase

A. pullulans	pullulanase	α-amylase	glucoamylase	cellulase
CU20	82.80%	0.11%	40.41%	ND
CU44	87.57%	0.53%	42.66%	ND

ND = ไม่สามารถตรวจสอบความไวต่อเอนไซม์

4.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

จากการเพาะเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 ในอาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน และสูตร ซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมเป็นเวลา 9 วัน โดยนำสารละลายส่วนใสมาเติม 1% borohydride-reduced starch แล้ววัดน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) ด้วยวิธี Somogyi Nelson พบว่าในอาหารสูตร ซูโครส /เปปโตนเริ่มมีกิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 6 คือ 0.31 ยูนิตต่อไมโครลิตร โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 9 คือ 1.39 ยูนิตต่อไมโครลิตร ในอาหารสูตร ซูโครส /เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม เริ่มมีกิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 7 คือ 1.54 ยูนิตต่อไมโครลิตร ถึงวันที่ 9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 3.08 ยูนิตต่อไมโครลิตร โดยในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 17 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

วัน	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ซูโครส/เปปโตน (ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0	0	0	0	0	0.31	0.77	0.77	1.39
ซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอก (ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0	0	0	0	0	0	1.54	1.54	3.08

5. **ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44**

ได้นำพูลลูแลนที่ ได้จากการ ผลิตมาศึกษาสมบัติทาง กายภาพของแผ่นฟิล์มที่ ขึ้นรูปและทำการเปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพ กับฟิล์มพูลลูแลน เกรดทางการค้า (Sigma) โดยสารพูลลูแลนที่เลือกมาประกอบด้วย พูลลูแลนจาก อาหารสูตรซูโครส/เปปโตน ในวันที่ 7 และ วันที่ 8 และจากสูตรอาหารซูโครส/เปปโตนที่มีน้ำมันมะกอก ในวันที่ 5 และ วันที่ 7

5.1 ทดสอบสมบัติความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile strength) ของฟิล์ม

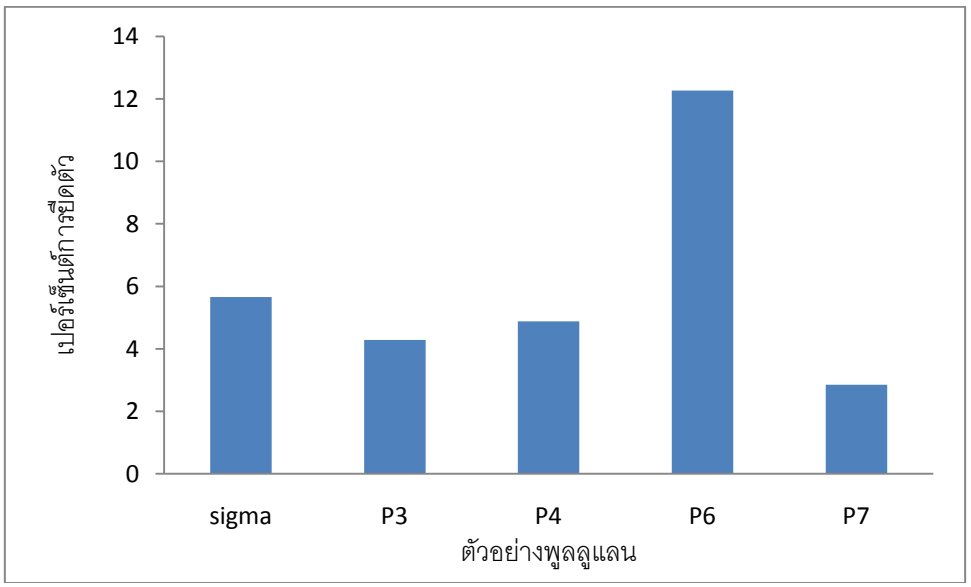
สมบัติเชิงกลของแผ่นฟิล์ม ที่วิเคราะห์ ได้แก่ ความสามารถในการยืด (Elongation at break) กำหนดสภาวะของเครื่อง โดยใช้ load cell ขนาด 5 กิโลกรัม ชุดหัวกดเจาะแบบยาง Spherical Probe แท่นยึดตัวอย่างฟิล์มที่มีช่องเปิดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร ความเร็วในการเคลื่อน Probe ที่ 10 มิลลิเมตรต่อนาที ตัวอย่างฟิล์มที่ทดสอบมีขนาดกว้าง 6 มิลลิเมตร ยาว 25 มิลลิเมตร

พบว่า ค่า ความเค้น (Stress)ของฟิล์มพูลลูแลนได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร sucrose/peptone ที่วันที่ 7 มีค่า 9.16 kgf/mm^2 วันที่ 8 มีค่า 10.95 kgf/mm^2 ซึ่งมีค่าที่ต่ำกว่าของฟิล์มพูลลูแลนมาตรฐาน เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์การยืดตัว คือที่เวลาวันที่ 7 มีค่า 4.28 % วันที่ 8 มีค่า 4.88 % และส่วนฟิล์มพูลลูแลนที่ได้จาก อาหารสูตรซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกให้ผลเช่นเดียวกัน ทั้งในสมบัติค่าความเค้น และ เปอร์เซ็นต์การยืดตัว ดังตารางที่ 17 และภาพที่ 18 ซึ่งสอดคล้องกับการที่ฟิล์มพูลลูแลนจากพูลลูแลนมาตฐานมีค่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยที่สูงกว่าพูลลูแลนที่ได้จากการทดลอง จึงให้สมบัติความแข็งแรงของฟิล์มที่มากกว่า โดยพบว่าค่าความแข็งแรงของฟิล์ม(Stress) และความยืดหยุ่น มีค่าใกล้เคียงกับฟิล์มที่ได้จากเพคตินหรือฟิล์มจากแป้ ง ซึ่งเป็นกลุ่มฟิล์มชนิดรับประทานได้เช่นเดียวกัน (ภูริสา ทัศวิล และคณะ, 2553)

ตารางที่ 18 สมบัติทางกายภาพของฟิล์ม

ชื่อตัวอย่าง	ค่าความเค้น(Stress) (kgf/mm^2)	เปอร์เซ็นต์การยืดตัว (%)
sigma	12.66	5.66
P3	9.16	4.28
P4	10.95	4.88
P6	12.00	12.26
P7	10.28	2.85

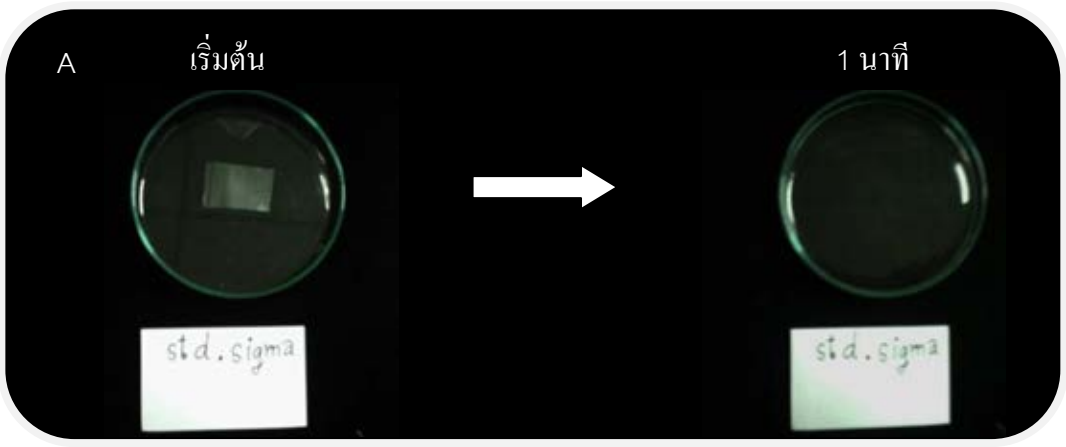
(P3) พูลลูแลนวันที่ 7 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตน, (P4) พูลลูแลนวันที่ 8 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตน, (P6) พูลลูแลนวันที่ 5 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม, (P7) พูลลูแลนวันที่ 7 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม

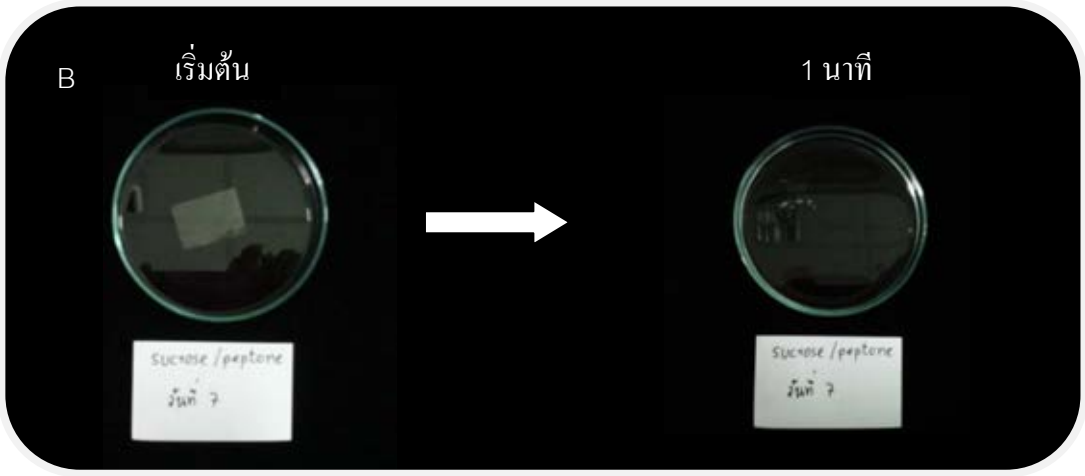


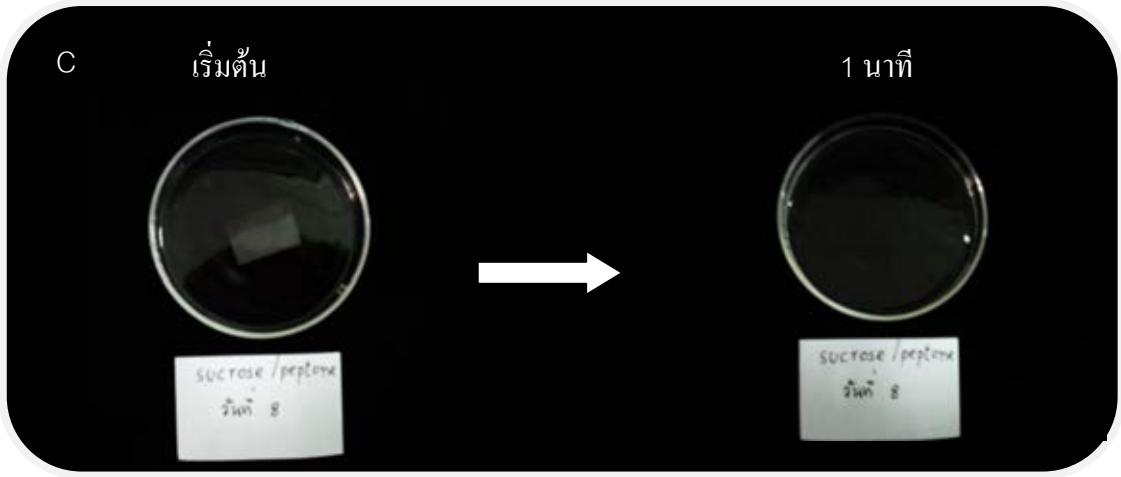
ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์การยืดตัว (P3) พูลลูแลนวันที่ 7 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตน, (P4) พูลลูแลนวันที่ 8 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตน, (P6) พูลลูแลนวันที่ 5 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม , (P7) พูลลูแลนวันที่ 7 อาหาร PM สูตร ซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม

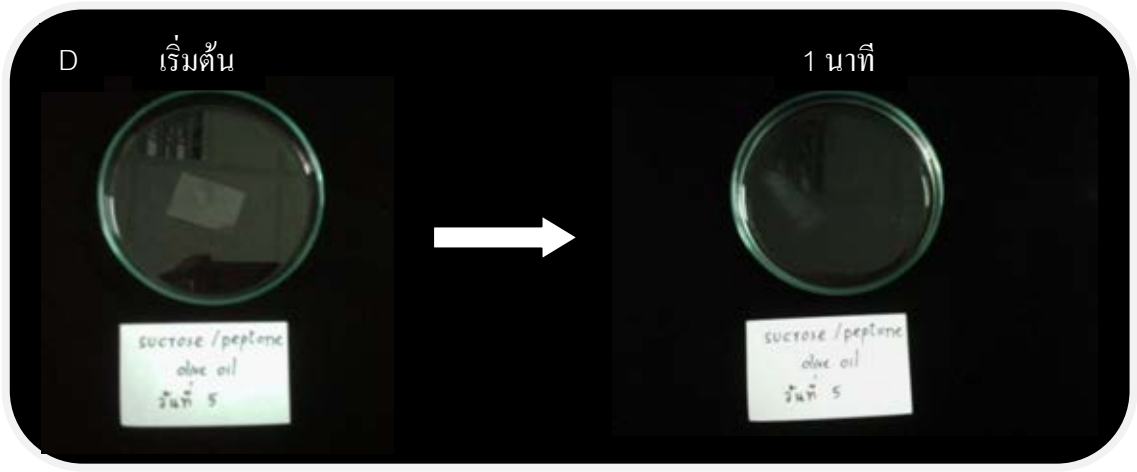
5.2 การทดสอบสมบัติการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มที่ได้

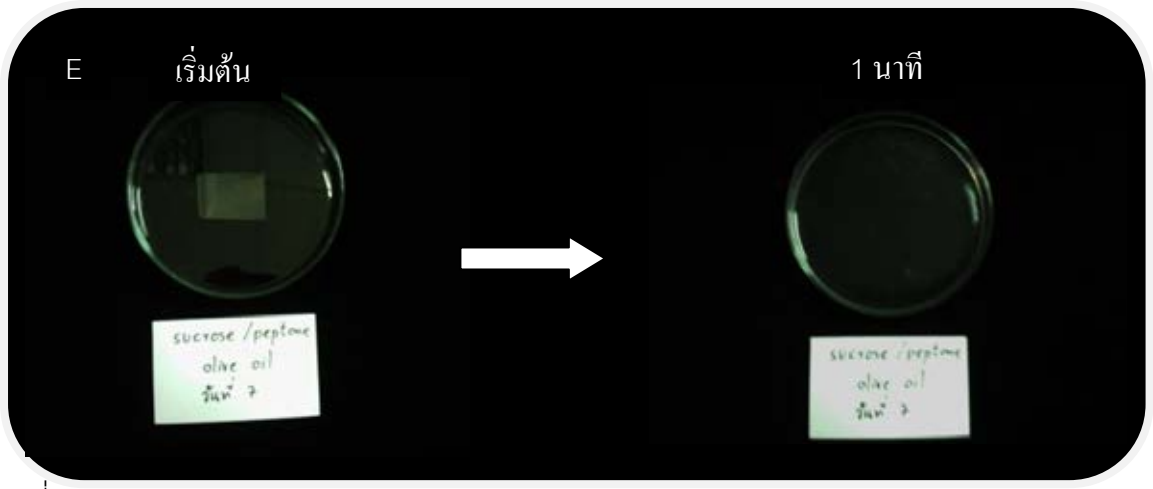
การศึกษาทดสอบสมบัติการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มตัวอย่างดังนี้ ฟิล์มพูลลูแลนจากพูลลูแลนมาตรฐาน ฟิล์มพูลลูแลนได้จากอาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน วันที่ 7 และ วันที่ 8 ฟิล์มพูลลูแลนได้จากอาหาร สูตร ซูโครส/เปปโตนที่มีน้ำมันมะกอก ใน วันที่ 5 และ วันที่ 7 จากการทดสอบ พบว่าในทุกชนิดของตัวอย่างฟิล์มเกิดการบวมตัวและสลายกลายเป็นเจลได้หมดภายในเวลา 1 นาที ดังภาพที่ 19


A
เริ่มต้น
1 นาที
std. sigma
std. sigma


B
เริ่มต้น
1 นาที
sucrose /peptone
วันที่ 7
sucrose /peptone
วันที่ 7


C
เริ่มต้น
1 นาที
sucrose /peptone
วันที่ 8
sucrose /peptone
วันที่ 8

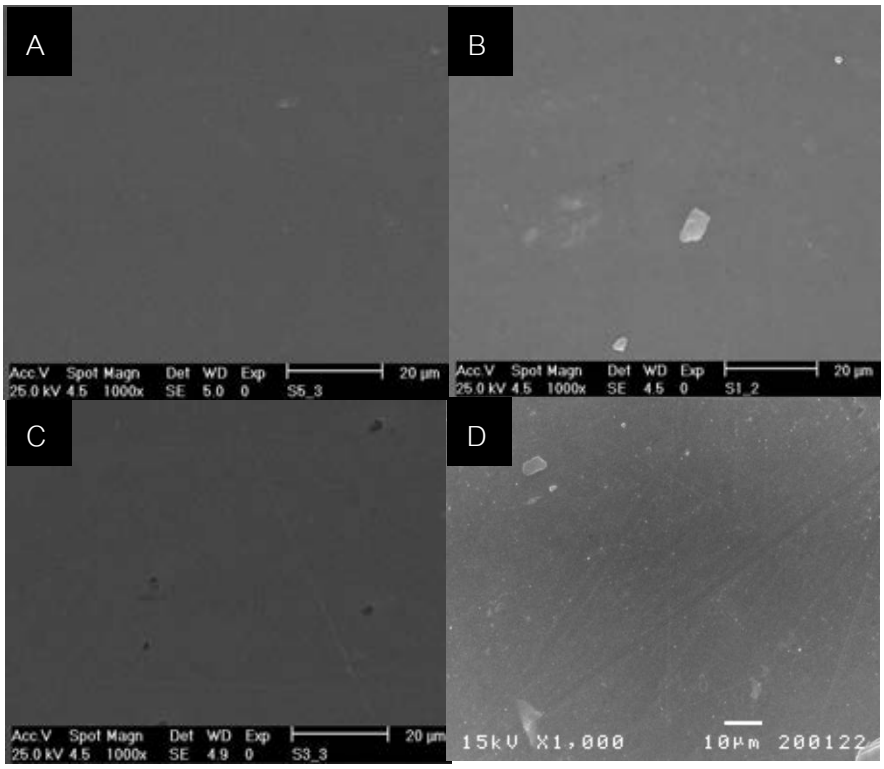




ภาพที่ 19 การทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มพูลลูแลน (A) พูลลูแลนฟิล์มมาตรฐาน sigma (B) พูลลูแลนฟิล์มซูโครส/เปปโตน วันที่ 7 (C) พูลลูแลนฟิล์มซูโครส/เปปโตน วันที่ 8 (D) พูลลูแลนฟิล์ม ซูโครส /เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมซูโครส /เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม วันที่ 5 (E) พูลลูแลนฟิล์มซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม วันที่ 7

5.3 การศึกษาลักษณะพื้นผิวของ ฟิล์มพูลลูแลนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด

จากการศึกษา ลักษณะพื้นผิวของ ฟิล์มพูลลูแลนจากตัวอย่างชนิดต่างๆ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าฟิล์มพูลลูแลนมีพื้นผิวที่เรียบในทุกตัวอย่าง ยกเว้น ในกรณีของฟิล์มตัวอย่างที่ได้จากอาหารสูตร ซูโครส/เปปโตนที่มีน้ำมันมะกอก พบลักษณะของหลุมตื้นกระจายทั่วไปที่ผิวฟิล์ม ภายหลังเมื่อนำไปแต่เมื่อนำฟิล์มดังกล่าว ไปล้างด้วยอะซิโตน ทำให้ลักษณะดังกล่าว หายไป ทั้งนี้เป็นผลมาจาก การที่มีน้ำมันมะกอกที่ตกค้างใน สารพูลลูแลน เมื่อทำการทำแห้งฟิล์มทำให้มน้ำมันมะกอกระเหยออกไปจึงทิ้งร่องรอยหยดน้ำมันที่ผิวฟิล์ม เมื่อทำการล้างออกด้วยอะซิโตนจึงไม่พบลักษณะของร่องหลุมดังกล่าว (ดังภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 ลักษณะพื้นผิวของพูลลูแลนฟิล์มโดยภาพถ่ายแบบส่องกราด (A) ภาพถ่ายพูลลูแลนฟิล์ม sigma ที่กำลังขยาย 1000x (B) ภาพถ่ายพูลลูแลนฟิล์มของอาหารสูตร ซูโครส/เปปโตนที่กำลังขยาย 1000x (C) ภาพถ่ายพูลลูแลนฟิล์มของอาหารสูตรซูโครส /เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมที่กำลังขยาย 1000x (D) ภาพถ่ายพูลลูแลนฟิล์มของอาหารสูตรซูโครส /เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมผ่านการล้างด้วยอะซิโตนที่กำลังขยายที่กำลังขยาย 1000x

บทที่ 5

การอภิปรายผลการวิจัย

5.1 ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณสูง

จากการศึกษาเชื้อ *A. pullulans* ที่ผลิตพูลลูแลนได้ปริมาณ มากจำนวน 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ CU17 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 30.07±0.35 กรัมต่อลิตร CU20 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 32.7±0.20 กรัมต่อลิตร CU24 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 31.90±0.20 กรัมต่อลิตร CU44 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78±0.120 กรัมต่อลิตร และCU45 ให้น้ำหนักพูลลูแลนสูงสุดที่ 23.49±0.11 กรัมต่อลิตร เลือกสายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้มากที่สุดจำนวน 2 สายพันธุ์คือ CU20 และ CU44 มาศึกษาต่อไป

5.2 ศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

จากการศึกษาการเจริญของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU20 และ CU44 พบว่าระยะเวลาการเจริญในแต่ละช่วงไม่แตกต่างกัน เราจึง เลือกสายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ดีที่สุดคือสายพันธุ์ CU44 มาศึกษาต่อไป

5.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

5.3.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของชนิดแหล่งคาร์บอน เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิต ได้แก่นำไปสร้างสารประกอบต่างๆเพื่อการเจริญเติบโต และนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อทำหน้าที่ต่างๆ ในการดำรงชีวิต จากการศึกษา Prasongsuk และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตพูลลูแลนที่คัดแยกได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน พบว่าเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตพูลลูแลนดีที่สุด Punnapayak และคณะ (2003) ศึกษาการแยก *Aureobasidium pullulan*ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย 3 สายพันธุ์ พบว่าสามารถผลิตพูลลูแลนได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน Gaur and Banjan (2010) ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลนพบว่า ฟรุคโตส ให้ปริมาณพูลลูแลนมากเป็นอันดับสามรอง จาก

ซูโครสและกลูโคส จึงสนใจนำแหล่งคาร์บอนจำนวน 3 ชนิดคือ ซูโครส กลูโคส และ ฟรุคโตส มาศึกษา แหล่งคาร์บอน ที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลน จากการศึกษา พบว่าที่ชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ มีผลต่อการผลิตพูลลูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU44 เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตสูงสุดที่ 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตต่ำสุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 8.73±0.11 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Prasongsuk และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตพูลลูแลนที่คัดแยก ได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน พบว่าเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตพูลลูแลนดีที่สุด โดยเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRM2 สอดคล้องกับ Leathers และคณะ (1988) ศึกษา *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 พบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ เหมาะสมที่สุด และสอดคล้องกับ Gaur and Banjan (2010) ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลน *A. pullulans* สายพันธุ์ RG-5 พบว่าเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตพูลลูแลนดีที่สุดเช่นกัน

5.3.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของชนิดของ แหล่งไนโตรเจน เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารที่มีความจำเป็นเพื่อใช้ในการสร้างส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ และมีความจำเป็นในกิจกรรมของเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต จากการศึกษา Prasongsuk และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตพูลลูแลนที่คัดแยกได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน พบว่าเมื่อใช้ เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลผลิตพูลลูแลนดีที่สุด Punnapayak และคณะ (2003) ศึกษาการแยก *Aureobasidium pullulan*ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย 3 สายพันธุ์ พบว่าสามารถผลิตพูลลู แลนได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน Gaur and Banjan (2010) ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลนพบว่า โซเดียมไนเตรท ให้ปริมาณพูลลูแลนมากรองจาก แอมโมเนียมซัลเฟต และ Thirumavalavan และคณะ (2009) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลน โดย *A. pullulans* สายพันธุ์ MTCC 2195 พบแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิดที่ให้ผลผลิตพูลลูแลนปริมาณสูง คือ แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท และยีสต์สกัด จึงสนใจนำแหล่งไนโตรเจนจำนวน 4 ชนิด คือ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท มาศึกษา แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลน พบว่าที่ชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ มีผลต่อการผลิต

พูลลูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 เมื่อใช้ เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลผลิตสูงสุดที่ 35.78 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตต่ำสุดเมื่อใช้โพแทสเซียมไนเตรท 12.57 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Prasongsuk และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตพูลลูแลนที่คัดแยกได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน พบว่าเมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลผลิตพูลลูแลนดีที่สุด โดยเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRM2

5.3.3 ศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน

จากการศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่อการผลิตพูลลูแลนพบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆ มีผลต่อการผลิตพูลลูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 เมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 234:1 ให้ผลผลิตพูลลูแลนสูงสุดที่ 35.78 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตต่ำสุดเมื่อใช้อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 59:1 ให้ผลผลิตพูลลูแลนที่ 0.30 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Prasongsuk และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตพูลลู แลนที่คัดแยกได้จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน พบว่าอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ ใช้ตรงกับสูตรอาหารของวิจัยให้ผลผลิตพูลลูแลนดีที่สุดโดยเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRM2

5.3.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลน เนื่องจาก pH มีความสำคัญต่อความเป็นประโยชน์ของธาตุอาหาร กิจกรรมของเอนไซม์ และมีผลต่อประจุของโปรตีนของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีผลต่อเนื่องถึงความสามารถในการดูดซับสารอาหารเข้าสู่เซลล์ พบว่าที่ระดับ pH เริ่มต้นต่างๆ มีผลต่อการผ ลิตพูลลูแลนของเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 เมื่อใช้ pH เริ่มต้น 6.5 ให้ผลผลิตสูงสุดที่ 35.78 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตต่ำสุดเมื่อใช้ pH เริ่มต้น 7.0 ให้ผลผลิตพูลลูแลนที่ 10.74 กรัมต่อลิตร โดย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Prasongsuk และคณะ (2007) ศึกษาการผลิต พูลลูแลนที่คัดแยกได้จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน พบว่าใช้ระดับ pH เริ่มต้นที่ 6.5 ให้ผลผลิตพูลลูแลนปริมาณมากโดยเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRM2 สอดคล้องกับงานวิจัยของ West และ Hamer (1993) ได้ศึกษาถึงผลของ pH ต่อการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 พบว่าระดับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพูลลูแลนคือที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 แต่จากงานวิจัยของ Thirumavalavan และคณะ (2009) ได้

ศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ MTCC 2195 พบว่าที่ระดับ pH เริ่มต้น 7.0 เป็นระดับ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพูลลูแลน และจากงานวิจัยของ Youssef และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลกระทบของ pH ต่อการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ P 56 พบว่าที่ระดับ pH เริ่มต้น 7.5 เป็นระดับ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพูลลูแลน จากการศึกษาผลของ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพูลลูแลนทำให้ทราบว่า ชนิดของสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อระดับ pH ต่างๆ

5.3.5 **ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม**

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลน เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อระยะเวลาของอัตราการเจริญ และผลผลิต พบว่าที่อุณหภูมิต่างๆ มีผลต่อการผลิตพูลลูแลนของเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 เมื่อใช้ที่อุณหภูมิห้อง (30±2) ให้ผลผลิตสูงสุดที่ 35.78 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตต่ำสุดเมื่อใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตพูลลูแลนที่ 2.51 กรัมต่อลิตร โดยสอดคล้องกับงาน วิจัยของ Prasongsuk และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตพูลลูแลนที่คัดแยกได้จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน พบว่า ใช้ที่อุณหภูมิห้อง (30±2) ในการผลิตพูลลูแลนเช่นกันโดยเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRM2

5.3.6 **ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมที่เหมาะสม**

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของอาห ารเสริมชนิดต่างๆ เนื่องจากใน อาหารเสริม มีวิตามินต่างๆ รวมทั้งกรดไขมัน ซึ่งวิตามินมีหน้าที่เกี่ยวข้องในการเร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์โดยทำหน้าที่เป็น coenzyme หรือเป็นส่วนประกอบของ coenzyme ที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ ที่เหมาะสม และกรดไขมันต่างๆ ยังช่วยให้เชื้อมีการเจริญได้ดีและมากขึ้น จากการศึกษ าพบว่าระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมชนิดต่างๆ มีผลต่อการผลิตพูลลูแลนของเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 คือเมื่อเติมอาหารเสริม น้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ให้ผลผลิตพูลลูแลนสูงสุดที่ 42.08 กรัมต่อลิตร และให้พูลลูแลนต่ำสุดที่ 3.14 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Roukas (1999) ได้ทำการศึกษาการผลิตพูลลูแลนจากของเสียโรงงานเบียร์ โดย *A. pullulans* ในงานทดลองทำการศึกษาผลของการเติมแหล่งอาหาร โดยพบว่าในสูตรปกติที่ไม่ได้เติมแหล่งอาหารเสริมให้ปริมาณพูลลูแลน 6.0±0.3 กรัมต่อลิตร เมื่อ

เติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตร ให้ปริมาณพูลลูแลน 8.5±0.3 กรัมต่อลิตร

5.4 วิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

5.4 วิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

5.4.1 วิเคราะห์โครงสร้างของพูลลูแลน

จากการศึกษาการวิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 พบว่าเมื่อนำพูลลูแลน และฟิล์มจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 ที่เลี้ยงโดยอาหารสูตรซูโครส/เปปโตน และอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี (FTIR และ H^1-NMR) เปรียบเทียบกับสาร พูลลูแลนมาตรฐานจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถระบุได้ว่า สารที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 คือสารพูลลูแลน

5.4.2 วิเคราะห์ความหนืดของพูลลูแลน

จากการศึกษาวิเคราะห์ความหนืดของพูลลูแลนจากอาหาร 2 สูตร ที่แตกต่างกันคือเลี้ยงด้วยอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน และอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน ที่เติ มน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมพบว่า ค่าความหนืด (cP) มีแนวโน้มลดลงในทั้งสองสูตรอาหาร เมื่อทำการเก็บสารพูลลูแลนที่ได้ จนถึงวันที่ 9 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Prasongsuk และคณะ (2005) ที่ศึกษาลักษณะของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้โดย *A. pullulans* ซึ่งคัดแยกได้ในประเทศไทย และพบว่าค่าความหนืดของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์ BK6 และ NRM2 มีแนวโน้มลดลงโดยในวันที่ 3 ให้ค่าสูงกว่าในวันที่ 7

5.4.3 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน

จากการศึกษาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลู แลนจากอาหาร 2 สูตร ที่แตกต่างกันคือเลี้ยงด้วยอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน และอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม พบว่าน้ำหนักโมเลกุลมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น คือในวันที่ 1 ถึงวันที่ 9 ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับ Manitchotpisit และคณะ (2009) ศึกษาลักษณะของ *A. pullulans* โดย

เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร standard PM บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 วัน พบว่า มีแนวโน้มลดลง และสอดคล้องกับ Prasongsuk และคณะ (2005) ที่ศึกษาลักษณะของเอ็กโซพอลิแซ็กคา ไรด์ที่ผลิตได้โดย *A. pullulans* ซึ่งคัดแยกได้ในประเทศไทย พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์ BK6 และ NRM2 น้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์มีแนวโน้มลดลงโดยในวันที่ 3 ให้น้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าในวันที่ 7

5.4.4 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ เทียบกับพูลลูแลนมาตรฐานจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 มีความไวต่อเอนไซม์ pullulanase ที่ร้อยละ 87.57 ความไวต่อเอนไซม์ α-amylase ที่ร้อยละ 0.53 ความไวต่อเอนไซม์ glucoamylase ที่ร้อยละ 42.66 และความไวต่อเอนไซม์ cellulase เป็น 0 จากการศึกษาของ Leathers (1988) พบว่าการปนเปื้อนเม็ดสีของพูลลูแลนมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ pullulanase จากการศึกษาพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 ไม่มีการปนเปื้อนของเม็ดสีความไวต่อเอนไซม์ pullulanase ที่ได้จึงอยู่ที่ร้อยละ 87.57 จากการศึกษาของ Leathers (2003) พบว่าโครงสร้างพูลลูแลนมีลักษณะคล้ายแป้ง ดังนั้นจึงพบความไวต่อเอนไซม์ α-amylase และ glucoamylase เนื่องจาก เอนไซม์ pullulanase มีความจำเพาะต่อพันธะแอลฟา-(1-6) จึงสามารถตรวจวัดมอลโตไตรโอสได้ ซึ่งพบในโครงสร้างของพูลลูแลน Bender และ Wallenfels (1961) เอนไซม์อะไมเลสมีความจำเพาะต่อพันธะแอลฟา -1,4 ของมอลโตเตรตราโอสซึ่งพบแบบซ่ำในโครงสร้างของพูลลูแลน เอนไซม์ glucoamylase มีความจำเพาะต่อปลายสาย (non-reducing end) ของพันธะแอลฟา -1,4 และพันธะแอลฟา -(1-6) Catley และคณะ (1986) และ เอนไซม์ cellulase จำเพาะต่อพันธะแอลฟา-1,3 ซึ่งไมพบในโครงสร้างของพูลลูแลน

5.4.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาทดสอบกิจกรรมของเอนไ ซม์อะไมเลสของพูลลูแลนจากอาหาร 2 สูตร ที่แตกต่างกันคือเลี้ยงด้วยอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน และอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมโดยดูความแตกต่างทั้ง 9 วัน พบว่าในอาหารสูตร ซูโครส /เปปโตนเริ่มมี

กิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 6 คือ 0.31 ยูนิตต่อไมโครลิตร โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 9 คือ 1.39 ยูนิตต่อไมโครลิตร ในอาหารสูตร ซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม เริ่มมีกิจกรรมของเอนไซม์ในวันที่ 7 คือ 1.54 ยูนิตต่อไมโครลิตร ถึงวันที่ 9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 3.08 ยูนิตต่อไมโครลิตร โดยในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ จะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับ Fogarty และ Kelly (1980) พบ α-amylase ใน แบคทรีเรีย รา พืชและสัตว์ โดย α-amylase สามารถย่อยที่บริเวณน้ำตาล มอลโตเตตราโอส (maltotetraose) ซึ่งอยู่ในโมเลกุลของพูลลูแลน โดยมีอยู่ในปริมาณน้อยและอยู่อย่างสุ่มในโครงสร้าง และมีรายงานว่าเอนไซม์อะไมเลสส่งผลกระทบต่อคุณภาพของพูลลูแลนที่ผลิตได้ เนื่องจาก การย่อยสลายของเอนไซม์อะไมเลสจะมีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนลดลง (Leathers, 2003; Prasongsuk และคณะ 2007)

5.5 ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

5.5.1 ทดสอบสมบัติทางการภาพของของฟิล์มพูลลูแลน

เมื่อนำฟิล์มพูลลูแลน ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 มาทำการ ทดสอบสมบัติเชิงกล (tensile properties) ประกอบด้วยค่า ความเค้นหรือการทนต่อแรงดึงและความยืดหยุ่นของฟิล์ม พบว่า ฟิล์มพูลลูแลนที่ได้จากอาหารสูตรซูโครส/เปปโตน ที่มีน้ำมันมะกอกที่วันที่ 5 มีค่าเท่ากับ 12.004 kgf/mm^2 ซึ่งเป็นค่าที่สูงสุดในกลุ่มฟิล์มตัวอย่างที่ ได้จากการผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 และยังมีค่าใกล้เคียงกับฟิล์มพูลลูแลนมาตรฐาน (12.656 kgf/mm^2) ในขณะที่ความหยืดหยุ่นของฟิล์มพบว่าฟิล์มพูลลูแลนที่มีเปอร์เซ็นต์การยืดตัว สูงสุดเท่ากับร้อยละ 12.260 ได้จาก ฟิล์มพูลลูแลน ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 จากอาหารสูตรซูโครส/เปปโตน ผสมหารเสริมน้ำมันมะกอกที่วันที่ 5

ซึ่งผลการทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึงพบว่ามีความสัมพันธ์กับค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยที่น้ำหนักโมเลกุลสูง ขึ้นฟิล์มที่ได้มี ค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงสูงขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของLazaridou และคณะ (2002) ที่ได้ทำการศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลต่อการขึ้นรูปฟิล์มและสมบัติความแข็งแรงต่อแรงดึง พบว่าน้ำหนักโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงต่อแรงดึง

5.5.2 ทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มที่ผลิต

จากการศึกษาทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มพูลลูแลนที่ผลิตพบว่า ในทุกตัวอย่างฟิล์มพูลลูแลน เกิดการบวมตัวและสลายกลายเป็นเจลได้หมดภายในเวลา 1 นาที

5.5.3 ศึกษาลักษณะพื้นผิวของพูลลูแลนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด

จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวของพูลลูแลนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราดพบว่าฟิล์มพูลลูแลนจากอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน มีลักษณะพื้นผิวเรียบ แต่ฟิล์มพูลลูแลนที่ผลิตจากอาหารสูตรซูโครส/เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมมีลักษณะของหลุมตื้นที่ผิวฟิล์มแต่เมื่อล้าง ฟิล์มด้วยอะซิโตน พบว่าลักษณะดังกล่าวลดลง ทั้งนี้เนื่องจากน้ำมันมะกอกที่ตกค้างในพูลลูแลนถูกชะล้างออกไป

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

6.1 ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ในปริมาณสูง

จากการศึกษาเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ที่ผลิตพูลลูแลนได้ปริมารมากที่สุดจำนวน 2 สายพันธุ์คือ CU20 และ CU44 นำมาศึกษาการเจริญแล้วจึงเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตพูลลูแลนได้ดีที่สุดคือสายพันธุ์ CU44 มาศึกษาต่อไป

6.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

จากการศึกษา ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลน พบว่า เมื่อใช้ ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน ที่ 234:1 ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง และอาหารเสริมที่เหมาะสมคือน้ำมันมะกอกที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ให้ผลผลิตพูลลูแลนสูงสุดที่ 42.08 กรัมต่อลิตร

6.4 วิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

6.4.1 วิเคราะห์โครงสร้างของพูลลูแลน

จากการศึกษาการวิเคราะห์สมบัติของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 พบว่าเมื่อนำพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 ที่เลี้ยงโดยอาหารสูตร ซูโครส/เปปโตน และอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม และพูลลูแลนมาตรฐานจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ทางสเปกโตรสโกปี (FTIR และ ^{1}H NMR) สามารถสรุปได้ว่าสารที่ผลิตได้ จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 เป็นสารพูลลูแลนบริสุทธิ์

6.4.2 วิเคราะห์ความหนืดของพูลลูแลน

จากการศึกษาวิเคราะห์ความหนืดของพูลลูแลนจากอาหาร 2 สูตร ที่แตกต่างกัน คือเลี้ยงด้วยอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน และอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมพบว่าค่าความหนืด (cP) มีแนวโน้มลดลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้น

6.4.3 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลน

จากการศึกษาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนจากอาหาร 2 สูตร ที่แตกต่างกันคือเลี้ยงด้วยอาหารสูตรซูโครส/เปปโตน และอาหารสูตรซูโครส/เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมพบว่า ที่อาหารสูตรซูโครส /เปปโตนที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริม สามารถผลิตได้พูลลูแลนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าที่ อาหารสูตรซูโครส /เปปโตน และพบว่าที่เวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลพูลลูแลนมีค่าลดลง

6.4.4 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ เทียบกับพูลลูแลนมาตรฐานจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 มีความไวต่อเอนไซม์ pullulanase ที่ร้อยละ 87.57 ความไวต่อเอนไซม์ α-amylase ที่ร้อยละ 0.53 ความไวต่อเอนไซม์ glucoamylase ที่ร้อยละ 42.66 และความไวต่อเอนไซม์ cellulase เป็น 0

6.4.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของพูลลูแลนจากอาหาร 2 สูตร ที่แตกต่างกันคือเลี้ยงด้วยอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน และอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมโดยดูความแตกต่างทั้ง 9 วัน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีปริมาณน้อย

6.5 ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

6.5 **ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก** *A. pullulans* **สายพันธุ์เขตร้อน**

6.5.1 ทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มที่ผลิต

จากการศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ CU 44 พบว่ามีความสัมพันธ์กับค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยที่น้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้นฟิล์มที่ได้มีค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงสูงขึ้นด้วย

6.5.2 ทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มที่ผลิต

จากการศึกษาทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มพูลลูแลนที่ผลิตพบว่า ในทุกตัวอย่างฟิล์มพูลลูแลน เกิดการบวมตัวและสลายกลายเป็นเจลได้หมดภายในเวลา 1 นาที

6.5.3 ศึกษาลักษณะพื้นผิวของพูลลูแลนโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด

จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวของพูลลูแลนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราดพบว่าฟิล์มพูลลูแลนจากอาหารสูตรซูโครส /เปปโตน มีลักษ ณะพื้นผิวเรียบ และ ฟิล์มพูลลูแลนที่ผลิตจากอาหารสูตรซูโครส/เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมมี ลักษณะของหลุมตื้นที่ผิวฟิล์ม เมื่อล้างฟิล์มด้วยอะซิโตนลักษณะดังกล่าวลดลง

6.6 ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาพบว่าพูลลูแลนและฟิล์มพูลลูแลนที่ผลิตจากอาหารสูตรซูโครส/ เปปโตน ที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมให้ผลการทดลองดีที่สุด แต่ควรศึกษาหาวิธีกำจัดน้ำมันมะกอกที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงออกจากอาหารเพาะเลี้ยงก่อนนำไปตกตะกอนพูลลูแลน
เพื่อประสิทธิภาพในการขึ้นรูปฟิล์มต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สีหนาท ประสงค์สุข . การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพพูลลูแลนและการประยุกค์ใช้ . *วารสารวิทยาศาสตร์ มข*. 2552.3: 268-274.

ภูริสา ทัศวิล, อรพิน เกิดชูชื่น และณัฐบา เลาหกุลจิตต์. *คุณลักษณะของฟิล์มประกอบbiopolymer จากแป้งและเพคติน*. ว. วิทย์. กษ. 41(3/1)(พิเศษ) (2553): 597-600.

ภาษาอังกฤษ

Barnett, C., Smith, A., Scanlon, B. and Israilides, C.J. 1999. Pullulan production by *Aureobasidium pullulans* growing on hydrolysed starch waste. *Carbohydrate Polymers* 38: 203-209

Boa, J. M., and LeDuy, A. 1984. Peat hydrolysate medium optimization for pullulan production. *Applied Environmental Microbiology*. 48:26-30.

Berry, D. R. 1998. Extracellular polysaccharides. *Physiology of Industrial Fungi*. 146-149.

Catley. B. J., and Whelan, W. J.. A minor structural feature of pullulan. *Biochem Journal*. 1966. 5P-8P.

Catley, B. J. 1971. Utilization of carbon source by Pullularia pullulans for the elaboration of extracellular polysaccharides. *Appl Microbiol*. 4: 641-649.

Cooke, W. B. 1959. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) arnaud. *Journal of Mycopathologia et Mycologia applicata* 17: 1-43.

De Hoog, G. S., et al. 1999. Relationship of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8s and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology* 43: 31-37.

Dennis, C. and Buhagiar, R. W. M. 1973. Comparative study of *Aureobasidium*

pullulans, *A. prunorum* sp. Nov. and *Trichosporon pullulans*. *Journal of Transactions British Mycological Society* 60: 567-575.

Deshpande, M. S., Rale, V. B. and Lynch, J. M. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. *Journal of Enzyme Microbial Technology* 14: 514-527.

Domsch, K. H., Gams, W., and Anderson, T. H. *Compendium of soil fungi.* Volume I. London: Academic Press. 1993.

Fogarty, W. M,, and Kelly, C. T. 1980. Amylases, amyloglucosidases and related glucanases. In Rose AH (ed), *Economic Microbiology, Microbial Enzymes and Bioconversions*, pp.115–170.

Hermanides-Nijhof, E. J. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology* 15: 141-166.

Hitchcock, C. A., Pye, G. W., Troke, P. F., Johnson, E. M. and Warnock, D. W. 1993. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37: 1962-1965.

Hoog GS de and Yurlova NA. 1994. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium and Hormonema.* Antonievan Leeuwenhoek. 65:41-54.

Imshenetskii, A. A., Kondrat'eva, T.F., and Smut'ko, A.N. 1981. Influence of the acidity of the medium, condition of areration, and temperature on pullulan biosynthesis by polyploidy strain of *Pullularia* (*Aureobasidium*) *pullulans*. *Microbiology*. 50(3): 471-475.

Jirapeangtong, K., Siriwatanayothin, S., Chiewchan, N.2008. Effects of coconut sugar and stabilizing agents on stability and apparent viscosity of high-fat coconut milk. *Journal of Food Engineering*. 87: 422-427

Kachouri, F., and Hamdi, M. 2003. Enhancement of polyphenols in olive oil by contact with fermented olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochemistry*. 39: 841-845.

Kristo, E., Biliaderis, C. G., and Zampraka. 2007. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate Pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beewax lamination. *Food Chemistry.* 101: 753- 764.

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.

Lazaridou, A., Biliaderis, C. G. and Kontogiorgos, V. 2002. Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydrate Polymers*. 52: 151-166.

Leathers, T. D. 2003. Bioteahnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol*. 62: 468-473.

Leathers, T. D. and Gupta, S. C. 1994. Production of pullulan from fuel ethanol byproducts by *Aureobasidium* sp. Strain NRRL Y-12,974. Biotecnology Letters. 16: 1163-1166.

Leathers, T. D., Nofsinger, G. W., Kurtzman, C. P. and Bothast, R. J. 1988. Pullulan production by color variants of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industial Microbiology*. 3: 231-239.

LeDuy, A., and Boa, J. M. 1983. Pullulan production from peat hydrolysate. Canadian *Journal of Microbiology*. 29: 143-146.

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

Manitchotpisit, P., Leathers, T. D., Peterson, S. W., Kurtzman, C. P., LI, X. L., Eveleigh, D. E., Lotrakul, P., Prasongsuk, S., Vermillion, K. E. and Punnapayak, H. 2009. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans. Mycological Research.* 113: 1107-1120.

Mcnail, B., and Kristiansen,B., and Seviour, R.J. 1989. Polysaccharide production and morphology of by *Aureobasidium pullulans* in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 33:1210-1212.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.

Nimal Ratnayake, W. M., and Sarwar Gilani, G. 2004. Nutritional and health effects of dietary fats. *Pakistan Journal of Nutrition*. 4: 205–212.

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

Pollock, T. J., Thorne, L. and Armentrout, R. W. 1992. Isolate of new *Aureobasidium pullulans* strains that produce high-molecular-weight pullulan with reduced pigmentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 877-883.

Prasongsuk, S., Berhow, M. A., Dunlap, C. A., Weisleder, D., Leathers, T. D., Eveleigh, D. E., and Punnapayak, H. 2007. Pullulan production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology.* 34: 55-61.

Prasongsuk, S., Sullivan, R. F., Kuhirun, M., Eveleigh, D. E. and Punnapayak, H. 2005. Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 21: 393-398.

Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S. and Pichayangkura, S. 2003. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 30: 89-94.

Ramos, S. and Acha, I. G. 1975. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. *Journal of Transactions British Mycological Society*. 64: 129-135.

Reed-Hamer. B. and West. T. P. 1994. Effects of complex nitrogen sources on pullulan production relative to carbon source. *Microbiology*. 80: 83-90.

Reeslev, M., Strom, T., Jensen, B. and Olsen, J. 1997. The ability of yeast from of *Aureobasidium pullulans* to elaborate exopolysaccharide in chemostat culture at various pH values. *Mycological Research*. 101: 650-652.

Reeslev, M., Jorgensen, B.B., and Jorgensen,O B. 1993. Influence of Zn^{2+} on yeast-mycelium dimorphism and exopolysaccharide production by the fungus *Aureobasidium pullulans* grown in a defined medium in conditions culture. *Journal of General Microbiology*. 139:3065- 3070.

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

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.

Sena, R. F., Costelli, M. C., Gibson, L. H. and Coughlin R. W. 2006. Enhanced production of pullulan by two strains of *A. pullulans* with different concentrations of soybean oil in sucrose solution in batch fermentations. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 23: 507-515.

Seviour, R. J., and Kristiansen, B. 1983. Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *European Journal of Applied Microbiology Biotechnology*. 17:178-181.

Shigemori, H., Tenma, M., Shimazaki, K. and Kobayashi, J. 1998. Three new metabolites from the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Natural Products*. 61: 696-698.

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

Takeo, K. and Hoog, G. S. 1991. Karyology and hyphal characters as taxonomic criteria in Ascomycetous black yeasts and related fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*. 60: 35-42.

Teramoto, M. and Shibata, M. 2006. Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. *Carbohydrate Polymers.* 63: 476-481.

Thirumavalavan, K., Manikkadan, T. R. and Dhanasekar, R. 2009. Pullulan production from coconut by-products by *Aureobasidium pullulans*. *African Journal of Biotechnology*. 8: 254-258.

Ueda, S., Fujita, K., Komatsu, K. and Nakashima, Z.I. 1963. Polysaccharide produced by the genus *Pullularia* I. Production of polysaccharide by growing cells. *Applied Microbiology.* 11:211-215.

West T. P. and Reed-Hamer B. 1991. Ability of Aureobasidium pullulans to synthesize pullulan upon selected sources of carbon and nitrogen. *Microbios* 67 117-24.

Yuen, S. 1974. Pullulan and its applications. *Process Biochemistry*. 9: 7-9.

Yurlova, N. A., Hoog, G. S. and Gerrits van den Ende, A. H. G. 1999. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology*. 43: 63-69.

Zajic, J. E., and LeDuy, A. 1973. Flocculant and chemical properties of a polysaccharide from *Aureobasidium pullulans*. *Applied Microbiology*. 25:328-635.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Yeast Malt Agar (YMA)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นวุ้นด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมวุ้น จากนั้นนำไปต้มจนวุ้นละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Yeast Malt Broth (YMB)

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร YMA แต่ไม่เติมวุ้น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Production Medium

น้ำตาลซูโคส	5%
เปปโตน	0.06%
K_2HPO_4	0.1%
$MgSO_4.7H_2O$	0.5%
NaCl	0.1%
ยีสต์สกัด	0.04%

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่นตามลำดับ ปรับปริมาตรตามต้องการ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1.การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Somogyi-Nelson

สารเคมี

1.1 Somogyi

Somogyi I :

Na_2SO_4	288	กรัม
Potassium tartrate	24	กรัม
Na_2CO_3	48	กรัม
$NaHCO_3$	32	กรัม

ละลาย Na_2SO_4 288 g ในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มให้เดือดแล้วปริมาตร 1,000 ml เติม Potassium tartate 24 g , Na_2CO_3 48 g และ $NaHCO_3$ 32 g ลงไป ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มแล้ว ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 ml เก็บไว้ในขวดสีชา

Somogyi II :

Na_2SO_4	72	กรัม
CuSO4.5H2O	8.0	กรัม

ละลาย Na_2SO_4 72 g ในน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มให้เดือดแล้ว ปริมาตร 300 ml เติม CuSO4.5H2O 8.0 g ปรับปริมาตรให้เป็น 400 ml ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการต้มให้เดือดแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

ผสม Somogyi I และ Somogyi II ในอัตราส่วน 4 : 1 โดยปริมาตรก่อนใช้ในแต่ละครั้ง

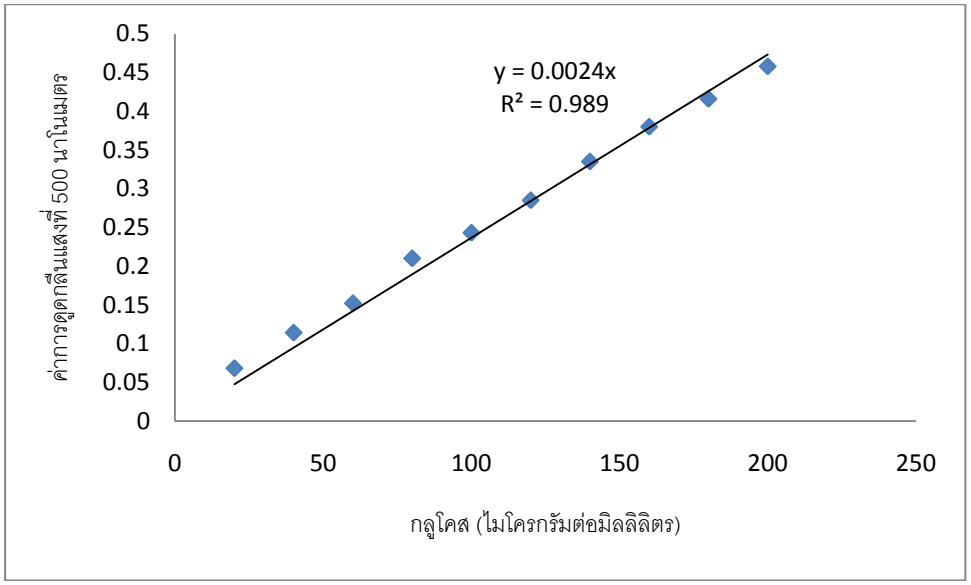
1.2 Nelson

$(NH_4)_2\ MnO_4$	100	กรัม
$Na_2HAsO_4.7H_2O$	12	กรัม

ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท($(NH_4)_2MnO_4$) 100 g ในน้ำกลั่น 1,800 ml เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 84 ml หลังจากนั้นเติมสารละลายของโซเดียมไฮโดรเจนอาซิเนท ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) 12 g ที่ละลายในน้ำ 100 ml เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ก่อนการนำไปใช้

การสร้างกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

การสร้างกราฟน้ำตาลไซโลสมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 20 40 60 80 100 120 140 160 180 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร เติม Somogyi reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปตั้งในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันที เติม Nelson reagent หลอดละ 1 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 ปริมาณกลูโคสมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 20 – 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

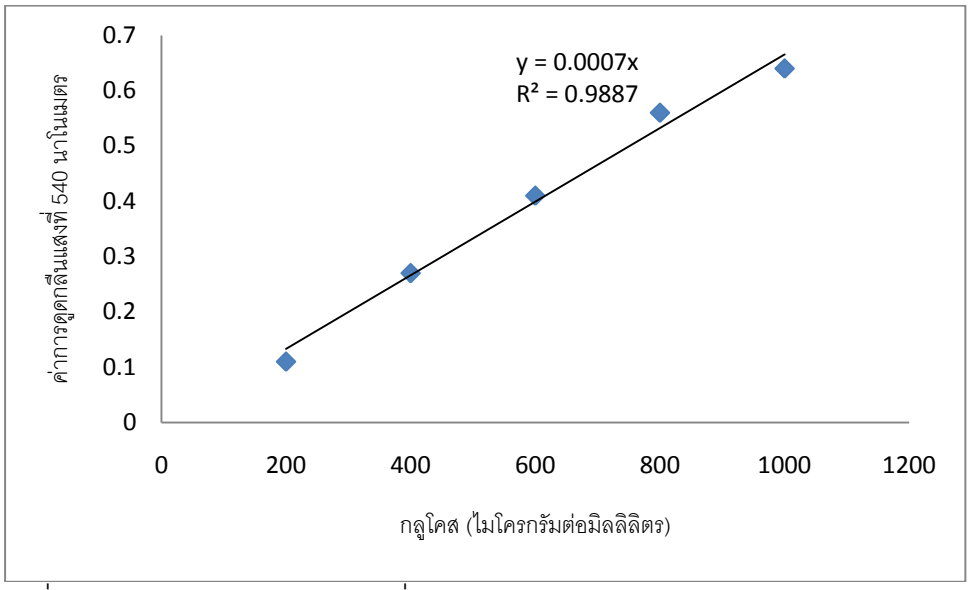
2. สารละลาย DNS

3,5 Dinitrosalicylic acid	0.9	กรัม
NaOH	1.6	กรัม
โปแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต	28.22	กรัม

สารละลาย DNS 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 3,5 Dinitrosalicylic acid 0.9 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) 1.6 กรัมและโปแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate) 28.22 กรัม เก็บในขวดสีชาหรือในที่ทึบแสง อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถใช้งานได้เป็นเวลา 1 อาทิตย์

การสร้างกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

การสร้างกราฟน้ำตาลไซโลสมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติม DNS reagent หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปตั้งในน้ำเดือด 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 21)

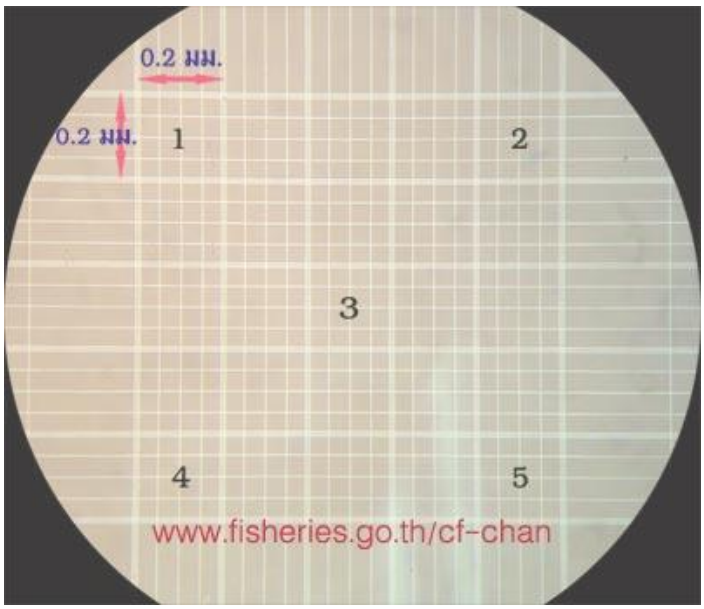


รูปที่ 21 ปริมาณกลูโคสมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 200 – 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

1. การนับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยวิธี Direct Microscopic Count โดยใช้ Haemacytometer

Haemacytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการนับสปอร์ของราหรือจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ได้ Haemacytometer เป็นสไลด์มีช่องแบ่งไว้เป็นตาราง เมื่อปิดด้วย cover glass ซึ่งใช้เฉพาะกับอุปกรณ์จะทำให้ มีความลึกระหว่างตัวสไลด์กับ cover glass ทำให้บรรจุของเหลวซึ่งมีตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนไว้ได้ ขีดแบ่งจะแบ่งออกเป็นช่องสี่เหลี่ยมจตุรัส 25 ช่อง แต่ละช่องมีขนาด 0.2 x 0.2 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งภายในแต่ละช่องจะแบ่งย่อยออกเป็น 16 ช่องเล็ก แต่ละช่องมีขนาด 0.05 x 0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นเมื่อปิดทับสไลด์ด้วย cover glass ซึ่งใช้ เฉพาะกับอุปกรณ์นี้ ของเหลวที่บรรจุอยู่จึงมีปริมาตรเท่ากับ 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร



ในการนับจำนวนเซลล์ควรเจือจางเซลล์ให้มีปริมาณที่สามารถนับได้สะดวกและแม่นยำไม่เจือจางหรือหนาแน่นจนเกินไป ในการนับให้หยดน้ำตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ลงบน Haemacytometer แล้วปิดทับด้วย cover glass จากนั้นนำไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้านับจากช่องใหญ่ควรนับอย่างน้อย 5 ช่อง

วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก)		=	0.1	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่		=	X	เซลล์
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก		=	Y	เซลล์
นั่นคือ	X	=	16Y	เซลล์

ดังนั้น

ใน 0.1 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด X x 25 หรือ Y x 16 x 25 เซลล์

ใน 1.0 ลบ.มม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด X x 25 x10 หรือ Y x 16 x 25 x 10 เซลล์

ใน 1 ลบ.ซม. มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด X x 25 x10 x 1000 หรือ Y x 16 x 25 x 10 x 1000 เซลล์

หรือเท่ากับ $X \times 25 \times 10^4$ หรือ $4Y \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ปริศนา มังสา เกิดเมื่อวันที่ 15 ธันวาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัด สระบุรี สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชา ชีววิทยา ประยุกต์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ในปีการศึกษา 2552 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญา วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี การศึกษา 2552 สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2554

ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

ขณะศึกษา ได้รับทุน สนับสนุนการทำวิจัยจาก ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 2/2555 ภาคปลาย ปีการศึกษา2555 จากบัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเสนอผลงาน

Mangsa, P., Prasongsuk S., Siraleartmukul, K., Lotrakul, P., Punnapayak, H. 2012. OPTIMIZATION OF BIOPOLYMER PULLULAN FROM A HIGH-YIELDING STRAIN OF *AUREOBASIDIUM PULLULANS*. In Proceeding of The 1st Asean Plus Three Graduate Research Congress: 414. The Empress Convention Center Chiang Mai, Thailand. March 1-2, 2012.