

การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน
และการขึ้นรูปฟิล์ม

นางสาวพันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร

มหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

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.

**PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM A TROPICAL
STRAIN OF *Aureobasidium pullulans* AND ITS FILM CASTING**

Miss Pantakarn Unhapattaratitikul

**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 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กไคด

กลาไรด์จาก *Aureobasidium*

pullulans สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม

โดย นางสาวพันชกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.

. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.

. สีหนาท ประสงค์สุข

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร. กฤษณา ศิริเลิศมกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ ถนนแก้ว)

พันธกานต์ อุณหภัทรจิตติกุล : การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม (PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM A TROPICAL STRAIN OF *Aureobasidium pullulans* AND ITS FILM CASTING) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร.พงษ์ชาริน โล่ห์ตระกูล, อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ. ดร.สีหนาท ประสงค์สุข, 115 หน้า

การศึกษาการใช้แหล่งอาหาร (nutrient assimilation) ของ *Aureobasidium pullulans* NRRL 58539 และ NRRL 58543 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่ไม่ใช่พุลลูแลน (non pullulan, NP-EPS) พบว่าทั้งสองสายพันธุ์ใช้แหล่งอาหารคล้ายคลึงกัน และสามารถใช้เมทิลแอลฟาดีกลูโคส (methyl- α -D-glucose) และแลคโตส (lactose) เป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นเดียวกับ *A. pullulans* var. *pullulans* NRRL 58560 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิงที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่เป็นพุลลูแลน สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ Internal Transcribed Spacer (ITS) Large Subunit Ribosomal DNA gene (LSU) และ Elongase gene (ELO) ด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากบริเวณ ITS ของ *A. pullulans* NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีขนาด 1,293 และ 1,076 คู่เบส ตามลำดับ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับที่มีรายงานไว้ ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากบริเวณ LSU มีขนาด 841 และ 670 คู่เบส และมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Aureobasidium* sp. HB110 และ *A. pullulans* isolate Z-19 ที่ 99 และ 87 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ในขณะที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ELO ได้ เมื่อศึกษาการเติบโตและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าการเติบโตในแต่ละช่วงของ *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกัน และมีการผลิต NP-EPS สูงที่สุดในช่วง stationary phase จากการทดสอบความไวของ NP-EPS ต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่า NP-EPS มีความไวต่อเอนไซม์ บีตา กลูคาเนส แต่ต้านทานต่อเอนไซม์ที่ย่อยพันธะแอลฟา เช่น พุลลูแลเนส อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ซึ่งคล้ายคลึงกับออบาซิแคน และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ด้วยวิธีอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (FT-IR) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) ชนิด ^1H และ ^{13}C พบว่า NP-EPS เป็นบีตาไกลูแคนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับออบาซิแคน สำหรับภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้ดีที่สุดในอาหารสูตร PM ที่มีซูโครสความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับโซเดียมไนเตรท 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้นที่ 7.5 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน โดยมีผลผลิตสูงสุดที่ 14.72 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่ไม่ผ่านการปรับองค์ประกอบถึง 6.06 เท่า นอกจากนี้พบว่า NP-EPS มีผลในการส่งเสริมการเติบโตของแบคทีเรียโพรไบโอติก 2 ชนิด คือ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ได้มากถึง 6.9 และ 5.1 เท่า ตามลำดับ และเมื่อนำ NP-EPS ผสมลงในฟิล์มพุลลูแลน พบว่า ค่าความทนต่อแรงดึง เปอร์เซ็นต์การยืดตัว และสมบัติการละลายของฟิล์มมีแนวโน้มลดลง เมื่อความเข้มข้นของ NP-EPS สูงขึ้น

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่อ นิสิต.....
ปีการศึกษา.....2555.....ลายมือชื่อ อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ลายมือชื่อ อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

##5272711023: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD IS: aubasidan / Response surface methodology (RSM) / Prebiotic activity / Polysaccharide film

PANTAKARN UNHAPATTARATITIKUL : PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM A TROPICAL STRAIN OF *Aureobasidium pullulans* AND ITS FILM CASTING. ADVISOR : ASST. PROF. PONGTHARIN LOTRAKUL, Ph.D., CO-ADVISOR : ASST. PROF. SEHANAT PRASONGSUK, Ph.D., 115 pp.

Nutrient assimilation profiles of *Aureobasidium pullulans* NRRL 58539 and NRRL 58543, both are non-pullulan exopolysaccharide (NP-EPS) producing strains, were similar to one another and also to that of the pullulan-producing reference strain, *A. pullulans* NRRL 58560. All 3 strains could assimilate methyl- α -D-glucoside and lactose as the sole carbon source. For nucleotide sequence analysis, 3 loci including Internal Transcribed Spacer (ITS) Large Subunit Ribosomal DNA gene (LSU) and Elongase gene (ELO) were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The ITS PCR products of *A. pullulans* NRRL 58539 and NRRL 58543 were 1,293 and 1,076 bp long, respectively, and they were identical to those previously reported. The LSU PCR products were 841 and 670 bp long, respectively, and their nucleotide sequences were similar to those of *Aureobasidium* sp. HB110 and *A. pullulans* isolate Z-19 with 99 and 87% nucleotide sequence identity, respectively. However, the ELO locus was failed to be amplified. For enzyme sensitivity test, both NP-ESPs from NRRL 58539 and NRRL 58543 were found to be sensitive to β -glucanase digestion, but resistant to α -bond hydrolyzing enzymes such as pullulanase, amylase and glucoamylase which were similar to aubasidan. The structural analysis using FT-IR and ^1H - and ^{13}C -NMR also suggested that both NP-EPSS were an aubasidan-like β -glucan. For the optimal condition for the NP-EPS production by *A. pullulans* NRRL 58543, the maximal yield at 14.72 ± 0.03 g/L, 6.06-fold higher than that of the unmodified condition, was obtained from the production medium containing 6% (w/v) sucrose 0.06% (w/v) sodium nitrate, with initial pH at 7.5, incubation temperature at 25°C and 9-day production period. Moreover, the NP-EPS was found to enhance the growth of 2 probiotic bacteria, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*, up to 6.90- and 5.10-fold, respectively. When it was incorporated into pullulan film, the addition of NP-EPS trended to decrease the tensile strength, elongation and solubility of the film.

Field of Study.....Biotechnology.....Student's Signature.....
 Academic Year :.....2012.....Advisor's Signature
 Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบ
ขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงศ์ธาริน โฉมทรัพย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่าง
สูงที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุมพล คุณวาสิ หัวหน้าภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่
กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. กฤษณา ศิริเลิศมุกด ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบ
วิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า ที่กรุณาเป็นกรรมการในการ
สอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พรเทพ ถนนวนแก้ว ที่กรุณาเป็นกรรมการ
(ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัย
การใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช บุคลากรใน
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ขอกราบระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ผู้วางรากฐานให้โอกาสทางการศึกษา
และญาติพี่น้องผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา ทำ
ให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนจากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต
ครั้งที่ 2/2555 ภาคปลาย ปีการศึกษา 2554 บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โครงการ
ส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการ
การอุดมศึกษา (EN281B) และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	22
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	23
3.4.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะระดับโมเลกุลของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	23
3.4.2 การศึกษาลักษณะระดับโมเลกุลของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	24
3.4.3 ศึกษาการเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	27
3.4.4 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	28
3.4.5 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS จาก <i>A. pullulans</i>	29
3.4.6 การทดสอบสมบัติของ NP-EPS ในการกระตุ้นการเติบโตของ <i>L. acidophilus</i> และ <i>L. casei</i>	31

	หน้า
3.4.7 ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์เขต ร้อน.....	31
4.ผลการวิจัย.....	33
4.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะระดับโมเลกุลของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	33
4.2 ศึกษาการเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	42
4.3 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	46
4.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS จาก <i>A. pullulans</i>	60
4.5 การทดสอบสมบัติของ NP-EPS ในการกระตุ้นการเติบโตของ <i>L. acidophilus</i> และ <i>L. casei</i>	66
4.6 ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์เขต ร้อน.....	67
5.การอภิปรายผลการวิจัย.....	70
5.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะระดับโมเลกุลของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	70
5.2 ศึกษาการเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	73
5.3 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	73
5.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS จาก <i>A. pullulans</i>	75
5.5 การทดสอบสมบัติของ NP-EPS ในการกระตุ้นการเติบโตของ <i>L. acidophilus</i> และ <i>L. casei</i>	77
5.6 ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ เขตร้อน.....	79

6.สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	81
6.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะระดับโมเลกุลของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	81
6.2 ศึกษาการเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	81
6.3 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	82
6.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS จาก <i>A. pullulans</i>	83
6.5 การทดสอบสมบัติของ NP-EPS ในการกระตุ้นการเติบโตของ <i>L. acidophilus</i> และ <i>L. casei</i>	83
6.6 ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์เขต ร้อน.....	83
ข้อเสนอแนะ.....	84
รายการอ้างอิง.....	85
ภาคผนวก.....	100
ภาคผนวก ก.....	103
ภาคผนวก ข.....	106
ภาคผนวก ค.....	111
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	115

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> และการนำไปใช้ประโยชน์.....	8
2	สรุปหลักการจำแนกลักษณะเฉพาะของ varieties <i>pullulans</i> และ <i>aubasidani</i>	11
3	ไพโรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS LSU และ ELO.....	26
4	สถานะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS LSU และ ELO.....	26
5	ช่วงของระดับคาร์บอน และไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลอง.....	30
6	ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 NRRL 58543 และ NRRL 58560 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร mineral medium ที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เปอร์เซ็นต์กรัมคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการเติบโตโดยการนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 0 3 และ 5.....	34
7	ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 NRRL 58543 และ NRRL 58560 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร mineral medium ที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์กรัมไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการเติบโตโดยการนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 0 3 และ 5.....	36
8	ลำดับเบสบริเวณ ITS ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	38
9	ลำดับเบสบริเวณ LSU ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543.....	39
10	Nucleotide sequence identity (%) ระหว่างลำดับเบสบริเวณ ITS ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 กับลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด 5 อันดับ.....	40

ตารางที่	หน้า
11	Nucleotide sequence identity (%) ระหว่างลำดับเบสบริเวณ LSU ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 กับลำดับเบสในฐานข้อมูล Genbank ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด 5 อันดับ..... 41
12	น้ำหนักแห้ง NP-EPS และน้ำหนักแห้งเซลล์ ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และ เปปโตน 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน..... 43
13	ความไวของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ต่อเอนไซม์ pullulanase α -amylase glucoamylase และ β -glucanase เปรียบเทียบกับเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดออบาซิเดนที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58013 พูลูลูแลนมาตรฐาน (Sigma และ Hayashibara) และพูลูลูแลนที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58560..... 47
14	หมู่ฟังก์ชัน และตำแหน่งพิกหลักซึ่งได้จาก FTIR สเปกตราของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 NRRL 58543 NRRL 58560 และ NRRL 58013 เปรียบเทียบกับพูลูลูแลนมาตรฐาน..... 48
15	ตำแหน่งพิกหลักซึ่งได้จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของพูลูลูแลน... 56
16	ตำแหน่งพิกหลักซึ่งได้จาก $^{13}\text{C-NMR}$ สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซ-พอลิแซ็กคาไรด์..... 58
17	น้ำหนักแห้ง NP-EPS (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักแห้งเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอน (5.0% (w/v)) และแหล่งไนโตรเจน (0.06% (w/v)) ชนิดต่าง ๆ โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน..... 61
18	แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนองต่อปัจจัยศึกษาที่ได้ (น้ำหนัก NP-EPS) สำหรับการศึกษาค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และ ไนโตรเจนที่เหมาะสมของการผลิต NP-EPS โดย <i>A. pullulans</i> NRRL 58543..... 62

ตารางที่	หน้า
19	ผลของค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นต่อน้ำหนัก NP-EPS และการเติบโตของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรท 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 9 วัน..... 64
20	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต NP-EPS และการเติบโตของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรท 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้นเป็น 7.5 เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน..... 66
21	ผลของ NP-EPS ต่อการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก <i>L. acidophilus</i> และ <i>L. casei</i> 67
22	Tensile strength และเปอร์เซ็นต์ elongation ของฟิล์มพอลิเมอร์ที่เติม NP-EPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 69
23	สมบัติการละลายน้ำของฟิล์มพอลิเมอร์ที่เติม NP-EPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 69
24	Nucleotide sequence identity (%) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>A. pullulans</i> variety ต่างๆ ในฐานข้อมูล Genbank..... 113
25	Nucleotide sequence identity (%) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ <i>A. pullulans</i> variety ต่างๆ ในฐานข้อมูล Genbank..... 114

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	วงชีวิตของ <i>Pullularia pullulans</i> (<i>A. pullulans</i>) ในระยะต่างๆ	6
2	โครงสร้างของพุลลูแลน.....	7
3	ภาพแสดงชั้นของพอลิแซ็กคาไรด์บนผนังเซลล์ด้านนอกของ <i>Aureobasidium pullulans</i> ...	10
4	โครงสร้างของ β -1,3-1,6-glucan ที่ผลิตได้จากการหมักจุลินทรีย์.....	13
5	โครงสร้างของ β -1,3-1,4-glucan ที่ผลิตจากข้าวฟ่าง.....	13
8	การเติบโตของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงใน ในอาหารสูตร PM เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 9 วัน.....	42
9	การเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 ในอาหารสูตร PM เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....	44
10	การเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน.....	45
11	FT-IR spectrum ของ NP-EPS ที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539.....	49
12	FT-IR spectrum ของ NP-EPS ที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543.....	50
13	FT-IR spectrum ของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดออบาซิแดนที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58013.....	51
14	FT-IR spectrum ของพุลลูแลนที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58560.....	52
15	FT-IR spectrum ของพุลลูแลนพุลลูแลนมาตรฐาน Sigma Chemical, USA.....	53

รูปที่	หน้า
16	FT-IR spectrum ของพอลิกลูแลนมาตรฐาน Hayashibara Co., Ltd., Japan..... 54
17	¹ H-NMR spectrum ของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 เปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL58013..... 57
18	¹³ C-NMR spectrum ของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 เปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL58013..... 59
19	ภาพพื้นผิวตอบสนองแสดงอัตราส่วนระหว่างซูโครส และ โซเดียมไนเตรท ต่อน้ำหนักของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543 ซึ่งสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุดในที่ความเข้มข้นของซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ โซเดียมไนเตรท 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v)..... 63
20	พอลิกลูแลนฟิล์มที่เติม NP-EPS ความเข้มข้นต่างๆ..... 68
21	กราฟมาตรฐานกลูโคส..... 108
22	วิธีการเจือจางเชื้อเริ่มต้น โดยทำเป็นลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial dilution)..... 111
23	ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาถูกโซพอลิเมอร์เรสบริเวน ITS และ LSU ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 56 และ 59 องศาเซลเซียส ตามลำดับ..... 112

บทที่ 1

บทนำ

Aureobasidium pullulans เป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถผลิตสารสำคัญต่างๆ เช่น โปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) (Deshpande และคณะ, 1992) สารต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. (Takesako และคณะ, 1991 และ 1993; Lotrakul และคณะ, 2009) และเอนไซม์หลายชนิด เช่น อะไมเลส โปรติเอส ไลเปส เอสเทอร์เรส เพคติเนส และ เฮมิเซลลูเลส เป็นต้น (Leathers, 2002; Chi และคณะ, 2009) *A. pullulans* สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่เรียกว่า พูลูลูแลน (pullulan) ซึ่งพูลูลูแลนประกอบด้วย น้ำตาลมอลโตไตรโอส หรือ มอลโตเตตระโอสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1, 4 (α -1, 4 linkages) และพันธะแอลฟา 1, 6 (α -1, 6 linkages) นอกจากนี้ยังสามารถผลิต poly (β -L-malic acid) หรือ PMA ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hydrophilic polyester ที่ละลายน้ำ จึงสามารถประยุกต์เป็นตัวนำส่งยา (drug delivery) ได้ (Nagata และคณะ, 1993)

นอกจากพูลูลูแลน ออบาซิแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์อีกชนิดที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ของ *A. pullulans* บางสายพันธุ์ โดยมีโครงสร้างเป็นกลูแคน (glucan) ที่ต่อกันด้วยพันธะบีตา 1, 3 (β -1, 3 linkages) และมี side chain ที่ต่อด้วยพันธะบีตา 1,6 (β -1, 6 linkages) และมีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นพันธะแอลฟา 1, 4 (α -1, 4 linkages) (Yurlova และ De Hoog, 1997) จึงจัดเป็นบีต้ากลูแคนชนิดหนึ่ง ออบาซิ - แคนเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายน้ำยาก และไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ มีเคลอริตี้ต่ำ สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ มีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ มีคุณสมบัติในการเชื่อมติด (adhesive property) จึงนิยมใช้เป็นสารยึดเกาะ (Pitichkina และคณะ, 1994) และนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม และเครื่องสำอาง เป็นต้น

พรีไบโอติก (prebiotic) คือสิ่งที่มนุษย์รับประทานเข้าไปแล้วถูกทำลายผ่านมาที่ลำไส้ส่วนล่าง โดยไม่ถูกย่อย หรือดูดซึมในทางเดินอาหารส่วนบน มักเป็นพวกน้ำตาล เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharides) เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น บีต้ากลูแคน ซึ่งทำหน้าที่ส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ใหญ่ที่ก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (Collins และ Gibson, 1999) นอกจากนี้ยังช่วยลดอาการท้องผูก รักษาสมดุลน้ำและเกลือแร่ในร่างกาย และช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสีอีกด้วย (Bengmark, 2005) มีรายงานการศึกษาหลายฉบับที่

แสดงให้เห็นว่า บีต้ากลูแคนจากพืช ยีสต์ และเห็ดราหลายชนิด สามารถทำหน้าที่เป็นพรีไบโอติกที่ดีคือ สามารถกระตุ้นการเติบโตของ แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ได้ (Gardiner, 2000; Mitsou และคณะ, 2010 และ Snart, 2006)

สำหรับในประเทศไทย มีรายงานการคัดแยก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน หลายสายพันธุ์จาก แหล่งอาศัยที่แตกต่างกัน (Punnapayak และคณะ, 2003; Prasongsuk และคณะ, 2005; Manitchotpisit และคณะ, 2009; Lotrakul และคณะ, 2009) โดยที่บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ไซแลเนส และ พูลลูแลนได้ในปริมาณมาก Manitchotpisit และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทาง พันธุกรรมของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนเหล่านี้ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS IGS1 *EF-1 α* *BT2* และ *RPB2* ร่วมกับความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ และการผลิตเอนไซม์ไซแลเนส จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า สามารถจัดกลุ่ม สายพันธุ์เหล่านี้ออกเป็น 12 กลุ่ม (clade) โดยพบว่าในกลุ่มที่ 12 ซึ่งประกอบด้วย สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกลุ่มอื่นๆมาก และเมื่อตรวจสอบ โครงสร้างของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทั้งสองสายพันธุ์นี้ผลิตโดย Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) พบว่ามีโครงสร้างที่แตกต่างกับพูลลูแลนมาตรฐาน เนื่องจากไม่พบพันธะ แอลฟา 1, 4 และพันธะแอลฟา 1, 6 และได้รายงานว่าเป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่ไม่ใช่พูลลูแลน (non pullulan, NP-EPS) และยังสรุปว่า สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 นี้ อาจไม่ใช่ *Aureobasidium* ชนิด *A. pullulans*

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งทำการศึกษาลักษณะสมบัติทางสรีรวิทยาและลักษณะระดับโมเลกุล บางประการของ *Aureobasidium* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 เช่น การใช้แหล่งอาหาร ร่วมกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งใหม่ ที่อาจช่วยในการจัดจำแนกชนิด ตลอดจนวิเคราะห์ โครงสร้าง NP-EPS ที่ผลิตโดยทั้ง 2 สายพันธุ์และหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต นอกจากนี้ยังศึกษา การประยุกต์ใช้ NP-EPS ดังกล่าว โดยวัดสมบัติการเป็นพรีไบโอติก และ สมบัติในการขึ้นรูปฟิล์ม อีก ด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการผลิต NP-EPS จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูป ฟิล์ม

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะระดับโมเลกุลของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543
2. ศึกษาการเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543
3. วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543
5. ศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของ NP-EPS จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543
6. ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตและระบุชนิดของ NP-EPS ที่ผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอนาคตได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota มีลักษณะคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) มีชื่อสามัญว่า “ยีสต์ดำ” (black yeast) เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ได้ในระหว่างการเติบโต ทำให้โคโลนีมีสีดำ เดิมมีการจัดจำแนกอยู่ใน Class Deuteromycetes (Fungi imperfecti) Order Moniliales Family Dermatiaceae (Cooke, 1959; Ramos และ Acha, 1975) มีชื่อเรียกหลายชื่อด้วยกัน เช่น *Dermatium pullulans* *Pullularia pullulans* *A. vitis* และ *P. fermentans* เป็นต้น (Cooke, 1959; Ramos และ Acha, 1975; Hermanides-nijhof, 1977) *A. pullulans* มีรูปร่างได้หลายลักษณะ (polymorphic) ประกอบด้วย บลาสโตสปอร์ (blastospore) เซลล์พอง (swollen cell) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เส้นใยแท้ (hyphae) หรือ เส้นใยเทียม (pseudohyphae) เป็นต้น (Ramos และ Acha, 1975) ทั้งนี้การเกิด เซลล์รูปร่างต่างๆ มักจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเป็นสำคัญ ปัจจุบันมีการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของ *A. pullulans* ไว้ ดังนี้ (Yurlova และคณะ, 1999; De Hoog และคณะ, 1999)

Kingdom Fungi

Phylum Ascomycota

Class Dothideomycetes

Order Dothideales

Family Dothideaceae

Genus *Aureobasidium*

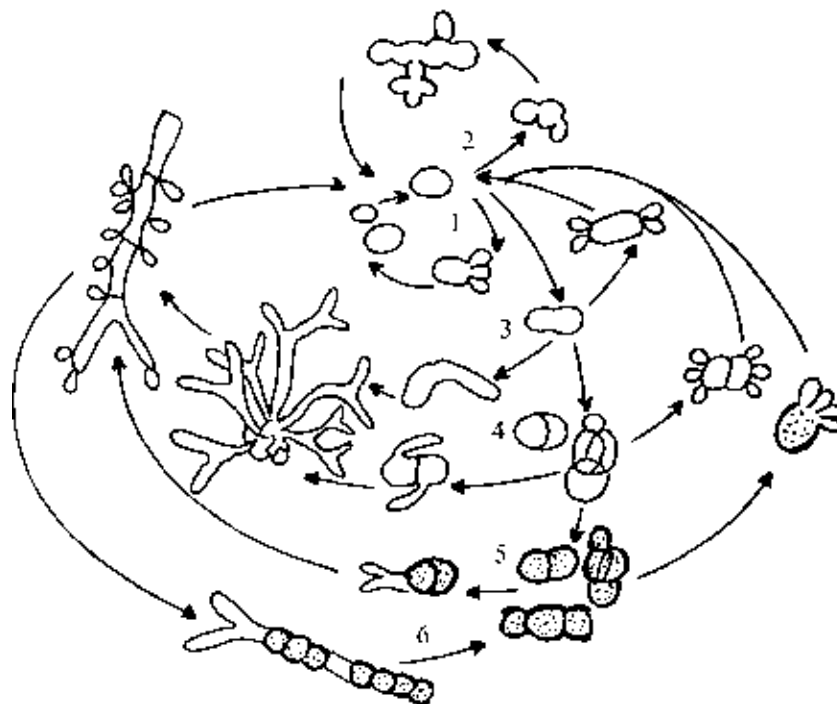
Species *Aureobasidium pullulans*

การจัดจำแนก *A. pullulans* แต่เดิมนั้น ใช้หลายวิธีประกอบกัน ทั้งทางสัณฐานวิทยา และ สรีรวิทยา เช่น ลักษณะของโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (Hermanides-nijhof, 1977) การใช้แหล่งอาหาร ชนิดต่างๆ (substrate utilization) การสร้างเมลานิน (Dennis และ Buhagiar, 1973) การสร้างโคนิเดีย (conidiogenesis) ภาวะการก่อสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ (De Hoog

และ Yurlova, 1994) และลักษณะของเส้นใย (Takeo และ De Hoog, 1991) เป็นต้น ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ร่วมในการจัดจำแนก ซึ่งทำให้การจัดจำแนกมีความสะดวกขึ้น สามารถแยกความแตกต่างได้ในระดับชนิด (species) เทคนิคที่นิยมใช้ได้แก่ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) เป็นต้น (Yurlova และคณะ, 1999; Punnapayak และคณะ, 2003)

เมื่อ *A. pullulans* เติบโตบนอาหารกึ่งแข็ง Malt extract agar (MEA) เป็นเวลา 7 วัน โคลินีของ *A. pullulans* จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 มิลลิเมตร ลักษณะโคลินีเรียบ และเป็นเมือกมันวาว มีสีครีมหรือชมพูอ่อนในระยะแรกที่เกิดขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป โคลินีจะเปลี่ยนแปลง มีลักษณะเหมือนกำมะหยี่ และเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นหรือเปลี่ยนเป็นสีอื่น เช่น สีเขียวมะกอก สีแดง เหลือง น้ำตาลอ่อน และดำ เป็นต้น มีเส้นใยสั้นๆ ขึ้นรอบๆ โคลินี ลักษณะของเส้นใยเรียบ โปร่งใส เห็นผนังกันชัดเจน ความกว้างเส้นใยประมาณ 3-12 ไมโครเมตร เมื่อเลี้ยงนานขึ้นอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้ม และมีผนังเซลล์หนาขึ้น เรียกว่าเป็น คลาไมโดสปอร์มีการสร้างโคนีเดียจากภายใน (endoconidia) ด้านข้าง หรือปลายของเส้นใย (Hermanides-nijhof, 1977) ลักษณะโคนีเดียปฐมภูมิ (primary conidia) เป็นเซลล์เดี่ยว ค่อนข้างกลม โปร่งใส ผนังเรียบ มีรูปร่างหลากหลาย และมีขนาดแตกต่างกัน มักสร้างโคนีเดียทุติยภูมิ (secondary conidia) ขนาดเล็ก หรือ budding cell โดยอาจสร้าง secondary conidia ขนาดเล็กหลายเซลล์โดยยังติดอยู่กับเซลล์แม่ มีรูปร่างคล้ายกับนิ้วมือ และเมื่อ secondary conidia หลุดออกไป ในบางเซลล์อาจปรากฏแผลจากการหลุดออกของโคนีเดีย (bud scar) (Hermanides-nijhof, 1977; Domsch และคณะ, 1993) (รูปที่ 1)

A. pullulans มีแหล่งที่อยู่ที่หลากหลายในธรรมชาติ เช่น บนผิวใบพืช และผลไม้ ในดิน (Ramos และ Acha, 1975) เศษฟาง หญ้าแห้ง (Cooke, 1959) หรือในสถานที่ที่มีความชื้นสูง เช่น ผนังห้องน้ำ (Prasongsuk และคณะ, 2005) หรือแม้แต่ในฟองน้ำทะเล (Shigemori และคณะ, 1998) เป็นต้น *A. pullulans* พบได้ทั้งในแถบประเทศเขตร้อน เช่น บราซิล อินเดีย มาเลเซีย และจาไมกา แถบประเทศเขตอบอุ่น เช่น เยอรมนี แคนาดา เดนมาร์ก เนเธอร์แลนด์ ออสเตรีย อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา หรือในเขตแห้งแล้ง เช่น อียิปต์ อิรัก ปากีสถาน และ อัฟริกาใต้ รวมทั้งในเขตขั้วโลกเหนือ เช่น นอร์เวย์ (Zalar และคณะ, 2008) Wickerham และ Kurtzman (1975) ได้รายงานถึง



รูปที่ 1 วงชีวิตของ *Aureobasidium pullulans* ในระยะต่างๆ (Romos และ Acha, 1975)

วงชีวิตที่ 1 บลาสโตสปอร์เกิดการแตกหน่อได้บลาสโตสปอร์ใหม่

วงชีวิตที่ 2 บลาสโตสปอร์สร้างชูโคไมซีเลียมแบบไม่มีผนังกั้น (aseptate)

วงชีวิตที่ 3 บลาสโตสปอร์เปลี่ยนเป็นเซลล์พอง และเริ่มสร้างเส้นใย

วงชีวิตที่ 4 บลาสโตสปอร์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์พอง และเซลล์พองเริ่มสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น เปลี่ยนเป็นคลาไมโดสปอร์

วงชีวิตที่ 5 คลาไมโดสปอร์เริ่มสร้าง germ tubes และเส้นใย

วงชีวิตที่ 6 เส้นใยสร้างเมิร์ดิส และผนังเซลล์ให้หนาขึ้น

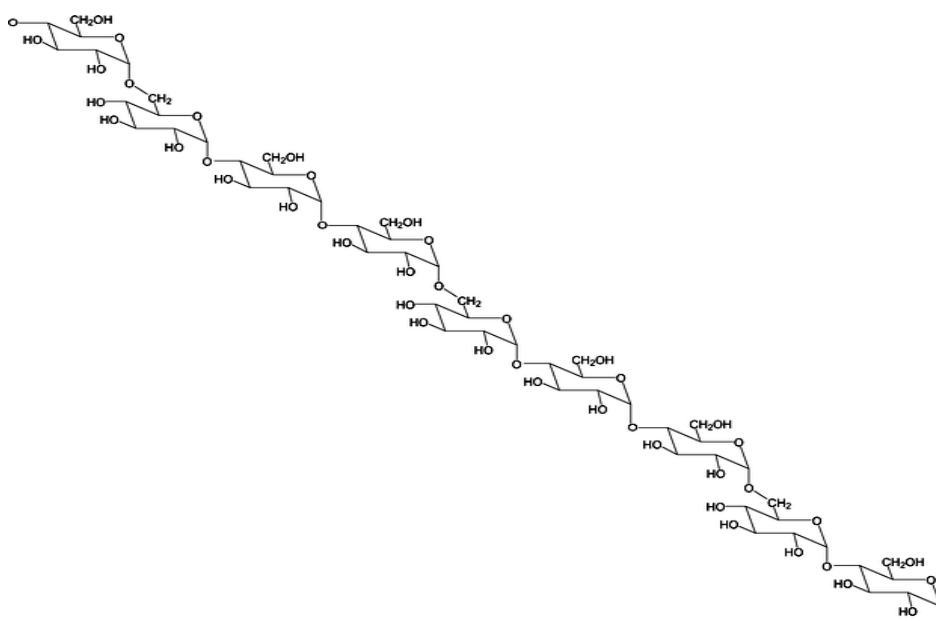
สายพันธุ์ color variant ของ *A. pullulans* ว่าเป็นสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากบริเวณเขตร้อน สามารถสร้างเมิร์ดิสชนิดอื่นๆ ที่ไม่สร้างเมิร์ดิสดำ ซึ่งจะได้โคโลนีเป็นสีแดง เหลือง ส้ม หรือ สีม่วง นอกจากนี้ Leathers (1984) ได้รายงาน ว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ color variant จะสามารถผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้ในปริมาณมาก

สำหรับในประเทศไทย มีรายงานว่ามี การคัดแยก *A. pullulans* ได้จากอากาศ (airborne) (Punnapayak และคณะ, 2003) เขตป่าสนเขา บนผิวน้ำ (Prasongsuk และคณะ, 2005;

Manitchotpisit และคณะ, 2009) ผนังห้องน้ำ และผนังทาลี (Prasongsuk และคณะ, 2005; Lotrakul และคณะ, 2009)

A. pullulans มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการใช้ประโยชน์จาก *A. pullulans* ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) (Deshpande และคณะ, 1992) การนำ *A. pullulans* มาใช้ในการผลิตสารต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus spp.* (Lotrakul และคณะ, 2009) นอกจากนี้ *A. pullulans* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น อะไมเลส โปรติเอส ไลเปส เอสเทอร์เรส เพคติเนส และ เฮมิเซลลูเลส เป็นต้น (Leathers, 2002; Chi และคณะ, 2009)

นอกจากนี้ *A. pullulans* ยังเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายจากความสามารถในการผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพที่เรียกว่า พูลลูแลน (pullulans) ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ขณะเพาะเลี้ยง พูลลูแลน ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตไตรโอส หรือ มอลโตเตตระโอสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1, 4 (α -1,4 linkages) และพันธะแอลฟา 1, 6 (α -1, 6 linkages) (รูปที่ 2) ซึ่งพอลิเมอร์ดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมสิ่งทอ และงานทางด้านอิเล็กทรอนิกส์ (Chi และ คณะ, 2009) (ตารางที่ 1)



รูปที่ 2 โครงสร้างของพูลลูแลน (ที่มา: Leather, 2003)

ตารางที่ 1 ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* และการนำไปใช้ประโยชน์ (Chi และคณะ, 2009)

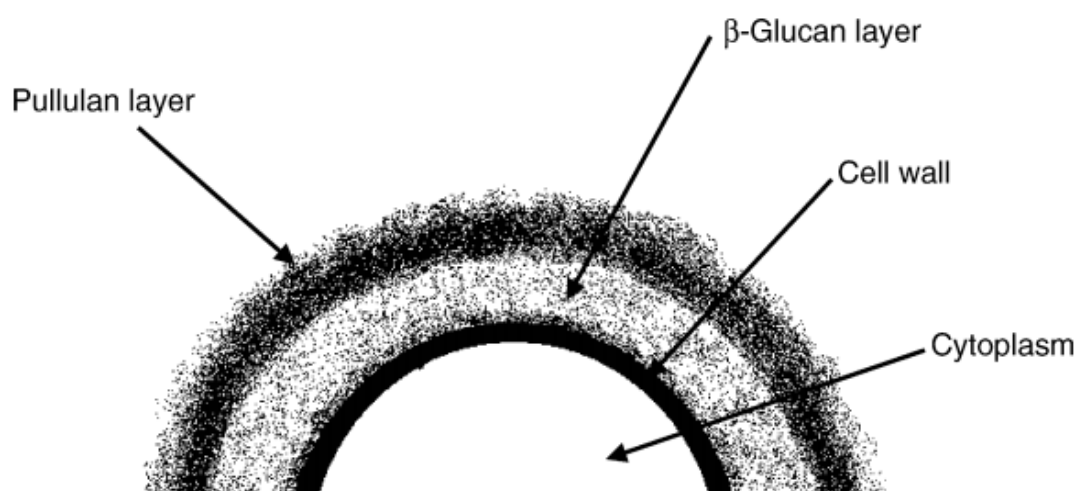
ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ	การประโยชน์	อ้างอิง
พุลูลแลน	ฟิล์มหรือเส้นใยที่ออกซิเจนไม่สามารถผ่านได้ สารที่ทำให้หนาและมีความยืดหยุ่น สารยึดติด หรือสารห่อหุ้ม สารผสมในอาหารที่มีแคลอรีต่ำ สารป้องกันการตกตะกอนของเลือด สารต้านไวรัส ใช้เป็นวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมทางด้านสารเคมี	Duan และคณะ, 2008
อะไมเลส	ใช้ในกระบวนการทำให้แป้งเป็นของเหลวและเปลี่ยนเป็นน้ำตาล สารล้างน้ำแป้งออกในอุตสาหกรรมผ้า สารเติมในผลิตภัณฑ์ซักล้าง ใช้ในการผลิตเอทานอล ใช้วิเคราะห์ในทางการแพทย์และคลินิก ใช้ผลิตน้ำเชื่อมฟรุกโทส ใช้ในการผลิตยีสต์ เซลล์เดี่ยว และจุลชีพอื่นๆ	Chi และคณะ, 2001
เซลลูเลส	ปรับปรุงเส้นใยเซลลูโลส สารฟอกนิ่ม สารผสมสารซักฟอก ผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว และเชื้อเพลิงชีวภาพ บำบัดของเสีย	Gupta และคณะ, 2003
ไลเปส	ใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยาหลายชนิด เช่น ไฮโดรไลซิส อินเตอร์-เอสเทอร์รีฟิเคชัน แอลกอฮอล์ไลซิส อะซิโดไลซิส เอสเทอร์รีฟิเคชัน และอะมิโนไลซิส สารที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล	Hasan และคณะ, 2006
แอลคาไรด์โปรติเอส	ใช้เติมในสารซักฟอก กระบวนการฟอกหนัง สารสกัดแยกเงิน ใช้เพื่อวัตถุประสงค์ทางการแพทย์ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารคนและสัตว์ อุตสาหกรรมทางเคมี บำบัดของเสีย การย่อยสลายโปรตีน	Ni และคณะ, 2008
ไซแลนเนส	ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ การหมัก และอุตสาหกรรมอาหาร รวมทั้งการบำบัดของเสีย	Li และคณะ, 1993

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ	การประโยชน์	อ้างอิง
บีต้าฟรุกโตฟูราโนซิเดส และมอลโตซิลทรานเฟอเรส	บรรเทาอาการท้องผูก ปรับปรุงองค์ประกอบของไขมันในเลือดในผู้ป่วยโรคไขมันในเส้นเลือดสูง กระตุ้นการดูดซึมแคลเซียมและแมกนีเซียม และยับยั้งการผลิตสารนำเปื่อยในลำไส้เล็กของมนุษย์และสัตว์ และเป็นปัจจัยกระตุ้นการเติบโตของ Bifidobacteria	Yoshikawa และคณะ, 2007
แมนนาเนส	ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ การเปลี่ยนแปลงของเหลือทิ้งจากชีวมวลเป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหารสัตว์ ใช้ในการลดความหนืดของสารสกัดกาแฟ ใช้ในการผลิตแมนโน-โอลิโกแซ็กคาไรด์	Lin และ Chen, 2004
โปรตีนเซลล์เดียว	เป็นอาหารสัตว์และอาหารมนุษย์ เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับผลิต bioactive peptide	Gao และคณะ, 2007; Chi และคณะ, 2008
การควบคุมด้วยวิธีทางชีวภาพ	ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในผลไม้ กล้วยไฟซ์ และผัก	Mounir และคณะ, 2007
ไซเดอโรเฟอร์	ใช้เป็นยา การสกัดแยกโลหะ ปรับปรุงฟื้นฟูแหล่งที่มีของเสีย	Wang และคณะ, 2008

นอกจากพุลูลแลน ยังมีรายงาน ว่า *A. pullulans* สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆอีกหลากหลายชนิด ขึ้นอยู่กับความแตกต่างของสายพันธุ์ และอาหารที่ใช้ผลิต Kikuchi และคณะ (1973) ได้รายงานถึงการผลิต heteropolysaccharide ที่ไม่ละลายน้ำของ *A. pullulans* ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส แมนโนส และกาแลคโตส โดยผนังเซลล์ของ *A. pullulans* จะประกอบด้วยเฮเทอโรโพลิแซ็กคาไรด์ และบีต้ากลูแคน ที่เชื่อมต่อกันด้วย β -(1,3) และ β -(1,6) (Brown และคณะ, 1973) Elinov และคณะ (1987) รายงานถึงการผลิตกลูแคน ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -(1,3) α -(1,4) และ β -(1,6) ไกลโคซิดิก ซึ่งภายหลังเรียกว่า ออบาซิแคน Simon และคณะ (1993) ได้

ศึกษาผนังเซลล์ของ *A. pullulans* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งแสดงให้เห็นพุลลูแลน และ heteropolysaccharide ที่ไม่ละลายน้ำ บริเวณวงรอบๆ พื้นผิวด้านนอกของคลาไมโดสปอร์ โดยระบุว่ามียอดประกอบของพุลลูแลน อยู่อย่างหนาแน่นบริเวณวงรอบๆ ผนังเซลล์ ถัดเข้ามาจะเป็น บีต้ากลูแคน (รูปที่ 3) ที่ประกอบด้วย กลูโคส และแมนโนส ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นชนิด β -(1, 3)-glucan ซึ่ง β -glucan ที่ผลิตจาก *A. pullulans* พบว่ามีต่อ biological activities โดยสามารถยับยั้ง มะเร็ง และป้องกันการแพ้อาหาร (Tada และคณะ, 2008) นอกจากนี้ *A. pullulans* ยังสามารถผลิต poly(β -L-malic acid) หรือ PMA ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hydrophilic polyester สามารถละลายน้ำได้ ทำหน้าที่เป็นตัวนำส่งยา (drug delivery) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดหนึ่งที่มีความสนใจ ในทางเภสัชกรรม (Nakata และคณะ, 1993) รวมถึงฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharide) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่สำคัญอีกด้วย (Shin และคณะ, 2004)



รูปที่ 3 ภาพแสดงชั้นของพอลิแซ็กคาไรด์บนผนังเซลล์ด้านนอกของ *Aureobasidium pullulans* (ที่มา: Shingel, 2004)

ในอดีต *A. pullulans* ถูกจัดจำแนกเป็น 2 varieties คือ *A. pullulans* var. *pullulans* ซึ่งโคโลนีเป็นสีครีม ชมพู เหลือง หรือน้ำตาลอ่อน หลังจากเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA เป็นเวลา 3 สัปดาห์ และ *A. pullulans* var. *melanogenum* ซึ่งโคโลนีจะกลายเป็นสีเขียวเข้ม หรือดำ อย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีเส้นใยสีเข้ม (dark hyphae) (Hermanides-nijhof, 1977)

Yurlova และคณะ (1996) ได้ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนก *A. pullulans* และได้เสนอ variety ใหม่คือ *A. pullulans* var. *aubasidani* ซึ่ง *A. pullulans* var. *aubasidani* นี้ไม่สามารถใช้ เมลทิลแอลฟาดีกลูโคส (methyl- α -D-glucose) และ แลคโตส (lactose) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งต่างจาก *A. pullulans* var. *pullulans* ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองได้ และสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิด ออบาซิเดน (aubasidan) (Yurlova และ De Hoog, 1997) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายน้ำยาก มีแคลอรีต่ำ สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ มีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติในการเชื่อมติด (adhesive property) จึงนิยมใช้เป็นสารยึดเกาะ (Ptitchkina และคณะ, 1994) และนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม และเครื่องสำอาง เป็นต้น ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวนี้ สามารถนำมาใช้ระบุชนิดของ variety ของ *A. pullulans* ได้ในเบื้องต้น (ตารางที่ 2) นอกจากนี้ Yurlova และคณะยังได้รวม variety *pullulans* และ *melanogenum* ที่มีอยู่เดิมเข้าด้วยกัน เป็น variety เดียวคือ *A. pullulans* var. *pullulans*

ตารางที่ 2 ลักษณะเฉพาะของ varieties *pullulans* และ *aubasidani* (Yurlova และคณะ, 1995)

ลักษณะเฉพาะ	var. <i>pullulans</i>	var. <i>aubasidan</i>
Exopolysaccharides	Pullulan-like	Aubasidan-like
Optimal N-source for EPS production	(NH ₄) ₂ SO ₄	NaNO ₃
Assimilation of:		
methyl- α -D-Glucose	+	-
Lactose	+	-
rDNA group	1, 2	3

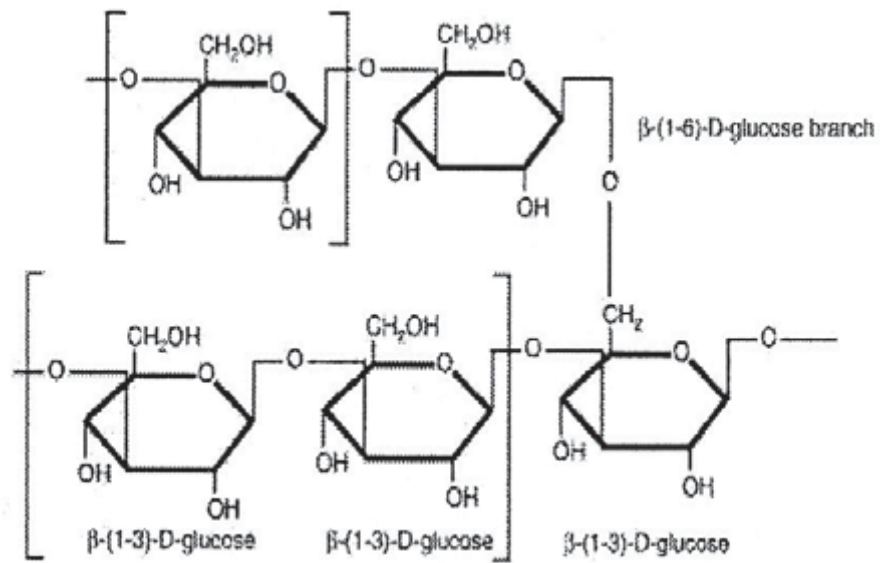
แต่อย่างไรก็ดี ในปี 2008 Zalar และคณะพบว่า แม้ว่า *A. pullulans* var. *aubasidani* จะมีการใช้แหล่งอาหารและ มีการผลิต EPS ได้แตกต่างจาก *A. pullulans* var. *pullulans* แต่ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ระบุว่าทั้ง *A. pullulans* var. *pullulans* และ *A. pullulans* var. *aubasidani* อาจจะเป็น variety เดียวกัน จึงได้รวม ทั้ง สอง varieties เข้าด้วยกันเป็น variety เดียวคือ *A. pullulans* var. *pullulans* นอกจากนี้ยัง ได้รายงานสอง varieties ใหม่ของ *A. pullulans* คือ

A. pullulans var. *subglaciale* ที่ไอซ์แลนด์ได้จาก ได้ธารน้ำแข็งบริเวณขั้วโลกเหนือ และ *A. pullulans* var. *namibiae* ที่มีเพียง 1 สายพันธุ์จาก Namibia ประเทศ แอฟริกา

2.2 บีต้ากลูแคน

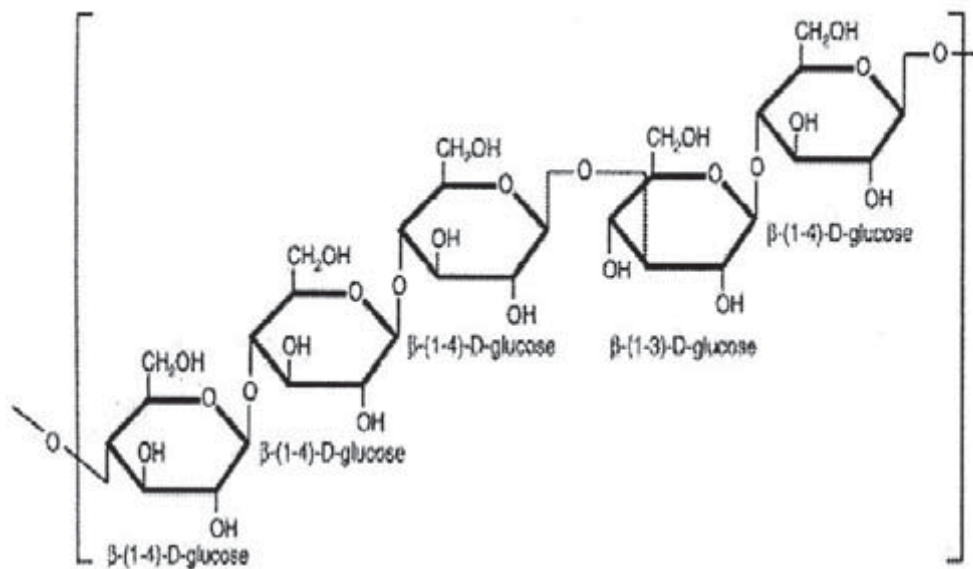
บีต้ากลูแคน (β -glucans) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (Herrera, 1991) และผนังเซลล์พืช เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ เห็ดบางชนิด สาหร่าย ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น (พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล, 2547) การศึกษาบีต้ากลูแคนเริ่มขึ้นในทศวรรษที่ 40 เมื่อ Louis Pillemer ศึกษา Zymosan ซึ่งเตรียมได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ ซึ่งเป็นที่รู้จักกันทั่วไปว่าเป็น สารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน แต่ในขณะนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่า โปรตีน ไขมัน น้ำตาลเชิงซ้อน หรือ องค์ประกอบใดของ Zymosan ที่สามารถออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ หลังจากนั้นราวทศวรรษที่ 50 Nicholas DiLuzio จาก มหาวิทยาลัย Tulane ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ทำการวิจัยเพิ่มเติมจนพบว่าสารที่มีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันใน Zymosan ที่จริงแล้วคือ บีต้ากลูแคน (พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล, 2547)

บีต้ากลูแคนที่สร้างโดยสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็จะมีโครงสร้าง และคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วย เช่น บีต้ากลูแคนที่สร้างโดยยีสต์จะประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะไกลโคไซด์ โดยภายในสายหลักประกอบด้วยกลูโคสซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า 1, 3 (β linked) และสำหรับสายที่เป็นกิ่งก้านจะประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีต้า 1, 6 (β linked) (Kapteyn และคณะ, 1996) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 โครงสร้างของ β -1,3-1,6-glucan ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ (ที่มา: Volman และคณะ, 2008)

สำหรับ ปีศาจกลูแคนที่ สร้างโดย พืช จะมีลักษณะที่แตกต่างจากปีศาจกลูแคนที่ผลิตจาก จุลินทรีย์ โดยมีโครงสร้างเป็น β -1,3-1,4-glucan (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 โครงสร้างของ β -1,3-1,4-glucan ที่สร้างโดยพืช (ที่มา: Volman และคณะ, 2008)

สำหรับบีต้ากลูแคนที่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ ซึ่งพบที่ผนังชั้นในของผนังเซลล์ เป็นองค์ประกอบที่พบประมาณ 30-35 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ โดยมากประกอบด้วยบีต้า 1, 3 กลูแคนเป็นส่วนใหญ่ และบีต้ากลูแคนที่สามารถละลายได้ในน้ำ ซึ่งพบที่ผนังชั้นกลางของผนังเซลล์ โดยประมาณ 20-22 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ โดยมากประกอบด้วยบีต้า 1, 3 กลูแคนที่มีกิ่งก้านของบีต้า 1, 6 กลูแคนมาก (Ha และคณะ, 2002) บีต้า 1, 3 กลูแคนมีทั้งที่อยู่ในรูปของโครงข่ายเส้นใย (fibrous) และรูปร่างไม่แน่นอน (amorphous) มีค่า degree of polarization (DP) ประมาณ 1,500 มีมวลโมเลกุลประมาณ 240,000 มีความยาวของเส้นใยสูงสุดประมาณ 600 นาโนเมตร บีต้า 1, 3 กลูแคนโดยทั่วไปมีลักษณะเป็นเกลียว (helical conformation) โดยเกลียวนั้นอาจประกอบด้วยสายเดี่ยวของพอลิแซ็กคาไรด์ หรืออาจประกอบด้วยสายที่มีพันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ ซึ่งทำให้เกลียวเป็นแบบ 3 เกลียว (triple helix) จากการศึกษาพบว่าเส้นใยของบีต้า 1, 3 กลูแคนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10-30 นาโนเมตร (Kopecka และ Kerge, 1986) โดยมีแขนงหรือกิ่งก้านที่หมู่ 6-ไฮดรอกซี (6-hydroxy group) ซึ่งการแตกแขนงที่ตำแหน่งนี้ไม่รบกวนต่อการเกิดโครงสร้างที่เป็น 1 เกลียวหรือ 3 เกลียวแต่ความยาวของแขนงหรือกิ่งก้านดังกล่าวมีผลต่อเกลียว โดยหากแขนงนั้นมีความยาวมากจะส่งเสริมให้เกิดโครงข่ายของเส้นใย แต่ถ้าแขนงสั้นจะส่งเสริมให้เกิดเกลียวแบบ 3 เกลียว (Saito และคณะ, 1991)

บีต้า 1,6 กลูแคน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีการแตกแขนงกิ่งก้านมาก ทำหน้าที่เชื่อมแต่ละองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ ในเซลล์ที่ขาดความสามารถในการสร้าง บีต้า 1,6 กลูแคน พบว่าเซลล์ขาดการประกอบกันเป็นผนังเซลล์ องค์ประกอบต่างๆถูกรบกวน และมีผลกระทบรุนแรงต่อการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าบีต้า 1,6 กลูแคนเป็นองค์ประกอบที่ยึดจับกับไคตินในบริเวณรอยแผลที่เกิดจากการแตกหน่อ (bud scar) อีกด้วย (Kolla และคณะ, 1997)

แหล่งของบีต้ากลูแคน

1. ธัญพืช (Cereal β -glucan)

สำหรับธัญพืช พบบีต้ากลูแคนในผนังเซลล์ มีบทบาทช่วยในการเจริญเติบโต โดยทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการลำเลียงน้ำและแร่ธาตุ ความคุมแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ภายในพืช ช่วยในการป้องกัน และต่อต้านจุลินทรีย์ รวมถึงแมลงที่มาจะทำลายพืช ประกอบด้วยสายตรงของบีต้า 1, 3 กลูแคน และ บีต้า 1, 4 กลูแคนปนกันอยู่ในผนังเซลล์ของเอนโดสเปิร์มของธัญพืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ และข้าวสาลี ซึ่งพบบีต้ากลูแคน 3-11 เปอร์เซ็นต์ 3-7 เปอร์เซ็นต์ 1-2 เปอร์เซ็นต์ และน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Skendi และคณะ, 2003) มีโครงสร้างเป็นสาย

ตรง คือ β -1, 3-1, 4-D-glucans ซึ่งในข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์ มีการผลิตบีต้ากลูแคนปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับธัญพืชชนิดอื่นๆ เมื่อสกัดบีต้ากลูแคนออกจากข้าวโอ๊ต พบว่าบีต้ากลูแคนมีลักษณะเป็นสายตรงที่น้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β 1,4 ประมาณ 70 เปอร์เซนต์ และน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,3-linked ประมาณ 30 เปอร์เซนต์ (Dais, 1982 และ Lazaridou, 2007) โดยปกติบีต้ากลูแคนในธัญพืชจะพบเป็นเกลียวแบบสุ่ม (random coil) แต่สามารถถูกทำให้มีสภาพเป็นเจลได้ ซึ่ง cereal- β -glucan มีคุณสมบัติคือเป็นบีต้ากลูแคนที่สามารถละลายน้ำได้ และมีผลต่อสุขภาพ และโภชนาการของมนุษย์ โดยเป็นแหล่งของสารอาหาร และใยอาหารที่ช่วยในระบบย่อย (Fincher และ Stone, 1986) ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในการควบคุมเนื้อสัมผัสของอาหาร และมีรายงานว่าบีต้ากลูแคนที่ผลิตจากธัญพืชจะมีผลต่อการรักษาระดับน้ำตาลในเลือด และการลดคอเลสเตอรอล (Kahlon และคณะ, 1993 และ Newman และคณะ, 1992)

2. แบคทีเรีย (Bacterial- β -glucan)

Curdlan เป็นเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ถูกค้นพบโดย Harada และคณะ (1964) มีโครงสร้างเป็น 1,3- β -D-glucan แบบสายตรงไม่มีแขนง มีค่า degree of polymerization (DP) ประมาณ 450 ที่พบในโครงสร้างของเซลล์ บริเวณที่เก็บสะสมอาหารของแบคทีเรีย รา และสาหร่าย (Deslands, 1980) มีรายงานว่า curdlan ถูกสร้างโดยแบคทีเรีย *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* 10C3 ที่คัดแยกได้จากดิน และ *Agrobacterium radiobacter* (Harada, 1992; Meada และคณะ, 1967) curdlan ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายในสารละลายด่าง (alkaline solution) และมีมวลโมเลกุลต่ำ ($M_w \approx 4-7 \times 10^4$ Da) พบว่าเมื่อสารละลายด่างที่ใช้มีความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่ำ curdlan จะมีรูปร่างเป็นเกลียว (helical) เมื่อสารละลายด่างที่ใช้มีโซเดียมไฮดรอกไซด์สูงกว่า 0.2 นอร์มอล curdlan จะมีรูปร่างเป็นเกลียวแบบสุ่ม และละลายได้หมด (Lee, 2006) curdlan สามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในมนุษย์ได้ มีผู้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร มีความสามารถในการยับยั้งเนื้องอก และต่อต้านอนุมูลอิสระ (Sener และคณะ, 2005)

3. ยีสต์ (yeast- β -glucan)

บีต้ากลูแคนที่ผลิตจากยีสต์ เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ มีโครงสร้างสายหลักเป็น β -1, 3-glucan (ประมาณ 85 เปอร์เซนต์) ส่วนสายที่เป็นกิ่งก้าน เป็น β -1,6-glucan (ประมาณ 3 เปอร์เซนต์) (Manners และคณะ, 1973) ซึ่งในปัจจุบันก็มีการนำเอาบีต้ากลูแคนที่ผลิตจากยีสต์มาใช้ในอุตสาหกรรมนมผง และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ใช้ปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของอาหาร ทำให้มีความคงตัวเมื่ออยู่ในรูปของอิมัลชัน (Burkus และ Temelli, 2006) และยังช่วยกระตุ้นระบบ

ภูมิคุ้มกันของคน (Feldman และคณะ, 2009) และสัตว์อีกด้วย (Hoa และคณะ, 2011) ออบาซิแคนจัดเป็นบีต้ากลูแคนชนิดหนึ่งที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ของ *A. pullulans* บางสายพันธุ์ (Ptitchkina และคณะ, 1994) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่สามารถย่อยสลายเองได้ และมีลักษณะเป็นเส้นใยที่คล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ และถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเภสัชกรรม เครื่องสำอาง อาหาร กาว และอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับพอลิเมอร์ (Ptitchkina และคณะ, 1994)

ประโยชน์ของบีต้ากลูแคน

บีต้ากลูแคนช่วยเสริมสร้างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ของมนุษย์ และสัตว์ ลดระดับคอเลสเตอรอล ช่วยรักษาระดับน้ำตาลในเลือด เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เป็นใยอาหารที่ช่วยในระบบย่อย (Fincher และ Stone, 1986) ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในการควบคุมเนื้อสัมผัสของอาหาร ใช้ปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของอาหารทำให้อาหารมีความคงตัวเมื่ออยู่ในรูปของอิมัลชัน (Burkus และ Temelli, 2000)

Tada และคณะ (2008) พบว่า เบต้ากลูแคนที่ผลิตจาก *Aureobasidium pullulans* สามารถยับยั้ง biological activities ซึ่งได้แก่ ยับยั้งมะเร็ง ยับยั้งกระดูกพรุน และป้องกันอาการแพ้อาหาร เป็นต้น ในขณะที่ Pelizon และคณะ (2004) พบว่าหนูที่ได้รับเบต้ากลูแคนจาก *Saccharomyces cerevisiae* 100 มิลลิกรัม ผลิต IL-12p40 IL-12p70 TNF- α และเพิ่มกิจกรรมของ NK cell ได้มากกว่าหนูที่ไม่ได้เบต้ากลูแคน และเมื่อกระตุ้นด้วย *Streptococcus aureus* และเซรัม (serum) ก็พบว่าหนูที่ได้รับเบต้ากลูแคนมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Paracoccidioides brasiliensis* ได้มากกว่าหนูที่ไม่ได้รับเบต้ากลูแคน

นอกจากนี้บีต้ากลูแคนยังใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางจำพวกครีมกันแดด เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันรังสี (Hofer และคณะ, 1995) ซึ่งแสงแดดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การทำงานของเมคิสติคอปติ เกิดเป็นฝ้า กระ รอยต่างค่า และก่อให้เกิดภาวะชราของผิวหนังเร็วกว่าปกติ (Photoageing) แล้วยังพบว่า แสงแดดเป็นตัวทำลายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง คือทำให้เซลล์ Langerhans มีจำนวนลดลง ดังนั้นคนที่ตากแดดนานๆ จึงมีโอกาสเกิดมะเร็งผิวหนัง หรือติดเชื้อที่ผิวหนังได้ง่าย ซึ่งเบต้ากลูแคนจะมีคุณสมบัติ สามารถกระตุ้นให้แผลหายเร็วขึ้น โดยจะไปเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้าง collagen ของเซลล์ผิวหนัง ลดการเกิดอนุมูลอิสระ และกระตุ้นการทำงานของเซลล์ Langerhans ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่นำเสนอสิ่งแปลกปลอมให้แก่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันคล้ายๆกับเซลล์ macrophage โดยจะจับสารแปลกปลอมแล้วย่อยสลายเป็นชิ้นเล็กๆ

นำไปไว้ที่ต่อมน้ำเหลือง เพื่อให้เซลล์ภูมิคุ้มกันตัวอื่น เช่น เม็ดเลือดขาว (T-lymphocyte) สร้างภูมิคุ้มกัน จากนั้นจะถูกทำลายไปโดย Macrophage กระบวนการเหล่านี้จะมีผลทำให้ผิวพรรณเปล่งปลั่ง สดใส ลดริ้วรอย และชะลอความแก่ของเซลล์ผิวหนังให้ช้าลง (Williams และคณะ, 1996)

2.3 프리ไบโอติก (prebiotic)

พรีไบโอติก คือ อาหารที่ไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น (Fooks และคณะ, 1999) แต่จะถูกหมักให้ย่อยสลายโดยแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ ก่อให้เกิดสารต่างๆ ที่ให้ประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกาย ซึ่งจะมีผลในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ แล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยทำหน้าที่ช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบลำไส้ ซึ่งพรีไบโอติกที่ดีควรส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในลำไส้ เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli และสามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Clostridium perfringens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารพิษได้ (Gibson และ Roberfroid, 1995)

เมื่อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ นำพรีไบโอติกไปใช้ จะให้พลังงานและสารบางชนิด เช่น กรดแลคติกและกรดไขมันชนิดสายสั้น (short-chain fatty acids) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการหมัก ซึ่งการหมักนี้จะทำให้มีการกระตุ้นการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์สุขภาพ และสภาวะความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดในลำไส้ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Clostridium perfringens* *Salmonella* spp. และ *Esherichia coli* เป็นต้น (Gibson และ Roberfroid, 1995) พรีไบโอติกส่วนใหญ่จะเป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนสายสั้นๆ ซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรียบางชนิด หรือจะกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือ พรีไบโอติกก็จะเป็นอาหารให้แก่จุลินทรีย์ที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งองค์ประกอบในอาหารที่จัดเป็นพรีไบโอติก ได้แก่ อินนูลิน (inulin) ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharide) ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylooligosaccharide) ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomaltooligosaccharide) กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galactooligosaccharide) แลคทูโลส (lactulose) (Rycroft และคณะ, 2001) และ บีต้ากลูแคน (β -glucan) (Gardiner, 2000 และ Snart, 2006) นอกจากนี้ยังช่วยลดอาการท้องผูก รักษาสมดุลน้ำ และเกลือแร่ในร่างกาย และช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสีอีกด้วย (Bengmark, 2005) ซึ่งในปัจจุบันมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ โดยการเติมสารที่จัดเป็นพรีไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ มากมาย เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์

และเพื่อเป็นทางเลือกแก่ผู้บริโภคในการดูแลสุขภาพ ในการลดความเสี่ยงหรือป้องกันโรคหลายชนิด สำหรับโปรไบโอติกเองก็มีนักวิจัยให้ความสนใจและสนับสนุนการเสริมลงในอาหารที่บริโภคประจำวัน ได้แก่ น้ำผลไม้ ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ธัญพืชต่างๆ หรืออาจเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้สำหรับเติมลงในอาหารที่จะบริโภคโดยตรง เช่น เครื่องดื่ม กาแฟ หรือใช้ประกอบอาหาร เป็นต้น (สุญาณี พงษ์ธนาภิกร, 2549)

2.4 โพรไบโอติก (probiotic)

โพรไบโอติกคือกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ซึ่งพบในบริเวณลำไส้ที่เรียกว่า Gastrointestinal tract (GI) โดยทั่วไปมีจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยแบ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มของ *Bifidobacterium* ซึ่งประกอบด้วย *B. animalis* *B. longum* *B. lactis* *B. infantis* *B. breve* *B. bifidum* *B. thermophilum* และ *B. adolescents* กลุ่ม *Lactobacillus* ได้แก่ *L. acidophilus* *L. casei* *L. farciminis* *L. gasseri* *L. johnsonii* *L. plantarum* *L. reuteri* *L. rhamnosus* *L. salivarius* *L. delbrueckii sub Bugaricus* *B. brevis* *B. cellobiosus* *B. curvatus* *B. fermentum* *L. helveticus* และแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ เช่น *Streptococcus thermophilus* *Enterococcus faecium* *Lactobacillus lactis* *Propionibacterium freudenreichii* *Escherichia coli* *nessle 1917* *Bacillus clauui* และ *Bacillus oligonitrophilis* รวมถึงยีสต์บางชนิด คือ *S. cerevisiae* และ *S. boulardi* (Penner และคณะ, 2005) เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่ได้รับจากการบริโภคอาหารที่มีส่วนประกอบของโพรไบโอติก เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกมีคุณสมบัติปกป้องร่างกายไม่ให้ได้รับอันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Clostridium* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษ (Gibson และ Roberfroid, 1995) และสามารถผลิตเอนไซม์มาช่วยสารอาหารบางประเภทที่ระบบในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ให้เป็นสารที่มีประโยชน์ และร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้ ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกที่จำเป็นต้องมีคุณสมบัติ สามารถสร้างกรดแลคติก และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียก่อโรคเจริญได้ยาก และมีคุณสมบัติทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula, 1998) สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ที่มีการบีบตัวให้เคลื่อนที่ในลักษณะถูกคลื่น (peristalsis) การที่โพรไบโอติกเกาะเคลือบที่ผนังทางเดินอาหารจะช่วยในการ colonization ของโพรไบโอติกดีขึ้น ทั้งยังช่วยในการย่อยอาหาร และการดูดซึมให้เป็นไปอย่างปกติ และสามารถสร้างสารต่างๆ เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้มีจำนวนที่มากเกินไป (Fuller, 1993)

ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกในกลุ่ม *Lactobacillus* ซึ่งเป็นที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตโยเกิร์ต และนมเปรี้ยว (Sultana และคณะ, 2000)

Lactobacillus acidophilus

L. acidophilus จัดอยู่ในวงศ์ Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเซลล์เป็นรูปท่อน อาจอยู่เดี่ยวๆ เรียงตัวเป็นคู่ๆ หรือสายสั้นๆ เป็น Lactic acid bacteria ที่ผลิตกรดแลคติกทั้งชนิด dextrorotatory และ levorotatory (D, L-lactic acid) เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ป้องกันการเกิดโรค เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่าง ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 5.5-6.0 สามารถจัดลำดับอนุกรมวิธาน ได้ดังนี้

Kingdom Bacteria

Phylum Firmicutes

Class Bacilli

Order Lactobacillales

Family Lactobacillaceae

Genus *Lactobacillus*

Species *Lactobacillus acidophilus*

L. acidophilus เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิตกรดแลคติกจำนวนมากในกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต เป็นแบคทีเรียที่ทำให้สุขภาพดีในบริเวณลำไส้เล็ก เนื่องจากบริเวณลำไส้เล็กมีจำนวนแบคทีเรียที่มีประโยชน์น้อย ส่วนมากจะเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรค ทำให้สุขภาพไม่ดี เป็นแบคทีเรียที่มีความจำเป็นในการสังเคราะห์และดูดซึมวิตามินในบริเวณลำไส้เล็ก ช่วยลดระดับคลอเลสเตอรอลในเลือด ช่วยควบคุมและขจัดพิษในวัตถุที่เสี่ยงในอาหาร สามารถทำงานร่วมกับเอนไซม์ในการย่อยอาหาร ช่วยควบคุมระดับพีเอชของลำไส้ โดยผลิตกรดแลคติก

Lactobacillus casei

Kingdom Bacteria

Phylum Firmicutes

Class Bacilli

Order Lactobacillales

Family Lactobacillaceae

Genus *Lactobacillus*Species *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei เป็น facultative anaerobe จัดอยู่ในกลุ่ม facultatively lactobacilli แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ รูปร่างแท่ง เป็นแบคทีเรียทนกรด (acid tolerant) มีกระบวนการหมักแบบ facultative heterofermentative โดยเป็นแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลผ่าน Pentose phosphoacetolase pathway (EMP pathway) แล้วได้ผลิตภัณฑ์หลัก คือกรดแลคติก (Axelsson, 1998) สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นมดิบ นมหมัก ผักผลไม้หมัก ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ในอุตสาหกรรมมีการผลิตเพื่อเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก และเชื้อตั้งต้น ในอุตสาหกรรมนมหมัก (Sultana และคณะ, 2000)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์	บริษัท/ ประเทศ
1. กล้องจุลทรรศน์รุ่น BX-51	Olympus/ Japan
2. กล้องจุลทรรศน์รุ่น CH 30 RF200	Olympus/ Japan
3. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น SPL15	Labcon/ The Republic Of South Africa
4. เครื่องเขย่าแบบบ่ม (Incubator shaker)	Vision scientific CO., LTD/ South Korea
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น BL610	Sartorius/ Germany
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205	Denver Instrument Company/ USA
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง รุ่น Rotofix32	Hettich/ Germany
8. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น PP-50	Sartorius/ Germany
9. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ Laminar Flow รุ่น BV 123	ISSOC/ Thailand
10. ตู้อบ (Hot air oven)	Binder/ USA
11. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ	Ta Chang Medical instrument Factory/ Taiwan
12. อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer)	Brand/ Germany
13. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer) รุ่น 2800	Unico/USA
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS Spectrophotometer) รุ่น HP 8453	Agilent/ USA

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท/ ประเทศ
1. Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	Sigma/ USA
2. Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{21}$)	Ajax/ Australia
3. Malt extract	HiMedia/ India
4. Yeast extract	HiMedia/ India
5. Peptone	HiMedia/ India
6. Meat extract	HiMedia/ India
7. Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$)	Ajax/ Australia
8. Sodium nitrate ($NaNO_3$)	Ajax/ Australia
9. Tween 80	Fluka/ Switzerland
10. Copper sulphate ($CuSO_4$)	Carlo Erba Reagent/ Italy
11. Sodium chloride ($NaCl$)	Merck/ Germany
12. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Carlo Erba Reagent/ Italy
13. Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	Carlo Erba Reagent/ Italy
14. Magnesium sulphate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Carlo Erba Reagent/ Italy
15. Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	Ajax/ Australia
16. Zinc sulphate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	May & Baker/ England
17. Agar	Sigma/ USA
18. Ethanol (95 %)	องค์การสุรากรม สรรพสามิต/ ประเทศไทย
19. Ammonium molybdate ($H_{24}Mo_7N_6O_{24}$)	Fluka/ Switzerland
20. L-asparagine Monohydrate ($C_4H_8N_2O_3 \cdot H_2O$)	Fluka/ Switzerland
21. Sodium acetate (CH_3COONa)	Ajax/ Australia
22. Tri-ammonium citrate ($(NH_4)_3C_6H_5O_7$)	Sigma/ USA
23. Manganese (II) sulfate monohydrate ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	Merck/ Germany
24. Hydrochloric acid (HCl)	Merck/ Germany

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

Aureobasidium pullulans สายพันธุ์ NRRL 58539 NRRL 58543 NRRL 58560 และ NRRL 58013 ได้รับมาจาก Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, the United States Department of Agriculture

การเตรียมหัวเชื้อ ทำโดยเลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร Yeast Malt Broth (YMB) (Atlas, 1993) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน สำหรับการเก็บ *A. pullulans* เป็น stock culture ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร YMB เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นเก็บเชื้อในหลอด microcentrifuge เติมสารละลายกลีเซอรอลจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) แล้วนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บระยะสั้น และทำเป็น freeze dried stock (Bond, 2007) เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บระยะยาว

Lactobacillus acidophilus สายพันธุ์ TISTR 1338 และ *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ TISTR 390 ได้รับมาจาก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) การเตรียมหัวเชื้อ ทำโดยเลี้ยง *L. acidophilus* สายพันธุ์ TISTR 1338 และ *L. casei* สายพันธุ์ TISTR 390 ในอาหารสูตร Man Rogosa Sharpe Broth (MRS) (Pelczar และคณะ, 1986) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน สำหรับการเก็บแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็น stock culture ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร MRS เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเก็บเชื้อในหลอด microcentrifuge เติมสารละลายกลีเซอรอลจนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จากนั้นนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บระยะสั้นและทำเป็น freeze dried stock เก็บใน 4 องศาเซลเซียส สำหรับการเก็บระยะยาว

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะระดับโมเลกุลของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

3.4.1.1 การใช้แหล่งอาหารของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ในอาหารสูตร YMB ที่อุณหภูมิห้อง เขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน นับจำนวนเซลล์โดยใช้ Haemocytometer แล้วเจือจางให้ได้ 2.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ่ายเชื้อที่เตรียมได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสูตร Mineral Medium (Lin และ Kolattukudy, 1978) ปริมาตร 50

มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) กรัมคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) กรัมไนโตรเจน เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer ในวันที่ 0 3 และ 5 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.1.1.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนทั้งหมด 24 ชนิด ประกอบด้วย D-Arabinose L-Arabinose D-Fructose D-Galactose D-Glucose β -D-Glucose Methyl- α -D-glucose D-Mannose L-Sorbose D-Xylose D-Cellobiose β -Lactose D-Maltose D-Sucrose D-Trehalose \cdot 2H₂O Maltotriose D-Melezitose \cdot H₂O α -Cellulose Starch (soluble) D-Glucosamine D-Mannitol D-Salicin Glycerol Ethanol และ Methanol โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน

3.4.1.1.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 16 ชนิด ประกอบด้วย Ammonium acetate Ammonium chloride Ammonium citrate Ammonium nitrate Ammonium oxalate Ammonium sulfate Ammonium tartrate Potassium nitrate Sodium nitrate Urea L-Asparagine \cdot H₂O Glycine L-Leucine L-Lysine L-Phenylalanine และ Peptone โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน

3.4.2 การศึกษาลักษณะระดับโมเลกุลของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 บนอาหารสูตร YMA เป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อ 1 โคโลนีลงในอาหารสูตร YMB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน นำมาตกตะกอนเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที (5,232 g) เป็นเวลา 10 นาที นำเซลล์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอ โดยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) (Zhou และคณะ, 2002) เริ่มจากนำเซลล์ใส่ในโกร่ง แล้วบดเซลล์ในไนโตรเจนเหลวให้เซลล์แตกจนมีลักษณะเป็นผงละเอียด ตักเซลล์ 0.5 กรัม ใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย 2X CTAB ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติมนีโอบอลปริมาตร 350

ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24 : 1) ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที (8,716 g) เป็นเวลา 10 นาที ปิดส่วนใสด้านบนในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ และทำการสกัดซ้ำอีกครั้งก่อนปิดส่วนใสด้านบนมาใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ โดยวัดปริมาตรส่วนใสที่ปิดมาด้วย แล้วเติมไอโซโพรพานอลในปริมาตร เท่ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายในหลอดทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน แล้วเติมสารละลายเอทานอล (70 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอนของดีเอ็นเอ เทสารละลายเอทานอลทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) Large Subunit Ribosomal DNA gene (LSU) และ Elongase gene (ELO) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 (White และคณะ, 1990) LSU NL1 และ NL4 (Boekhout และคณะ, 1995) และ ELO2-F และ ELO2-R (Zalar และคณะ, 2008) ตามลำดับ (ตารางที่ 3) สำหรับชุดปฏิกิริยามีส่วนประกอบที่มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ดังนี้

สาร	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
10X PCR Buffer with Mg ²⁺ (บริษัท RBC Bioscience ประเทศ ไต้หวัน)	5
2.5 mM dNTPs	5
Primer (Forward) (10 pmol/μl)	2.5
Primer (Reverse) (10 pmol/μl)	2.5
Tag DNA polymerase (บริษัท RBC Bioscience ประเทศ ไต้หวัน)	1
DNA template	5
Sterilized distilled water	29
ปริมาตรรวม	<u>50</u>

นำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบอัตโนมัติ Peltier Thermal Cycler รุ่น PTC-100™ และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสทั้งหมด 35 รอบ ซึ่งสภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ไพรมเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS LSU และ ELO

ชื่อไพรมเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เอกสารอ้างอิง
ITS5	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'	(White และคณะ, 1990)
ITS4	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3'	(White และคณะ, 1990)
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	(Boekhout และคณะ, 1995)
NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	(Boekhout และคณะ, 1995)
ELO2-F	5'-CAC TCT TGA CCG TCC CTT CGG-3'	(Zalar และคณะ, 2008)
ELO2-R	5'-GCG GTG ATG TAC TTC TTC CAC CAG-3'	(Zalar และคณะ, 2008)

ตารางที่ 4 สภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS LSU และ ELO

ขั้นตอนปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. Initial denaturation	94	5
2. Denaturation	94	1
3. Annealing	56 (ITS), 59 (LSU, ELO)	1
4. Extension	72	2
5. Final extension	72	10
6. Hold	4	∞

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเบื้องต้น ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ในบัฟเฟอร์ 1X TBE buffer และให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 4.5 นาที และจากนั้นนำเจลไปย้อมด้วย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำเจลไปตรวจสอบแถบดี

เอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา ลูคโซฟออลิเมอร์เรสไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ UltraClean® 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories, USA)

3.4.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.2.3.1 การทำ Automated DNA sequencing

ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำการตรวจสอบลำดับ นิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท Macrogen อินคอร์ปอเรชัน สาธารณรัฐเกาหลี แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการศึกษาในขั้นต่อไป

3.4.2.3.2 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับ นิวคลีโอไทด์กับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล Genbank

นำลำดับ นิวคลีโอไทด์ ที่ได้ไปค้นหา ลำดับ นิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS LSU และ ELO ที่คล้ายคลึงกัน ในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) แล้วเลือกลำดับ นิวคลีโอไทด์ ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดมาทำ pairwise alignment ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์ ความคล้ายคลึง ระหว่างลำดับ นิวคลีโอไทด์ ของ *A. pullulans* ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ กับลำดับ นิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank 5 อันดับที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด

3.4.3 ศึกษาการเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

3.4.3.1 การเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ในอาหารสูตร Production Medium (PM) (Prasongsuk และคณะ, 2007) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร ทุกๆ 3 ชั่วโมง ใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นเก็บทุกๆ 6 ชั่วโมงจนครบ 9 วัน ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer และสร้างกราฟการเติบโตของเชื้อ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.3.2 การผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM (Prasongsuk และคณะ, 2007) ปริมาตร 95 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 9 วัน ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกที่ 6,000 รอบต่อนาที (5,232 g) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอน NP-EPS ด้วยเอธานอล (95 เปอร์เซ็นต์) (Prasongsuk และคณะ, 2005) นำ NP-EPS ที่ได้จากการตกตะกอนไปอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งที่ได้คงที่ วัดน้ำหนักของ NP-EPS ที่ผลิตได้และน้ำหนักเซลล์แห้ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.4 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

เลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอน NP-EPS ตามวิธีในข้อ 3.4.3.2 นำ NP-EPS ที่ได้มาอบเป็นผง และนำไปวิเคราะห์ ดังนี้

3.4.4.1 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ (Leathers และคณะ, 1988)

นำเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ ละลายใน 0.05 M sodium acetate buffer ที่ความเป็นกรดต่างต่างๆ ได้แก่ 4.5 5.0 และ 6.9 โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) จากนั้นเตรียมเอนไซม์ความเข้มข้น 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และปรับ ความเป็นกรดต่างให้เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ดังนี้ α -amylase (จาก *Aspergillus oryzae*, Sigma, USA) (ความเป็นกรดต่าง 6.9) pullulanase (จาก *Klebsiella pneumoniae*, Sigma, USA) (ความเป็นกรดต่าง 5.0) glucoamylase (จาก *Aspergillus niger*, Sigma, USA) (ความเป็นกรดต่าง 4.5) และ β -glucanase (จาก *Trichoderma longibrachiatum*, Sigma, USA) (ความเป็นกรดต่าง 5.0) แล้วเปิดเอนไซม์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มเป็นเวลา 15 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 20 25 55 และ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ α -amylase pullulanase glucoamylase และ β -glucanase ตามลำดับ และวัดน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย เปรียบเทียบกับ

ออบาซิแคนที่ผลิตโดย *A. pullulans* var *aubasidani* NRRL 58013 และ พูลูลูแลนมาตรฐานจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4.4.2 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS

วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (PerkinElmer (Spectrum One), USA) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University) โดยบดตัวอย่าง เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ผสมกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr powder) ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อโพแทสเซียม โบรไมด์ 1 : 100 แล้วอัดให้เป็นแผ่น pellet ใช้ความละเอียดในการอ่านค่า (Resolution) 4.0 cm^{-1} จำนวนสแกน (No. of scan) 16 และ Range ที่ใช้วัดอยู่ในช่วง $4,000 - 400\text{ cm}^{-1}$ โดยเปรียบเทียบกับออบาซิแคนที่ผลิตโดย *A. pullulans* var *aubasidani* NRRL 58013 และ พูลูลูแลนมาตรฐานจากบริษัท Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, Varian, USA) ชนิด ^{13}C และ ^1H (Prasongsuk และคณะ, 2007; Manitchotpisit และคณะ, 2009) โดยนำตัวอย่าง เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ละลายในน้ำ D_2O (น้ำที่มีไฮโดรเจนหนักหรือดิวเทอเรียมในสัดส่วนที่มากกว่าที่มีอยู่ในธรรมชาติ) วัดที่ความถี่ $125.76\text{ (}^{13}\text{C)}$ และ $500.16\text{ (}^1\text{H)}$ MHz โดยเปรียบเทียบกับออบาซิแคน

3.4.5 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS จาก *A. pullulans*

คัดเลือก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่สามารถผลิต NP-EPS ได้ในปริมาณมาก 1 สายพันธุ์ (จากการทดลองข้อ 3.4.3.2) มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต โดยมีภาวะของการเลี้ยงที่ทำการปรับในแต่ละขั้นตอนตามลำดับดังนี้

3.4.5.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM ที่ทำการปรับองค์ประกอบ โดยเติมแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนชนิดต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย ซูโครสกับแอมโมเนียมซัลเฟต ซูโครสกับโซเดียมไนเตรท ซูโครสกับเปปโตน กลูโคสกับแอมโมเนียมซัลเฟต กลูโคสกับโซเดียมไนเตรท กลูโคสกับเปปโตน ฟรุคโทสกับแอมโมเนียมซัลเฟต ฟรุคโทสกับโซเดียมไนเตรท และ ฟรุคโทส

กับเปปโติน ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน นำสารละลายส่วนใสมาทดตะกอน NP-EPS ตามวิธีในข้อ 3.4.3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน คัดเลือกอาหารสูตร PM ที่เติมคาร์บอน และไนโตรเจน ชนิดที่สามารถ ผลิต NP-EPS ได้ดีที่สุด มาหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการผลิต NP-EPS โดยออกแบบการทดลองแบบ Factorial design วางแผนการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนองแบบ central composite design (CCD) ซึ่งกำหนดช่วงของปัจจัยที่ศึกษาดังตารางที่ 3.3 คำนวณหาภาวะที่เหมาะสม และสร้างแผนภาพพื้นผิวตอบสนอง (contour plot) โดยใช้โปรแกรม JMP software เวอร์ชัน 10 (StatSoft Inc., USA) จากนั้นทำการทดสอบสมการอธิบายการผลิต NP-EPS โดยเลือกระดับปัจจัยจากแผนภาพพื้นผิวตอบสนองที่ให้ผลของการผลิต NP-EPS ที่สูงสุด มาทดลองซ้ำเพื่อเปรียบเทียบกับค่าทำนายที่ได้จากสมการ

ตารางที่ 5 การแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ในอาหารสูตร PM ที่ใช้ในการทดลองวิธีพื้นผิวตอบสนอง

ปัจจัย		รหัสของปัจจัย	
คาร์บอน (%) (w/v)	ไนโตรเจน (%) (w/v)	X ₁	X ₂
5.0	0.04	-1	-1
5.0	0.06	-1	0
5.0	0.08	-1	1
6.0	0.04	0	-1
6.0	0.06	0	0
6.0	0.08	0	1
7.0	0.04	1	-1
7.0	0.06	1	0
7.0	0.08	1	1

3.4.5.2 ศึกษาระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM ที่ได้จากข้อ 3.4.5.1 ที่ระดับ ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารต่างๆ (ความเป็นกรดต่าง 5.5 6.5 และ 7.5) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน นำสารละลายส่วนใสมาทดตะกอน

NP-EPS ตามวิธีในข้อ 3.4.3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.5.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM ที่ได้จากข้อ 3.4.5.2 ที่อุณหภูมิต่างๆ (อุณหภูมิห้อง (30 ± 2) 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 วัน นำสารละลายส่วนใสมาดกตะกอน NP-EPS ตามวิธีในข้อ 3.4.3.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4.6 การทดสอบสมบัติของ NP-EPS ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* (ดัดแปลงจาก Huebner และคณะ, 2007)

เชื้อเชื้อ *Lactobacillus* spp. จำนวน 1 โคโลนี ลงใน MRS Broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำมาวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แล้วปรับโดยการเจือจางด้วย MRS Broth ให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.1 ถ้ายเชื้อ *L. acidophilus* และ *L. casei* ที่ปรับความหนาแน่นของเซลล์แล้ว 1% (v/v) ลงในหลอดทดลองที่มี MRS broth ที่เติม NP-EPS ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัดการเติบโตของ *Lactobacillus* sp. โดยการนับจำนวนโคโลนี (colony forming unit, CFU) บนอาหารสูตร MRS Agar เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้ กับค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองควบคุมที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ (กลูโคส พูลลูแลน (Hayashibara Co., Ltd., Japan) และบีต้ากลูแคน (food-grade) (Core-Chematis Co., Ltd., Thailand)) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS for windows version 11.5 ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4.7 ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

นำ NP-EPS ที่ผลิตจากภาวะที่เหมาะสมที่สุดในข้อ 3.4.5 มาขึ้นฟิล์มที่ความเข้มข้น 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และนำ NP-EPS ผสมกับพูลลูแลน (Hayashibara Co., Ltd., Japan) เพื่อขึ้นรูปฟิล์ม โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของ NP-EPS 5 ระดับ ศึกษาสมบัติทางกายภาพของฟิล์มที่ขึ้นรูปไว้เปรียบเทียบกับฟิล์มพูลลูแลนที่เตรียมจากพูลลูแลนเกรดการค้า ดังนี้

3.4.6.1 การเตรียมฟิล์ม

เตรียมแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมของพอลูลูแลน (Hayashibara Co., Ltd., Japan) 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ NP-EPS 0.1 0.5 1.0 1.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร โดยใช้ magnetic stirrer คนส่วนผสมทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว เทลงในแม่พิมพ์อะคริลิกสำหรับขึ้นรูปที่มีขนาด $13 \times 17 \times 0.5$ เซนติเมตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้น้ำระเหยออกจนได้เป็นแผ่นฟิล์ม ลอกแผ่นฟิล์มออกจากแม่พิมพ์ นำแผ่นฟิล์มใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ใน desiccator เพื่อนำไปทดสอบสมบัติทางกายภาพบางประการต่อไป

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

ศึกษาความสามารถในการยืดตัว (elongation) โดยกำหนดสถานะของเครื่อง ให้ใช้ load cell ขนาด 5 กิโลกรัม ชุดหัวกดเจาะแบบยาง spherical probe แทนยึดตัวอย่างฟิล์มที่มีช่องเปิดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร ความเร็วในการเคลื่อน Probe ที่ 10 มิลลิเมตรต่อนาที ตัวอย่างฟิล์มที่ทดสอบมีขนาดกว้าง 6 มิลลิเมตร ยาว 25 มิลลิเมตร โดยเปรียบเทียบกับฟิล์มที่เตรียมจากพอลูลูแลนมาตรฐานของบริษัท Hayashibara ประเทศญี่ปุ่น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

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

ตัดแผ่นฟิล์มให้มีขนาดประมาณ 2×2 เซนติเมตร ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง คนตลอดเวลาโดยใช้ magnetic stirrer และจับเวลาจนกระทั่งแผ่นฟิล์มบวมตัวและละลายจนหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะระดับโมเลกุลของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

4.1.1 การใช้แหล่งอาหารของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

จากการตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 พบว่า *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ยกเว้น methanol และ D-Trehalose \cdot 2H₂O และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง *A. pullulans* var. *pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58560 แล้วพบว่าส่วนใหญ่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เหมือนกัน ยกเว้น D-Mannitol ที่ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถใช้ได้ดี ในขณะที่สายพันธุ์อ้างอิงใช้น้อย และ D-Trehalose \cdot 2H₂O ที่ทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถใช้ได้ ในขณะที่สายพันธุ์อ้างอิงสามารถใช้ได้ดี (ตารางที่ 6) และสำหรับการตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์อ้างอิงสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้ดีเกือบทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ยกเว้น L-Phenylalanine ที่สามารถใช้ได้น้อย และยูเรีย ที่สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ไม่สามารถใช้ได้ ในขณะที่สายพันธุ์อ้างอิงสามารถใช้ได้ดี (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 NRRL 58543 และ NRRL 58560 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร mineral medium ที่เติม แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เปอร์เซ็นต์กรัมคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการเติบโตโดยการนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 0 3 และ 5

แหล่งคาร์บอน	NRRL 58539	NRRL 58543	NRRL 58560*
1. D-Arabinose	w***	w	w
2. L-Arabinose	+**	+	+
3. D-Fructose	+	+	+
4. D-Galactose	+	+	+
5. D-Glucose	+	+	+
6. β -D-Glucose	+	+	+
7. Methyl- α -D-glucose	w	w	w
8. D-Mannose	+	+	+
9. L-Sorbose	w	w	w
10. D-Xylose	+	+	+
11. D-Cellobiose	w	w	w
12. β -Lactose	w	w	w
13. D-Maltose	+	+	+
14. D-Sucrose	+	+	+

* = สายพันธุ์อ้างอิง *A. pullulans* var *pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58560 (Prasongsuk และคณะ, 2005)

**+ = สามารถใช้แหล่งอาหารได้ (จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่า $2 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

***w = สามารถใช้แหล่งอาหารได้น้อย (จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่า $1 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่น้อยกว่า $2 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

****- = ไม่สามารถใช้แหล่งอาหารได้ (จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นน้อยกว่า $1 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 6 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 NRRL 58543 และ NRRL 58560 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร mineral medium ที่เติม แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 เปอร์เซ็นต์กรัมคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เขย่า ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการเติบโตโดยการนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 0 3 และ 5 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	NRRL 58539	NRRL 58543	NRRL 58560*
15. D-Trehalose·2H ₂ O	-****	-	+
16. Maltotriose	+	+	+
17. D-Melezitose·H ₂ O	+	+	+
18. α -Cellulose	w	w	w
19. Starch (soluble)	w	w	w
20. D-Glucosamine	+	+	+
21. D-Mannitol	+	+	w
22. D-Salicin	+	+	+
23. Glycerol	w	w	+
24. Ethanol	w	w	w
25. Methanol	-	-	-

* = สายพันธุ์อ้างอิง *A. pullulans var pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58560 (Prasongsuk และคณะ, 2005)

**+ = สามารถใช้แหล่งอาหารได้ (จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่า $2 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

***w = สามารถใช้แหล่งอาหารได้น้อย (จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่า $1 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่น้อยกว่า $2 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

****- = ไม่สามารถใช้แหล่งอาหารได้ (จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นน้อยกว่า $1 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

ตารางที่ 7 ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 NRRL 58543 และ NRRL 58560 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร mineral medium ที่เติม แหล่งไนโตรเจน ชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์กรัมไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการเติบโตโดยการนับจำนวนเซลล์ในวันที่ 0 3 และ 5

แหล่งไนโตรเจน	NRRL 58539	NRRL 58543	NRRL 58560*
1. Ammonium acetate	+**	+	+
2. Ammonium chloride	+	+	+
3. Ammonium citrate	+	+	+
4. Ammonium nitrate	+	+	+
5. Ammonium oxalate	+	+	+
6. Ammonium sulfate	+	+	+
7. Ammonium tartrate	+	+	+
8. Potassium nitrate	+	+	+
9. Sodium nitrate	+	+	+
10. Urea	-****	-	+
11. L-Asparagine · H ₂ O	+	+	+
12. Glycine	w***	w	+
13. L-Leucine	+	+	+
14. L-Lysine	+	+	+
15. L-Phenylalanine	w	w	w
16. Peptone	+	+	+

* = สายพันธุ์อ้างอิง *A. pullulans var pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58560 (Prasongsuk และคณะ, 2005)

**+ = สามารถใช้แหล่งอาหารได้ (จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่า $2 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

***w = สามารถใช้แหล่งอาหารได้น้อย (จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่า $1 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่น้อยกว่า $2 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

****- = ไม่สามารถใช้แหล่งอาหารได้ (จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นน้อยกว่า $1 \log_{10}$ จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร)

4.1.2 การศึกษาลักษณะระดับโมเลกุลของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

4.1.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS LSU และ ELO

จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน 3 ตำแหน่ง คือ Internal transcribed spacer (ITS) Large subunit ribosomal DNA gene (LSU) และ Elongase gene (ELO) ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 1,293 และ 1,418 สำหรับบริเวณ ITS และ 841 และ 829 คู่เบส สำหรับบริเวณ LSU ตามลำดับ ในขณะที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมบริเวณ ELO ได้

4.1.2.2 ผลการทำ Automated sequencing

ผลการทำ Automated sequencing ของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสบริเวณ ITS ใน 2 ทิศทางโดยใช้ไพรเมอร์ ITS5 และ ITS4 เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับ นิวคลีโอไทด์จาก Electropherogram แล้วได้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ ที่มีความยาวดังนี้ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 1,293 คู่เบส และ NRRL 58543 1,076 คู่เบส (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

ชนิด/สายพันธุ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS												
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539	1	AAAAA	ACTAG	TTTGATA	AATT	CTGAAGA	ACG	GCATC	AATTG	GATGAT	CCTT	CTGCAG	TGTA
	61	CGCTT	TACAGA	AGCCT	TGGCCC	CCCAC	GCAAA	GTGGG	TGACC	GCGACT	TATTA	AAGAA	AGTGT
	121	CAGCG	ATGGC	AGTCC	GACTG	CCC	GCGCC	CGTCT	TTCGA	ATTGAC	CGGG	ACCTT	CCTAG
	301	AGCCT	ACGGC	ACCA	ACCCAG	GGGG	GAAACC	CTTCT	TAACCC	TTCCG	AGGTA	GCAC	TTAAT
	361	CCCAG	TGACT	GGGG	GCCCAT	GTTA	ACCGCA	TGGGG	TACGG	TAAA	AGAAC	G	TAGG
	421	GAATC	CGCAG	CCA	ACGCCTA	AGG	TCCGCT	CTA	ACCGCG	CGG	CTAAG	G	AGGG
	541	AGACT	AAGTG	T	TAGACGGTG	TGA	ATCAGTA	G	TCCGG	CGCG	AGC	TGG	GGA
	661	GAAG	ATATAG	T	CGTCCCTG	G	TGAAAGCC	C	AGGG	GAGAA	C	ACTG	CGGG
	721	CCG	ATGGAAA	A	CTGAAAACG	T	TCCGTAGGT	G	AACT	TGCGG	A	AGG	ATCATT
	781	GGT	GCCTCGTC	G	CCCCGACCTC	C	AACCCCTCTG	T	TGT	TAAAAC	T	ACCT	TGTTG
	841	ACCG	TCCGGT	C	TCGAGCCCG	A	GGGGCTCCG	G	CC	CAGG	CGA	G	CCCG
	901	AA	ACTCTTGT	T	TTTTATAACC	G	TCTCTGA	G	TAAAA	ATTT	T	GAATA	AAATC
	961	ACA	ACGGATC	T	CTTGGTTCT	C	GCATCGATG	A	AGA	ACGCAG	C	GAA	ATGCGA
	1021	GA	ATTGCAGA	A	ATTCAGTGAA	T	CATCGAATC	T	T	TGAAC	GCA	C	ATTG
	1081	CG	AGGGGCAT	G	CCTGTTTCGA	G	CGTCATTAC	A	C	CACTCAAG	C	ACTG	CTTG
	1141	CG	TCCCCCTC	T	CGTTTGGGG	G	GCGAGCATC	A	A	AGACCTCG	G	C	GAGG
	1201	GG	CGTAGTAG	A	ATTATTTCCG	A	ACGTCTTCA	A	A	ACGGGAGG	A	C	TCTG
	1261	TA	AGTTTTCT	A	AAAGTTGGCT	C	CCGAAAAGGG	T	A	G			
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543	1	CTTT	ACTAGT	ATT	ATGTGTG	G	TACC	CGCC	CGTCT	G	GGGGT	CCCT	C
	61	CCTT	TACCGC	GG	CCCGCCTC	CC	ACGTGTGT	GG	CGCG	CGCTGT	GA	ATA	ATATG
	121	AGA	AAGGCAGT	CT	GACTGCCC	G	CGGGTTTTT	T	TATTTA	ATC	G	CCG	CGACCT
	181	TG	CGGCACCA	A	CCCGGGGG	G	ACACCCCTC	T	AC	CCTCCG	A	G	G
	241	G	ACTGGGCGC	C	CATGTTAAC	C	G	CATGGGGT	A	CGGTAAAAG	A	A	C
	301	G	CAGCCAACG	C	TAAGGTCG	C	GCTCTAAC	G	CG	CGGCTA	A	G	G
	361	A	G	TGTAGAC	G	TGTGAATC	A	G	TAGTCCGG	C	G	C	G
	421	A	TAGTCGGTC	C	TGGGTGAA	A	G	CCAGGGG	A	G	TACACTGC	G	G
	481	G	AAAACTGAA	A	ACGTTC	C	G	TGGTGAA	C	T	G	C	G
	541	G	CTCGTCGCC	C	GACCTCCAA	C	C	CTGTGTTG	T	T	A	A	A
	601	G	CTCGGTCTC	G	AGCCG	C	A	G	CCGGCC	C	A	G	C
	661	C	AAACTCTTG	T	TTTTATAAC	C	G	T	CGTCTG	T	A	A	A
	721	A	ACAACGGAT	C	TCTTGGTT	C	T	C	G	CATCGA	T	G	A
	781	G	TGAATTGCA	G	AATTCAGTG	A	A	T	C	A	T	C	G
	841	C	CTTGGTATT	C	GAGGGGCA	T	G	C	T	G	T	C	G
	901	G	TATTGGGCC	C	CGTCCCCCT	C	G	C	G	T	T	G	G
	961	C	ACCGGCTTT	A	GCGTAGTA	G	A	A	T	A	T	T	T
	1021	G	ACAGAAGTT	T	AATTTTCTA	A	G	G	G	T	G	A	C

ผลการทำ Automated sequencing ของผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอร์เรสบริเวณ LSU ใน 2 ทิศทางโดยใช้ไพรเมอร์ NL4F และ NL4R เมื่อตรวจสอบความถูกต้องของลำดับ นิวคลีโอไทด์จาก Electropherogram แล้วได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวดังนี้ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 841 คู่เบส และ NRRL 58543 670 คู่เบส (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

ชนิด/สายพันธุ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539	<p>1 ACCGGACTAT ATCGAATGAT TATAGACATC TAAATAGAAG ATTTACCGTG GAAGGACGTC 61 GATTAGAATC ACAGAAGATC GTCTCGATTA ACAGACTGTC TGGCCGTTTG TTGCATTGTC 121 TATAAGCGGT GGAAAAGACA CCAACAGGGA TTGCCCTAGT AACGGCGAGT GAAGCGGCAA 181 CAGCTCAAAAT TTGAAAGCTG GCCTTCGGGT CCGCATTGTA ATTTGTAGAG GATGCTTTGG 241 GGCAGCCGCC TGTCTAAGTT CCTTGGAACA GGACGTCATA GAGGGTGAGA ATCCCGTATG 301 TGACAGGACA TGGCACCCATA TGTAAGCTC CTTGACGAG TCGAGTTGTT TGGGAATGCA 361 GCTCTAAATG GGAGGTAAT TTCTTCTAAA GCTAAATACC GGCGAGAGAC CGATAGCCGA 421 CAAGTAGAGT GATCGAAAGA TGAAAAGCAC TTTGGAAAGA GAGTTAAAAA GCACGTGAAA 481 TTGTTGAAAG GGAAGCGCTT GCAATCAGAC TTGTTTTGAC TGTTCCGGCC GTCTCTGAC 541 CGGTTTTATTC AGTCTGGACA GGCCAGCATC AGTTTTGGCG GCCGGATAAA GGCCAGGGA 601 ATGTGGCTCT CGCTTCGGCG GGAGTGTAT AGCCCTGGGT GTAATACGGC CAGCCGGGAC 661 TGAGGTCCGC GCTTCGGCTA GGATGCTGGC ATAATGGTGG TAAGCAACCC AAAAAAAAAA 721 ACTTACGCAC AAAAAGGTCA CTCACTGGGC CGTATTCGCC CCAGGGGAGT AAAATCGCCC 781 GCTCAGTAAT ATGTTTAGTC ATGTGATCTG GCTTGTGTTT GGTCAACCGC AGCATAGCCG 841 A</p>
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543	<p>1 TCCATAGGGG GGAAAGAGAA CCCACCGGGG TTGCCTCTTG TACGGCGAAT GTGAAGCGGC 61 ACAGCTCAAT TTGAAAGCTG GCCTTCGGGT CCGCATTGTA ATTTGTAGAG GATGCTTTGG 121 GGCAGCCGCC TGTCTAAGTT CCTTGGAACA GGACGTCATA GAGGGTGAGA ATCCCGTATG 181 TGACAGGACA TGGTGAGAAAT CCGTATGTG ACAGGACATG GCACCCATATG TAAAGCTCGA 241 GTTGTTTGGG AATGACGCTC TAAATGGGAG GTAAATTTCT TCTAAAGCTA AATACCGGCG 301 AGAGACCGAT AGCGCACAAG TAGAGTGATC GAAAGATGAA AAGCACTTTG GAAAGAGAGT 361 TAAAAAGCAC GTGAAATTGT TGAAAGGGAA GCGCTTGCAA CAGACTTGTT TTGACTGTTC 421 GGCCGGTCTT CTGACCGGTT TTATTTTCAGG TCCTGGGACC AGGGCCAGG CATTGATTT 481 TTGGGCGGGC CCGGATAAAG GCTCAGGGAA TGTGGCTCTC GCTTCGGCGG GAGTGTGATA 541 GCCCTGGGTG TAATACGGCC AGCCGGATCT GACGTCCGCG CTACGCTAGA TGATGCGTAC 601 TCACAAGCAG TACACGACCC GTCTTAAACC CCGGGACCAA AAAACGGGCC AGGCGGGGCC 661 CGAGAAAACC</p>

4.1.2.3 ผลการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับ นิวคลีโอไทด์ กับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล

Genbank

จากการนำลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ความยาว 1,293 และ 1,418 คู่เบส มาตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ ที่คล้ายคลึงกันในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLAST จากนั้นนำลำดับ นิวคลีโอไทด์ ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด 5 อันดับแรกมาทำ Pairwise alignment โดยพบว่า เปอร์เซ็นต์ nucleotide identity มีค่าระหว่าง 95 - 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10)

จากการนำลำดับ นิวคลีโอไทด์ บริเวณ LSU ความยาว 841 และ 829 คู่เบส มาตรวจหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ ที่คล้ายคลึงกันในฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLAST จากนั้นนำลำดับ นิวคลีโอไทด์ ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด 5 อันดับแรกมาทำ Pairwise alignment โดยพบว่า เปอร์เซ็นต์ nucleotide identity มีค่าระหว่าง 87 - 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 Nucleotide sequence identity (%) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด 5 อันดับ

ชนิด/สายพันธุ์	Accession Number	ชนิด/สายพันธุ์ที่พบใน Genbank	Identical base/ total base compared	Gaps	Nucleotide identity (%)
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539	EU719518.1	<i>Aureobasidium</i> sp. NRRL 58539	493/497	2/480	100
	EU719513.1	<i>Aureobasidium</i> sp. NRRL 58543	493/497	2/497	99
	HM807619.1	<i>Aureobasidium</i> sp. E7405b	469/480	3/480	99
	FN665416.1	<i>Aureobasidium</i> sp. RBSS-303	474/497	12/497	97
	AB568372.1	<i>Aureobasidium</i> sp. HB125	444/456	3/456	97
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543	EU719518.1	<i>Aureobasidium</i> sp. NRRL 58543	496/512	15/512	97
	EU719513.1	<i>Aureobasidium</i> sp. NRRL 58539	496/512	15/512	97
	HM807619.1	<i>Aureobasidium</i> sp. E7405b	487/511	17/511	95
	AB568372.1	<i>Aureobasidium</i> sp. HB125	464/488	17/488	95
	AB568371.1	<i>Aureobasidium</i> sp. HB110	460/484	17/484	95

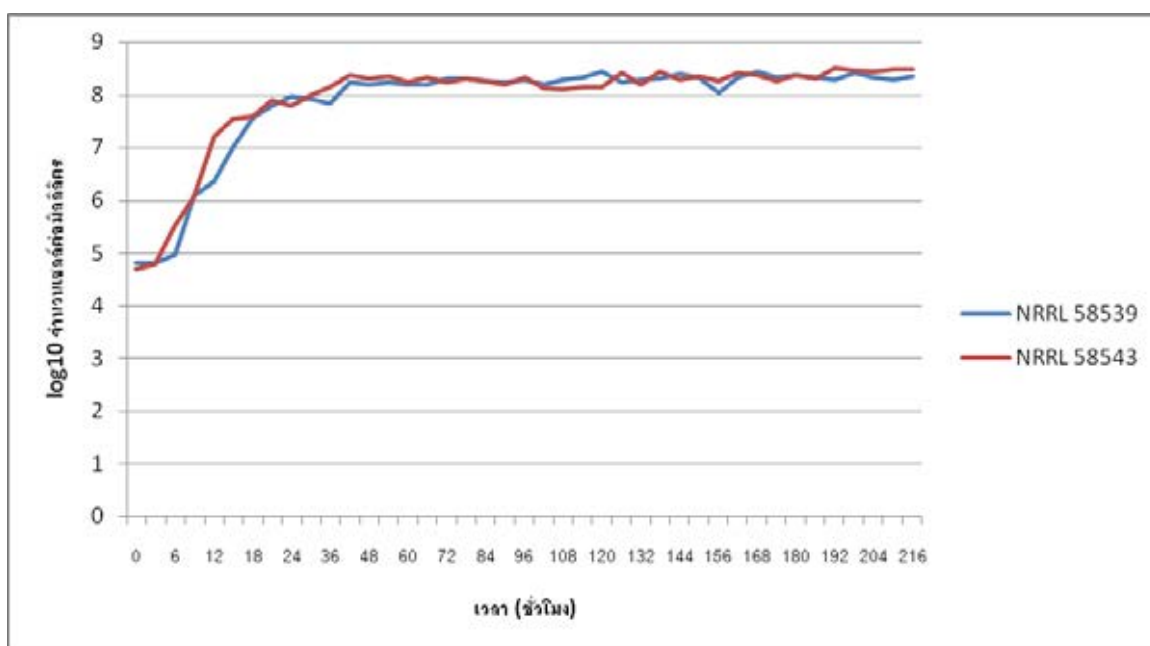
ตารางที่ 11 Nucleotide sequence identity (%) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล Genbank ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด 5 อันดับ

ชนิด/สายพันธุ์	Accession Number	ชนิด/สายพันธุ์ที่พบใน Genbank	Identical base/ total base compared	Gaps	Nucleotide identity (%)
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539	AB568343.1	<i>Aureobasidium</i> sp. HB110	506/508	0/508	99
	FJ896010.1	<i>Rhodotorula</i> sp. SF4L02	555/563	2/563	99
	HQ220210.1	<i>Aureobasidium</i> sp. YM24372	531/548	1/548	97
	AM236013.2	<i>Aureobasidium</i> sp. YS67	547/571	2/571	97
	JQ916049.1	<i>A. pullulans</i> isolate OF-01	546/571	2/571	96
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543	JQ011321.1	<i>A. pullulans</i> isolate Z-19	517/597	44/597	87
	FJ150934.1	<i>A. pullulans</i> var. <i>subglaciale</i> strain EXF-2480	515/595	43/595	87
	FJ150919.1	<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> strain dH 12640	514/594	41/594	87
	FJ150921.1	<i>A. pullulans</i> var. <i>melanogenum</i> strain CBS 621.80	514/594	41/594	87
	FJ150937.1	<i>A. pullulans</i> var. <i>namibiae</i> strain CBS 147.97	509/588	40/588	87

4.2 ศึกษาการเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

4.2.1 การเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีการเติบโตในช่วง lag phase ใน 6 ชั่วโมงแรกหลังการลงเชื้อ จากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วเข้าสู่ช่วง log phase ระหว่างชั่วโมงที่ 6–24 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และหลังจาก 24 ชั่วโมงพบว่า มีจำนวนเซลล์คงที่ (stationary phase) (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 การเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 9 วัน

4.2.2 การผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

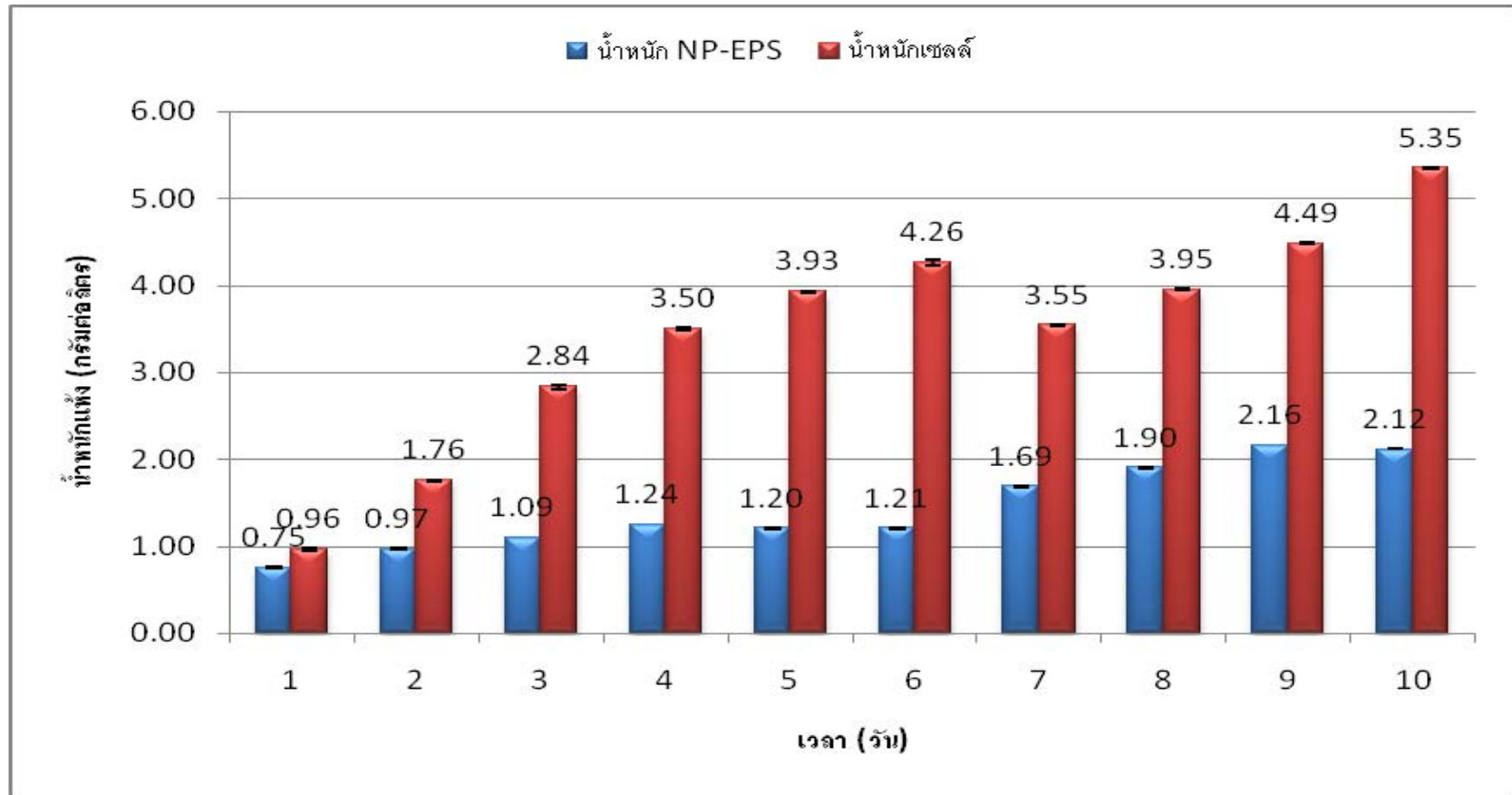
A. pullulans สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ผลิต NP-EPS ได้มากที่สุด ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง คือ 2.16 ± 0.00 และ 2.43 ± 0.01 กรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งคือ 4.49 ± 0.01 และ 4.99 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 12 รูปที่ 9, 10) ซึ่ง *A. pullulans*

สายพันธุ์ NRRL 58543 มีแนวโน้มว่าสามารถผลิต NP-EPS ได้มากกว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเลือก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สำหรับการศึกษากาษาที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS ต่อไป

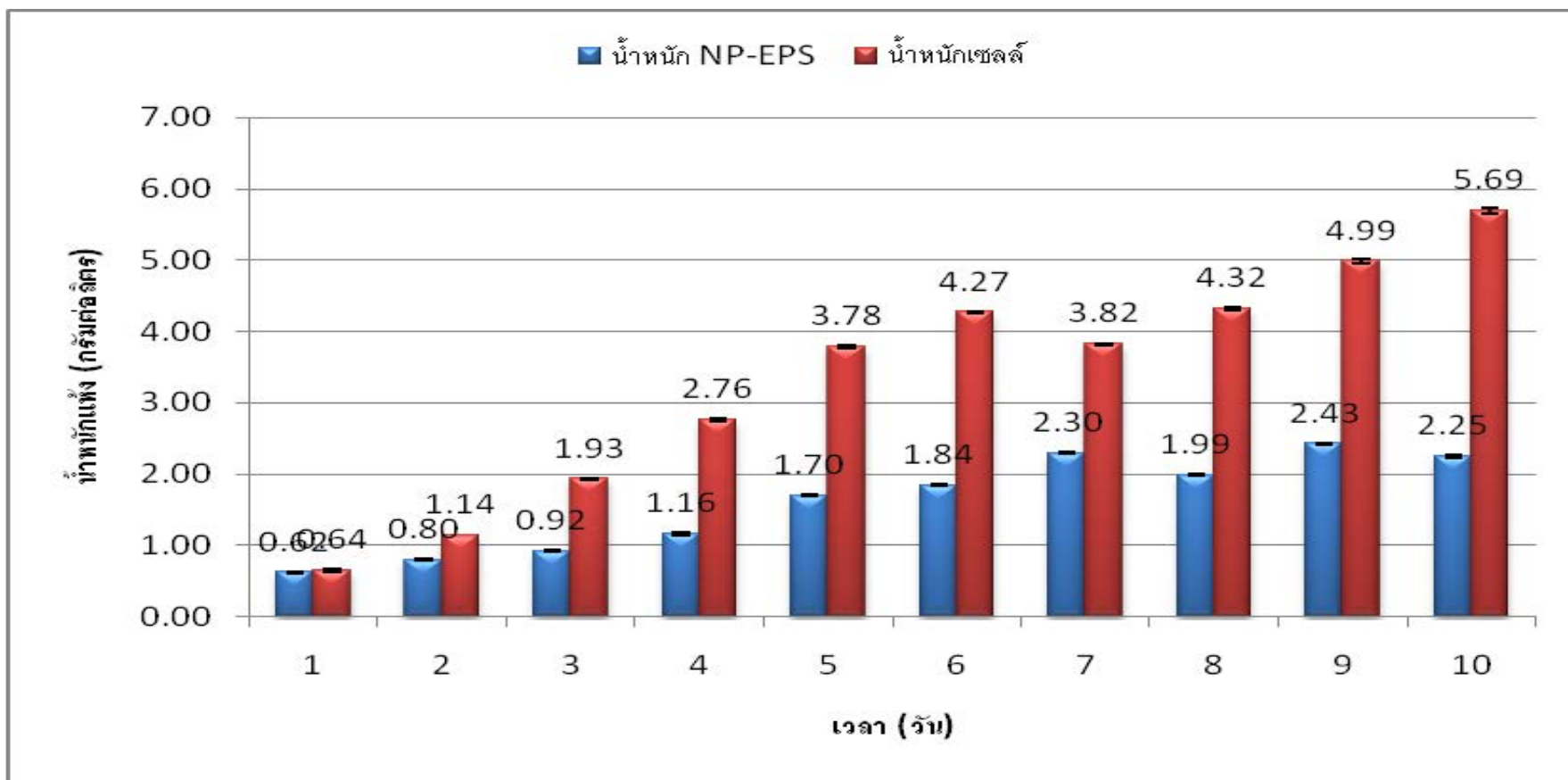
ตารางที่ 12 นำหนักแห้ง NP-EPS และนำหนักแห้งเซลล์ ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครส 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และ เปปโตน 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน

วัน	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)*			
	NRRL 58539		NRRL 58543	
	NP-EPS	เซลล์	NP-EPS	เซลล์
1	0.75±0.01	0.96±0.02	0.62±0.01	0.64±0.01
2	0.97±0.00	1.76±0.01	0.79±0.00	1.14±0.01
3	1.09±0.00	2.84±0.03	0.92±0.00	1.93±0.01
4	1.24±0.01	3.50±0.01	1.16±0.02	2.76±0.03
5	1.20±0.00	3.93±0.00	1.70±0.02	3.78±0.02
6	1.21±0.01	4.26±0.039	1.84±0.01	4.27±0.01
7	1.69±0.01	3.55±0.00	2.30±0.01	3.82±0.01
8	1.90±0.01	3.95±0.01	1.99±0.01	4.32±0.02
9	2.16±0.00	4.49±0.01	2.43±0.01	4.99±0.03
10	2.12±0.01	5.35±0.01	2.25±0.02	5.69±0.03

*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 9 การเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 ในอาหารสูตร PM เข้าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



รูปที่ 10 การเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 วัน ตัวเลขเหนือกราฟแท่งแสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ บาร์แสดงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.3 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

4.3.1 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ

เมื่อนำ NP-EPS มาทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ ประกอบด้วย α -amylase pullulanase glucoamylase และ β -glucanase พบว่า NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีความไวต่อเอนไซม์ pullulanase และ glucoamylase น้อยมาก เมื่อเทียบกับพุลลูแลนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์อ้างอิง (NRRL 58560) และพุลลูแลนมาตรฐาน (Sigma Chemical, USA และ Hayashibara Co., Ltd., Japan) นอกจากนี้ยังพบว่า NP-EPS จากทั้ง 2 สายพันธุ์มีความไวต่อเอนไซม์ β -glucanase มากคล้ายคลึงกับออบาซิเดน ในขณะที่เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ทุกชนิดที่ทดสอบมีความต้านทานต่อเอนไซม์ α -amylase ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 13)

4.3.2 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) เปรียบเทียบกับพุลลูแลนมาตรฐาน (Sigma Chemical, USA และ Hayashibara Co., Ltd., Japan) พบว่าโครงสร้างของพุลลูแลนมาตรฐาน และ NP-EPS มีหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ที่ประกอบด้วย alkane, carbonyl, ether, hydroxyl, hydroxyl bonding in alcohol และ primary alcohol เหมือนกัน แต่ใน NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ไม่พบหมู่ฟังก์ชัน α -configuration แต่พบหมู่ฟังก์ชันที่เป็น β -configuration เช่นเดียวกับออบาซิเดนที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* สายพันธุ์ NRRL 58013 โดยจะมีพีคที่ตำแหน่ง $\lambda = 879.61$ 887.49 และ 891.88 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากพุลลูแลนมาตรฐาน และ พุลลูแลนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58560 ที่มีหมู่ฟังก์ชัน α -configuration โดยมีพีคที่ตำแหน่ง $\lambda = 847.95$ 847.94 และ 849.16 cm^{-1} ตามลำดับ แต่ไม่พบหมู่ฟังก์ชัน β -configuration (ตารางที่ 14) (รูปที่ 11-16)

ตารางที่ 13 ความไวของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ต่อเอนไซม์ pullulanase α -amylase glucoamylase และ β -glucanase เปรียบเทียบกับเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดออบาซิเดนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58013 พุลลูแลนมาตรฐาน (Sigma และ Hayashibara) และพุลลูแลนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58560

EPS/ source	Sensitivity (%)			
	Pullulanase ^a	α -Amylase ^b	Glucoamylase ^c	β -Glucanase ^d
EPS/ NRRL 58539	12.2±0.6 ^c	2.5±0.3	3.5±1	88.6±4.4
EPS/ NRRL 58543	13.5±0.6	3.5±0.3	ND ^f	91.4±4.4
aubasidan/ NRRL 58013	12.2±0.0	1.8±0.2	4.3±0.4	100.0 ^d
pullulan/ NRRL 58560	77.7±0.3	3.5±0.2	52.5±0.3	ND ^f
pullulan/ Sigma (USA)	100.0 ^a	2.8±0.3	52.9±0.7	ND ^f
pullulan/ Hayashibara (Japan)	97.0±0.3	2.9±0.4	44.8±0.9	ND ^f
Soluble starch	12.0±0.3	100.0 ^b	100.0 ^c	ND ^f

^a เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของพุลลูแลนมาตรฐาน (Sigma, USA) ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pullulanase

^{b,c} เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของ soluble starch ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α -amylase หรือ glucoamylase

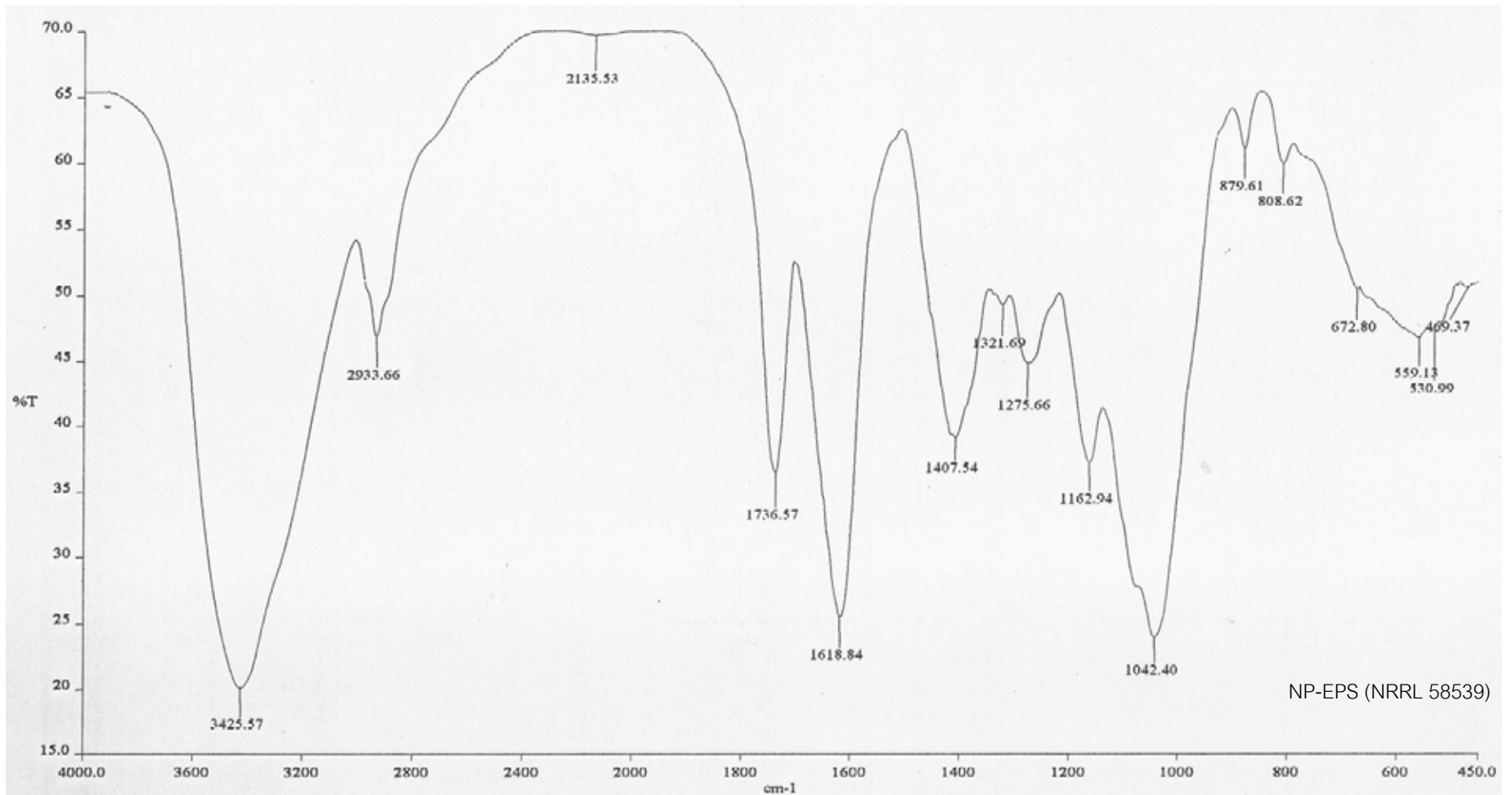
^d เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของออบาซิเดน (ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58013) ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ β -glucanase

^e ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

^f nd = not detectable

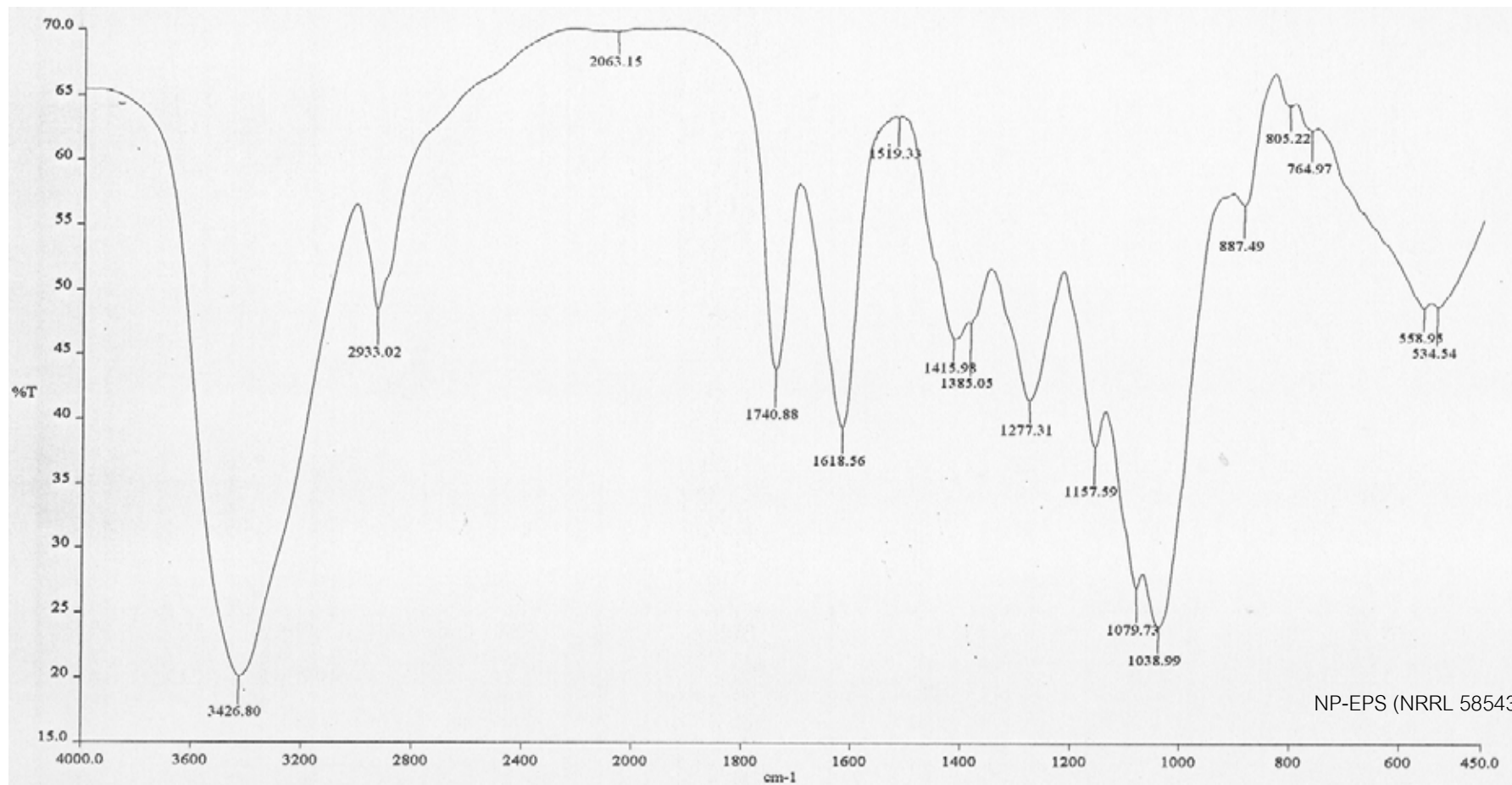
ตารางที่ 14 หมู่ฟังก์ชัน และตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก FTIR สเปกตรัมของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 NRRL 58543 NRRL 58560 และ NRRL 58013 เปรียบเทียบกับพอลูลูแลนมาตรฐาน

หมู่ฟังก์ชัน	ตำแหน่งพีก (wavenumber, cm ⁻¹)					
	NP-EPS (NRRL 58539)	NP-EPS (NRRL 58543)	ออบาซิเดน (NRRL 58013)	พอลูลูแลน (NRRL 58560)	พอลูลูแลน (sigma)	พอลูลูแลน (Hayashibara)
			3428.40			3434.16
-OH	3425.57	3426.80	2928.09	3433.23	3433.76	2928.95
-C-H	2933.66	2933.02	2131.33	2928.37	2928.32	2147.61
C=O	2135.53	2063.15	1425.05	2144.20	2074.99	1423.75
-C-OH	1407.54	1415.98	1373.92	1426.94	1427.60	1366.83
-OH bonding in alcohol	1321.69	1385.05	1078.76	1370.35	1365.61	1080.98
C-O	1042.40	1079.73	-	1020.16	1080.10	847.94
α -configuration	-	-	-	849.16	847.95	-
β -configuration	879.61	887.49	891.88	-	-	-



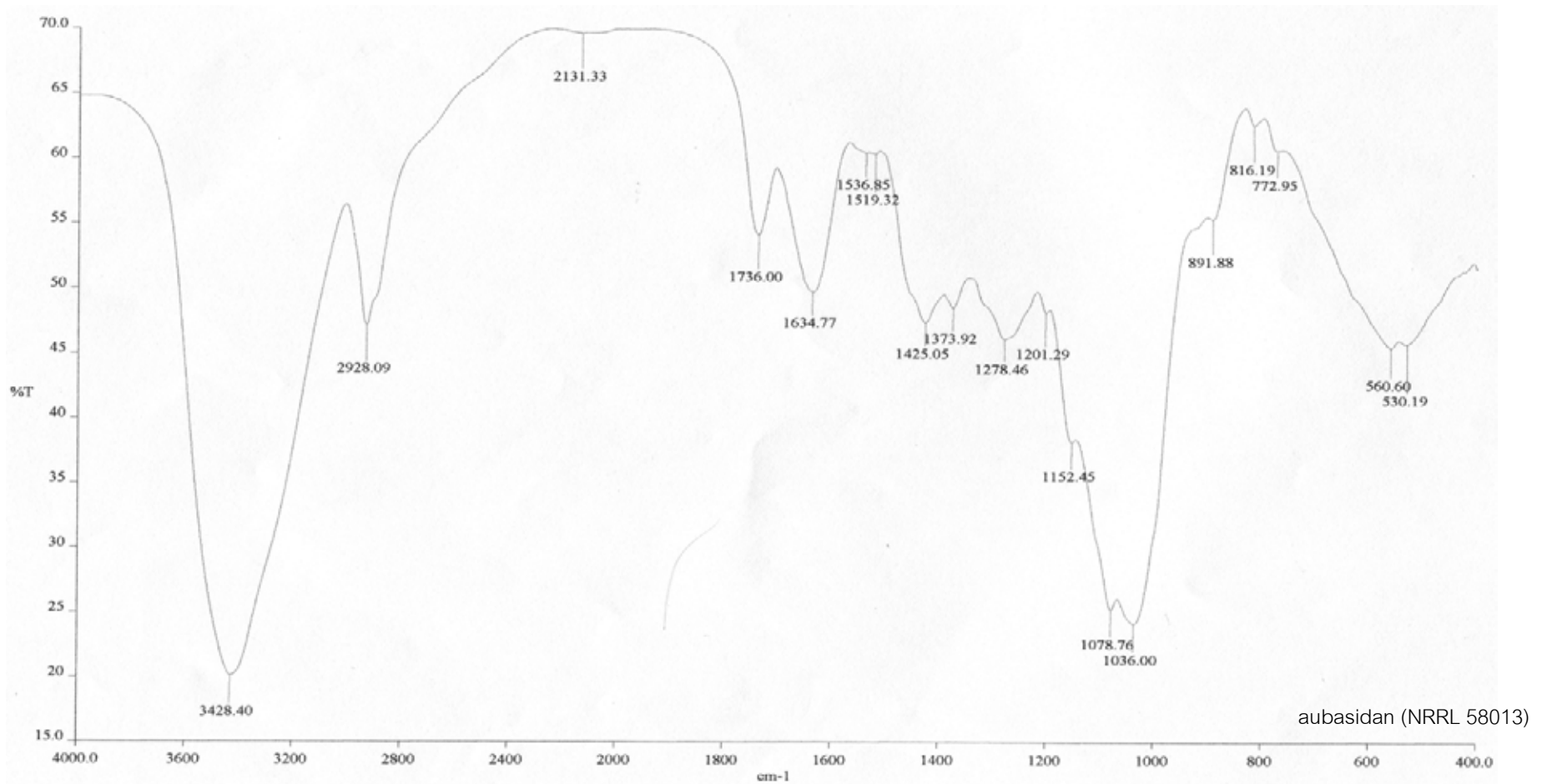
NP-EPS (NRRL 58539)

รูปที่ 11 FT-IR spectrum ของ NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539

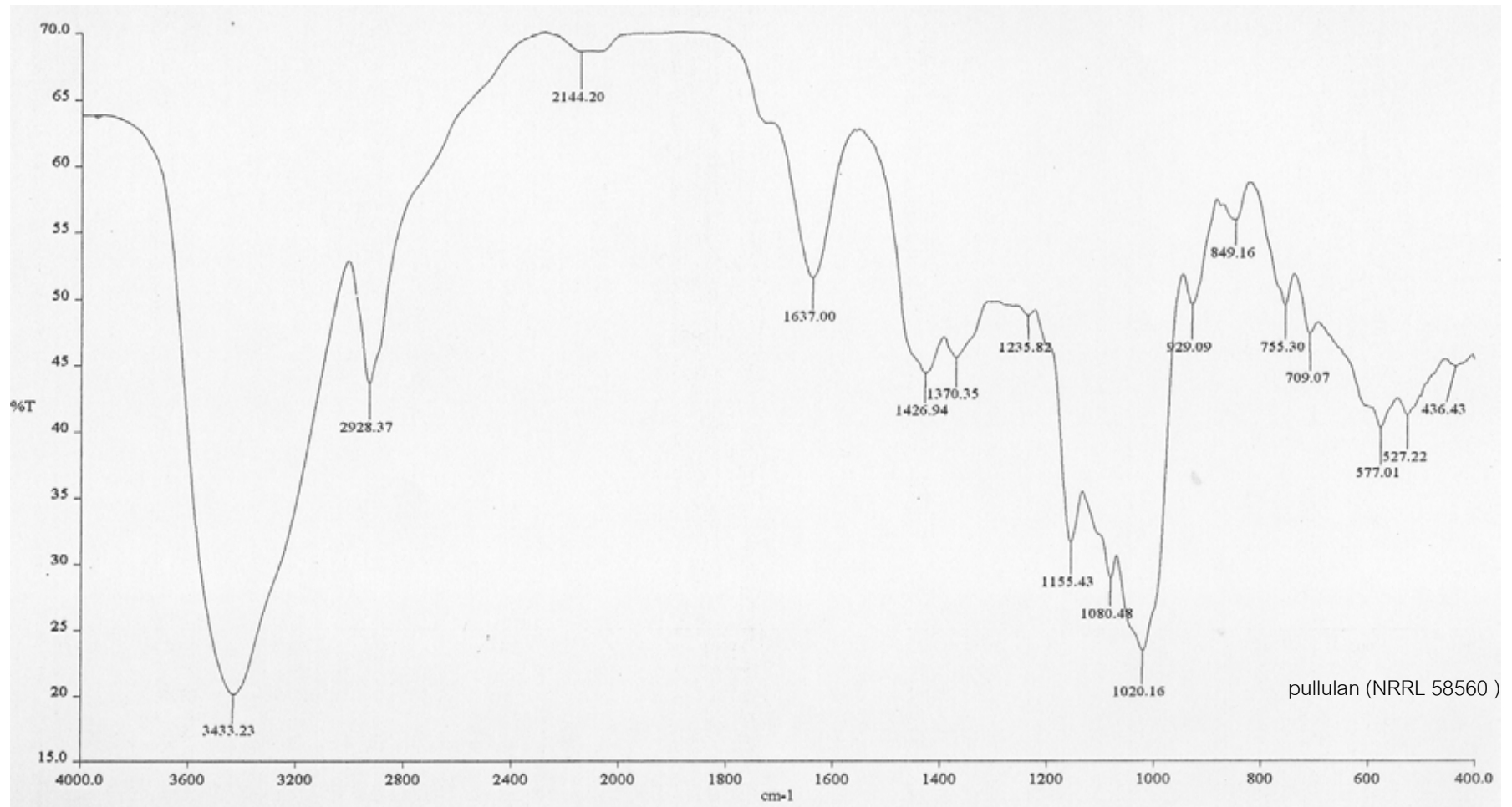


NP-EPS (NRRL 58543)

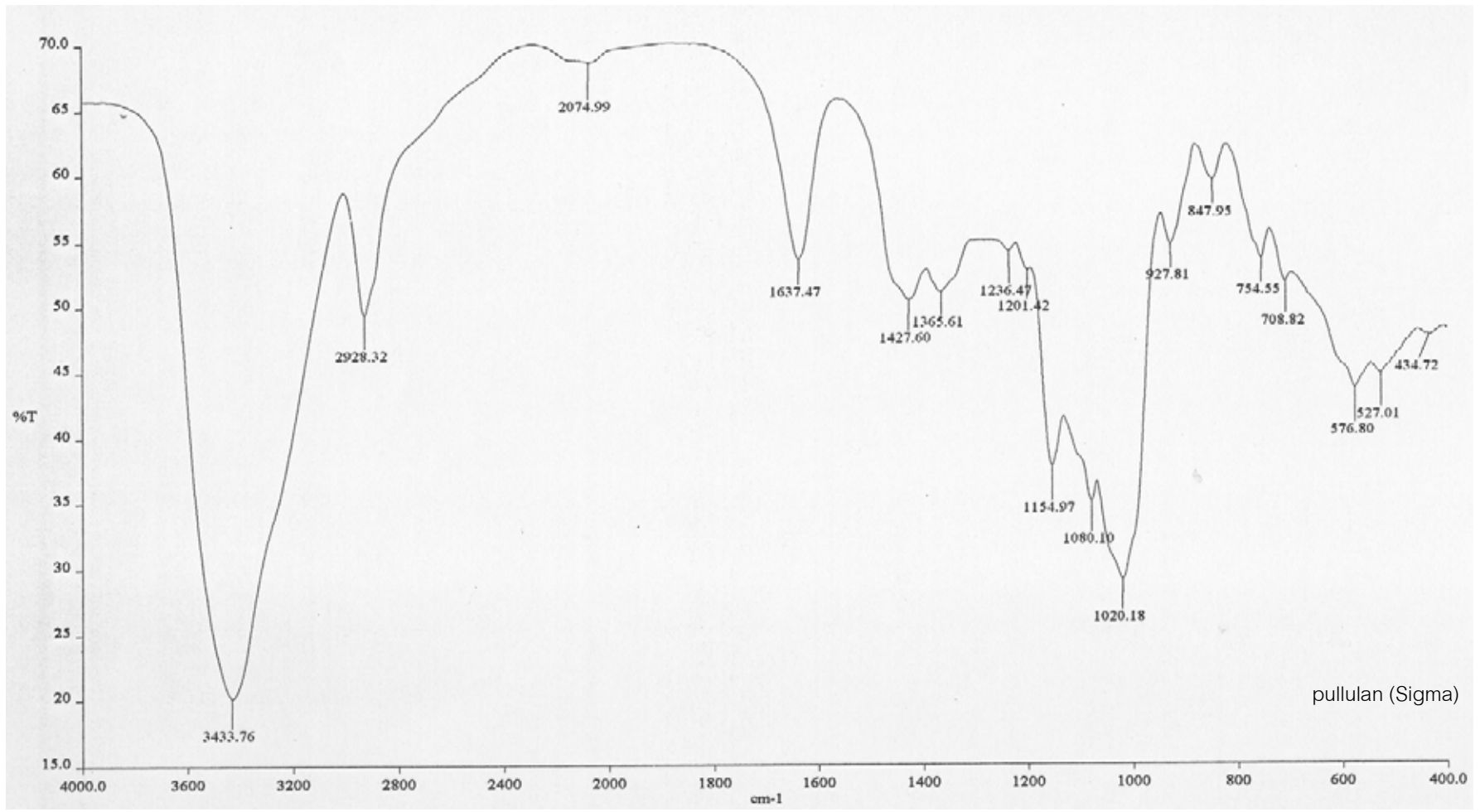
รูปที่ 12 FT-IR spectrum ของ NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543



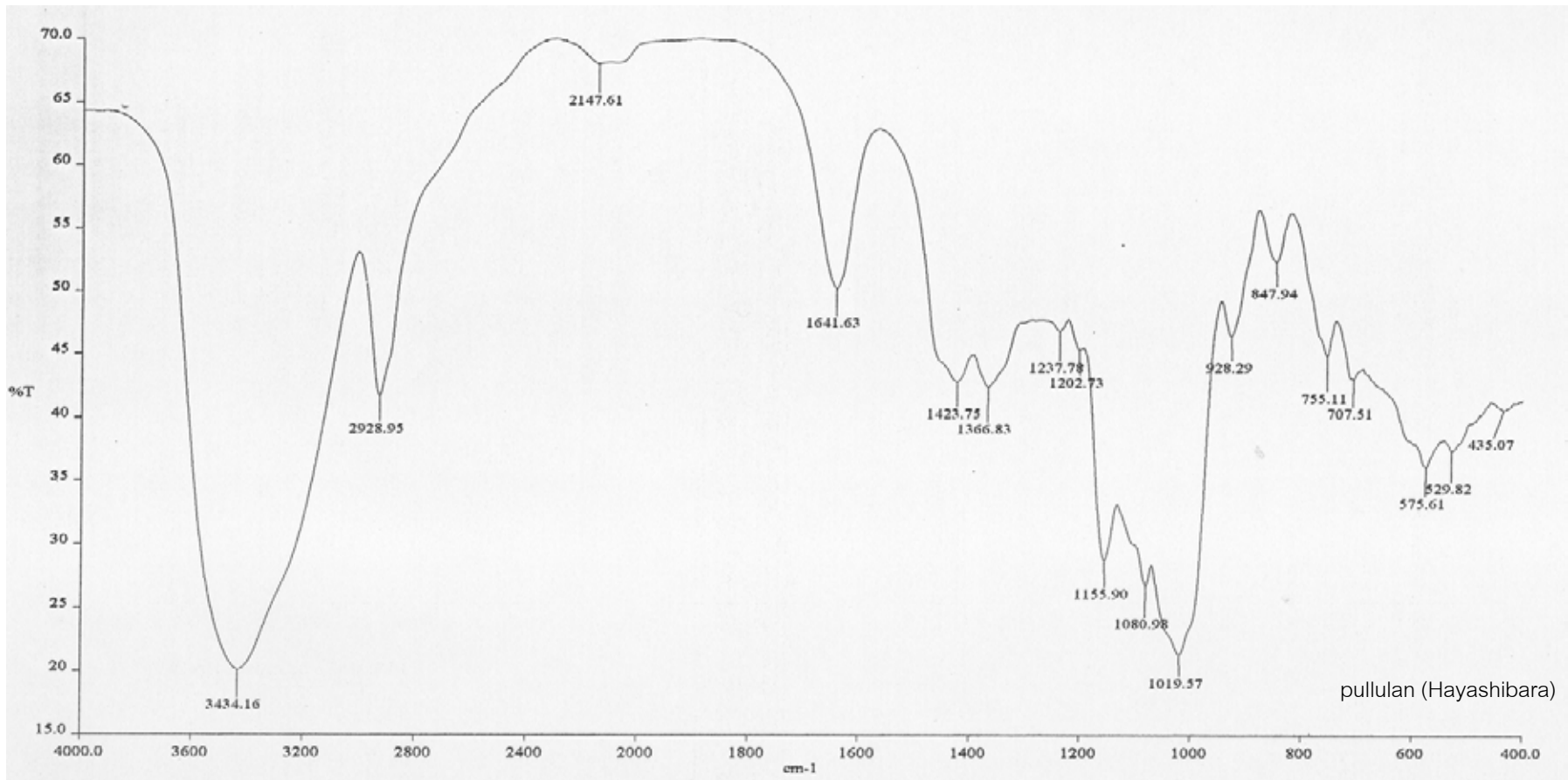
รูปที่ 13 FT-IR spectrum ของออบาซิเดนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58013



รูปที่ 14 FT-IR spectrum ของพอลิกลูแลนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58560



รูปที่ 15 FT-IR spectrum ของพุลลูแลนมาตรฐาน Sigma Chemical, USA

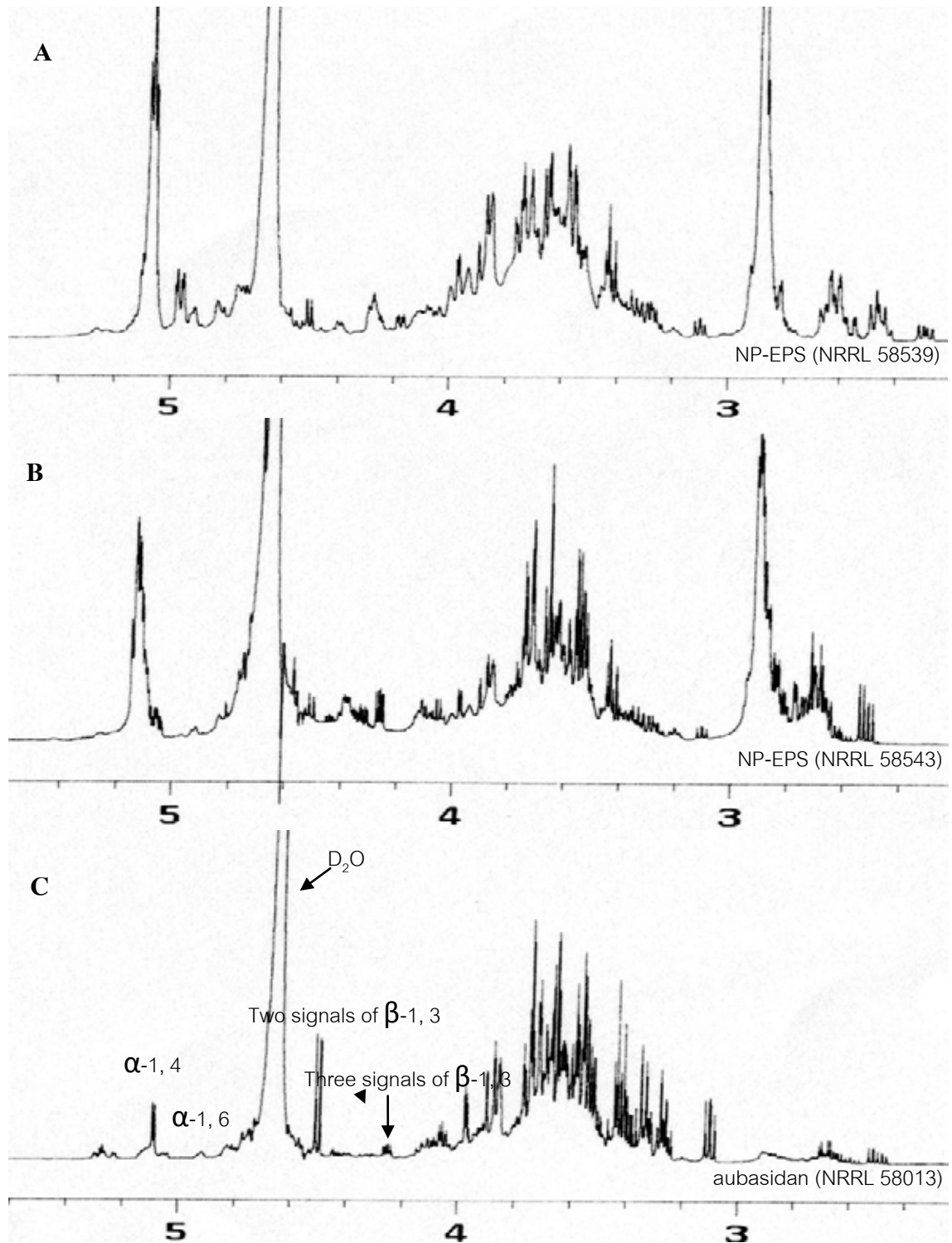


รูปที่ 16 FT-IR spectrum ของพอลิกลูแคนมาตรฐาน Hayashibara Co., Ltd., Japan

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนสเปค - โตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) ชนิด ^{13}C และ ^1H เปรียบเทียบกับ ออบาซิแดนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58013 พบว่าโครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิต จาก NRRL 58539 มีพิก $^1\text{H-NMR}$ ที่แสดง β -1, 3 (4.497 - 4.650 ppm) β -1, 6 (4.266 - 4.289 ppm) α -1, 4 (4.266 - 4.289 ppm) และ α -1, 6 (4.916 ppm) ส่วนโครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตจาก NRRL 58543 มีพิก $^1\text{H-NMR}$ ที่แสดง β -1, 3 (4.407 - 4.498 ppm) β -1, 6 (4.250 - 4.274 ppm) α -1, 4 (5.110 - 5.149 ppm) และ α -1, 6 (4.916 ppm) configurations ซึ่งคล้ายกันกับโครงสร้าง ออบาซิแดน คือมีพิก $^1\text{H-NMR}$ ที่แสดง β -1, 3 (4.497 - 4.513 ppm) β -1, 6 (4.241 - 4.265 ppm) α -1, 4 (5.226 - 5.299 ppm) และ α -1, 6 (4.918 ppm) configurations ในส่วนการตรวจสอบ โครงสร้างด้วยเทคนิค $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่า โครงสร้างของ NP-EPS มีพิกขึ้นที่บริเวณ C-1 ของ α -1, 6 (ประมาณ 98.251 – 98.623 ppm) C-3 ของ β -1, 3 (ประมาณ 81.000-84.063 ppm) O-substituted C-6 (ประมาณ 66.070 – 66.605 ppm) และ C-6 (ประมาณ 63.296 – 63.547 ppm) คล้ายกันกับ ออบาซิแดน แต่โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตจาก สายพันธุ์ NRRL 58543 ไม่พบพิก C-1 ของ α -1, 4 (ประมาณ 100.775 – 100.789 ppm) และ C-4 (ประมาณ 78.661 – 79.115 ppm) ในขณะที่ ในโครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตจากสายพันธุ์ NRRL 58539 และออบาซิแดน มีพิกชนิดนี้ และไม่ พบพิก C-1 ของ β -1,6 (ประมาณ 104.200 ppm) ในโครงสร้างของ NP-EPS ของทั้ง 2 สายพันธุ์ ในขณะที่พบพิกชนิดนี้ในโครงสร้างออบาซิแดน (ตารางที่ 15, 16) (รูปที่ 17, 18)

ตารางที่ 15 ตำแหน่งพิกหลักซึ่งได้จาก $^1\text{H-NMR}$ สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของ เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

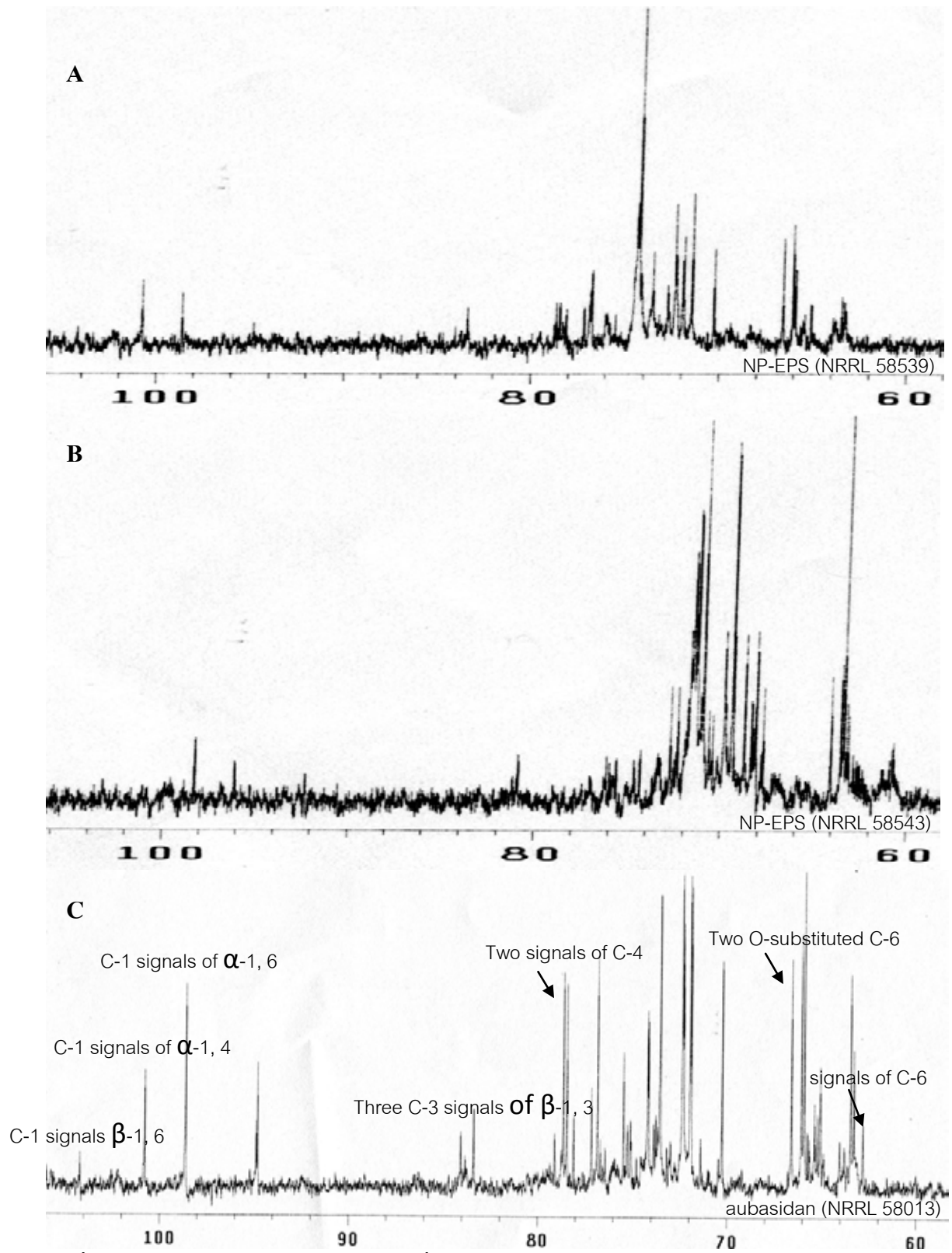
Signal	$^1\text{H-NMR}$ chemical shift (ppm.)		
	NP-EPS (NRRL 58539)	NP-EPS (NRRL 58543)	ออบาซีแดน (NRRL 58013)
α -1, 4	5.049 5.062 5.073 5.086 5.102 และ 5.110	5.110 5.117 5.119 5.125 5.135 5.138 และ 5.149	5.226 5.234 5.262 5.271 5.279 5.292 และ 5.299
α -1, 6	4.916	4.916	4.918
β -1,3	4.497 4.513 และ 4.650	4.407 4.440 และ 4.498	4.497 และ 4.513
β -1,6	4.266 4.272 4.278 และ 4.289	4.250 4.258 4.265 และ 4.274	4.241 4.249 และ 4.265



รูปที่ 17 $^1\text{H-NMR}$ spectrum ของ NP-EPS ที่ผลิตจาก (A) *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ (B) NRRL 58543 เปรียบเทียบกับออบาซิเดนที่ผลิตจาก (C) *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL58013

ตารางที่ 16 ตำแหน่งพิกหลักซึ่งได้จาก ^{13}C -NMR สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์

Signal	^{13}C -NMR chemical shift (ppm.)		
	NP-EPS (NRRL 58539)	NP-EPS (NRRL 58543)	ออบาซิเดน (NRRL 58013)
C-1 of α -1,4	100.789	-	100.775
C-1 of α -1,6	98.623	98.251	98.615
C-1 of β -1,6	-	-	104.200
C-3 of β -1,3	83.390	81.000	83.382 83.829 และ 84.063
C-4	78.127 78.471 และ 78.661	-	78.097 78.463 78.654 และ 79.115
O-substituted C-6	66.078 และ 66.605	67.8	66.070 และ 66.598
C-6	63.311 และ 63.465	63.400 และ 63.547	63.296 และ 63.457



รูปที่ 18 ^{13}C -NMR spectrum ของ NP-EPS ที่ผลิตจาก (A) *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ (B) NRRL 58543 เปรียบเทียบกับออบาซิเดนที่ผลิตจาก (C) *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL58013

4.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS จาก *A. pullulans*

หลังจากทำการศึกษาการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้มากกว่า จึงคัดเลือก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS โดยทำการปรับองค์ประกอบของอาหารสูตร PM และภาวะในการเลี้ยงตามลำดับ ดังนี้

4.4.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิต NP-EPS โดยเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM ที่ปรับองค์ประกอบชนิดของคาร์บอน ซึ่งประกอบด้วย ซูโครส ฟรุกโทส และกลูโคส ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และชนิดของไนโตรเจน ซึ่งประกอบด้วย เปปโตเนอ แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเตรท ที่ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้มากที่สุด ในอาหารที่มีซูโครส และโซเดียมไนเตรท ที่ 3.53 ± 0.03 กรัมต่อลิตร รองลงมาได้แก่ อาหารที่มีซูโครส และเปปโตเนอ ที่ 2.83 ± 0.00 กรัมต่อลิตร และ อาหารที่มีกลูโคส และโซเดียมไนเตรทที่ 2.44 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับในสูตรอาหารอื่นๆ พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้น้อยกว่า 2.0 กรัมต่อลิตร ส่วนการเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันพบว่า การเติบโตและการผลิต NP-EPS ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กันคือ สูตรอาหารที่สามารถผลิต NP-EPS ได้มาก การเติบโตก็มากด้วยเช่นเดียวกัน ยกเว้น สูตรอาหารที่ประกอบด้วยฟรุกโทส และโซเดียมไนเตรท ซูโครส และแอมโมเนียมซัลเฟต กลูโคส และ แอมโมเนียมซัลเฟต ที่สามารถผลิต NP-EPS ได้น้อย ในขณะที่การเติบโตได้ดี (ตารางที่ 17) (รูปที่ 18)

ตารางที่ 17 น้ำหนักแห้ง NP-EPS (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักแห้งเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอน (5.0% (w/v)) และแหล่งไนโตรเจน (0.06% (w/v)) ชนิดต่างๆ โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน

Carbon+Nitrogen	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)*	
	NP-EPS	เซลล์
Fructose+peptone	1.31±0.01 ^{ab*}	6.63±0.03 ^A
Fructose+(NH ₄) ₂ SO ₄	1.39±0.04 ^{ab}	6.68±0.01 ^A
Fructose+NaNO ₃	1.11±0.01 ^a	10.27±0.03 ^{CD}
Sucrose+(NH ₄) ₂ SO ₄	1.68±0.02 ^c	10.10±0.01 ^G
Sucrose+peptone	2.83±0.00 ^{bc}	13.79±0.03 ^C
Sucrose+NaNO ₃	3.53±0.03 ^f	11.29±0.03 ^{EF}
Glucose+peptone	1.58±0.02 ^{bc}	8.58±0.01 ^B
Glucose+(NH ₄) ₂ SO ₄	1.81±0.03 ^c	10.77±0.05 ^{DE}
Glucose+NaNO ₃	2.44±0.01 ^d	11.91±0.08 ^F

*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

จากผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต NP-EPS พบว่าซูโครสและโซเดียมไนเตรทสามารถเพิ่มปริมาณ NP-EPS ที่ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ผลิตได้เป็น 0.8 เท่า จึงเลือกมาเพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และนำผลที่ได้ (ตารางที่ 17) มาวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) โดยมีปัจจัยที่ศึกษาจำนวน 2 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นของซูโครส และความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ประกอบด้วยชุดทดลองจำนวน 9 ชุดทดลอง (ตารางที่ 18) พบว่า ที่ความเข้มข้นของซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (X_1) และ โซเดียมไนเตรท 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (X_2) สามารถผลิต NP-EPS ได้มากที่สุด เท่ากับ 10.25±0.01 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 18 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนองต่อปัจจัยศึกษาที่ได้ (น้ำหนัก NP-EPS) สำหรับการศึกษาค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมของการผลิต NP-EPS โดย *A. pullulans* NRRL 58543

ปัจจัย		รหัสของปัจจัย		น้ำหนัก NP-EPS (กรัมต่อลิตร)*
Sucrose (%) (w/v)	NaNO ₃ (%) (w/v)	X ₁	X ₂	
5.0	0.04	-1	-1	4.82±0.01
5.0	0.06	-1	0	6.67±0.04
5.0	0.08	-1	1	6.21±0.01
6.0	0.04	0	-1	8.14±0.03
6.0	0.06	0	0	10.25±0.01
6.0	0.08	0	1	5.66±0.02
7.0	0.04	1	-1	5.99±0.01
7.0	0.06	1	0	5.38±0.02
7.0	0.08	1	1	4.73±0.01

*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

นำผลการทดลองที่ได้ มาใช้ในการสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ (regression) ระหว่างความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน และการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 โดยใช้โปรแกรม JMP software (StatSoft Inc., USA) เวอร์ชัน 10 ได้ สมการรีดิสชันดังนี้

$$Y = 9.507 - 0.267X_1 - 0.383X_2 - 0.675 X_1X_2 - 2.664X_1^2 - 1.814X_2^2$$

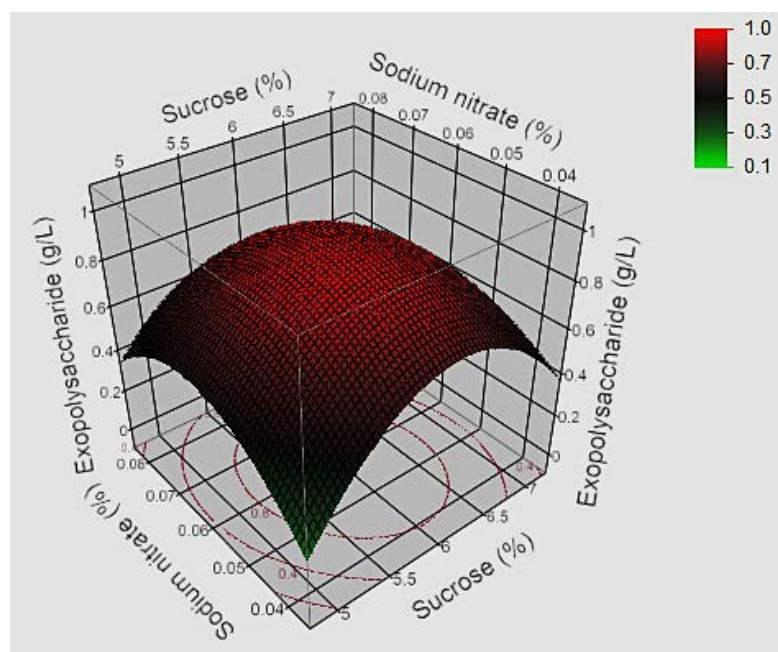
โดย Y คือ ค่าตอบสนองต่อการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 (กรัมต่อลิตร)

X₁ คือ ซูโครส (เปอร์เซ็นต์ (w/v))

X₂ คือ โซเดียมไนเตรท (เปอร์เซ็นต์ (w/v))

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร พบว่า ค่า R^2 เท่ากับ 0.82 แสดงว่า การตอบสนองตามสมการดังกล่าวเป็นผลมาจากตัวแปรในค่าตอบสนอง 82.0 เปอร์เซ็นต์ และตัวแปร X และ Y มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า $P = 0.11$

แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (contour plot) ถูกนำมาใช้ในการคำนวณหาค่าที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัย ที่ส่งผลให้ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้สูงที่สุด จากรูปที่ 19 แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของความเข้มข้นของซูโครส และความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ต่อการผลิต NP-EPS



รูปที่ 19 ภาพพื้นผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซูโครส และโซเดียมไนเตรท ต่อน้ำหนักของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543

จากการทดสอบสมการรีเกรสชันที่ทำนายการผลิต NP-EPS จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 โดยทำการทดลองซ้ำในภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตามที่สมการคำนวณได้อีกครั้งหนึ่ง พบว่าสามารถผลิต NP-EPS ได้ 7.70 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่สมการทำนายได้ (7.35 - 11.74 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นแสดงว่าสมการที่ได้จากแผนการทดลอง CCD ข้างต้น สามารถนำมาใช้ในการอธิบายการผลิต NP-EPS จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ได้อย่างแม่นยำ

4.4.2 ศึกษาระดับความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

เมื่อศึกษาผลของความเป็นกรดต่างต่อการเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 โดยปรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารสูตร PM ที่ใช้ซูโครสความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน เป็น 5.5 6.5 และ 7.5 ก่อนทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้ดีที่สุดในเมื่อความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.5 (9.28±0.04 กรัมต่อลิตร) รองลงมาได้แก่อาหารที่มีความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 (7.70±0.02 กรัมต่อลิตร) และผลิต NP-EPS ได้น้อยที่สุดในอาหารที่มีความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 (2.16±0.00 กรัมต่อลิตร) (ตารางที่ 19) สำหรับการเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่างเริ่มต้นต่างๆ กันพบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถเติบโตในอาหารที่มีความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเป็นกรด ได้ดีกว่าที่เป็นกลาง หรือเป็นด่างอ่อน ดังนั้นปริมาณการผลิต NP-EPS จึงไม่สัมพันธ์กับการเติบโตในกรณีของ ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหาร

ตารางที่ 19 ผลของค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิต NP-EPS และการเติบโต ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และโซเดียมไนเตรท 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 9 วัน

ความเป็นกรดต่างเริ่มต้น ในอาหารสูตร PM	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อลิตร)	
	NP-EPS	เซลล์
5.5	1.09±0.01 ^{c*}	8.95±0.01 ^{A*}
6.5	7.70±0.02 ^b	6.94±0.02 ^B
7.5	9.28±0.04 ^a	5.96±0.00 ^C

*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4.4.3. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 โดยเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่มีซูโครสความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีความเป็นกรดค้างเริ่มต้นของอาหารเป็น 7.5 ในตู้บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือ 14.72 ± 0.03 กรัมต่อลิตร รองลงมา ได้แก่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คือ 9.81 ± 0.04 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และผลิตได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส คือ 0.95 ± 0.02 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 20) สำหรับการเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ที่อุณหภูมิต่างๆ กันพบว่า สามารถเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำหนักแห้ง 6.49 ± 0.02 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (6.26 ± 0.04 กรัมต่อลิตร) และเติบโตได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (0.87 ± 0.01 กรัมต่อลิตร) โดยสรุปพบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่การผลิตและการเติบโตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น

ตารางที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต NP-EPS และการเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและโซเดียมไนเตรท 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้นเป็น 7.5 เข้มข้นความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน

อุณหภูมิ (°C)	NRRL 58543	
	NP-EPS (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
อุณหภูมิห้อง (30±2)	9.28±0.04 ^{b*}	5.96±0.00 ^{B*}
25	14.72±0.03 ^a	6.49±0.02 ^A
30	9.81±0.04 ^b	6.26±0.04 ^{AB}
35	0.95±0.02 ^c	0.87±0.01 ^C

*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวตั้ง แสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

เมื่อประมวลผลจากการทดลองทั้งหมดพบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้มากที่สุด ในอาหารสูตร PM ที่มีการเปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยเปลี่ยนจากเปปโตเนมาเป็นโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้นเป็น 7.5 และเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะสามารถผลิต NP-EPS ได้สูงสุดที่ 14.72±0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่ไม่ผ่านการปรับองค์ประกอบถึง 6.06 เท่า

4.5 การทดสอบสมบัติของ NP-EPS ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

จากการทดสอบสมบัติในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 โดยเปรียบเทียบการเติบโตระหว่าง *L. acidophilus* และ *L. casei* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ใส่ NP-EPS ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

(w/v) กับอาหารเหลว MRS ที่เติม พูลลูแลน (Hayashibara Co., Ltd., Japan) บีต้ากลูแคน (food-grade) (Core-Chematis Co., Ltd., Thailand) และกลูโคส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่า NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 และบีต้ากลูแคน สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เติมกลูโคส ในขณะที่พูลลูแลนไม่สามารถกระตุ้นการเติบโตได้

ตารางที่ 21 ผลของ NP-EPS ต่อการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก *L. acidophilus* และ *L. casei*

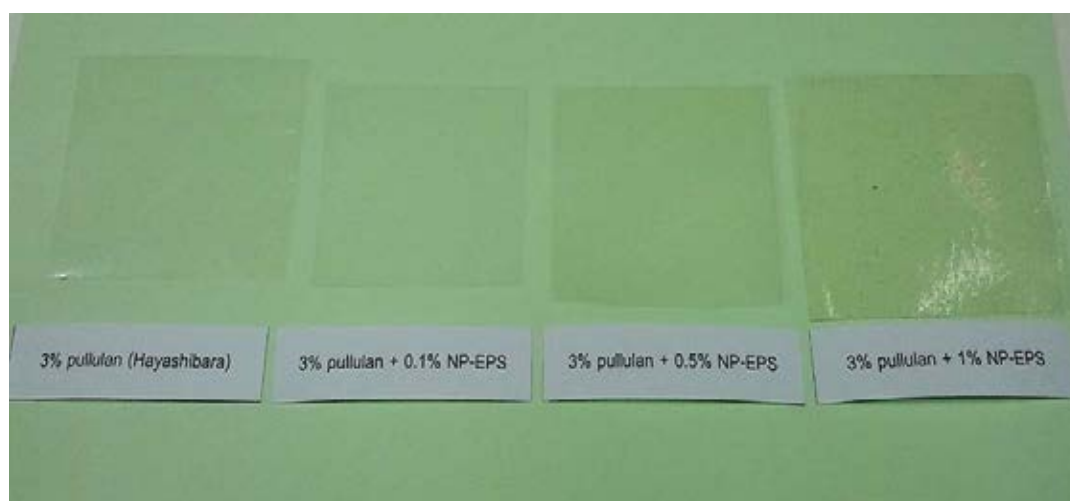
MRS medium Supplementation (w/v)	Bacterial cell density (CFU/ml), 24 ชั่วโมง หลังการลงเชื้อ	
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>
0.8% glucose (control)	$1.6 \pm 0.05 \times 10^{10} \text{ d}^*$	$1.9 \pm 0.10 \times 10^{10} \text{ C}$
0.8% pullulan	$2.1 \pm 0.07 \times 10^{10} \text{ c}$	$5.0 \pm 0.50 \times 10^8 \text{ D}$
0.8% β -glucan (<i>S. cerevisiae</i>)	$1.2 \pm 0.04 \times 10^{11} \text{ a}$	$1.9 \pm 0.04 \times 10^{11} \text{ A}$
0.8% NP-EPS	$1.1 \pm 0.05 \times 10^{11} \text{ b}$	$9.7 \pm 0.90 \times 10^{10} \text{ B}$

*ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

4.6 ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

4.6.1 การเตรียมฟิล์ม

จากการทดลองนำ NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 มาขึ้นรูปฟิล์มที่ความเข้มข้น 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ไม่สามารถลอกออกมาเป็นแผ่นฟิล์มได้ โดยจะติดแน่นกับแม่พิมพ์อะคริลิกสำหรับขึ้นรูป และที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ แผ่นฟิล์มที่ขึ้นได้มีลักษณะกรอบ เปราะ และแตกได้ง่าย ดังนั้นจึงนำ NP-EPS ไปผสมกับพูลลูแลนซึ่งมีคุณสมบัติสามารถขึ้นเป็นแผ่นฟิล์มได้ โดยใช้พูลลูแลนที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามการรายงานของปริศนา มังสา (2555) ผสมกับ NP-EPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1 0.5 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าเนื้อฟิล์มพูลลูแลนที่เติม NP-EPS จะขึ้นขึ้นเมื่อเติมความเข้มข้นของ NP-EPS สูงขึ้น จากนั้นนำฟิล์มที่ได้ไปศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพเปรียบเทียบกับฟิล์มพูลลูแลนที่เตรียมจากพูลลูแลนเกรดการค้า



รูปที่ 20 พูลลูแลนฟิล์มที่เติม NP-EPS ความเข้มข้นต่างๆ

4.6.2 ทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มที่ผลิต

ศึกษาความสามารถในการยืด (elongation) ของฟิล์ม NP-EPS ที่ผสมกับพูลลูแลน โดยเปรียบเทียบกับฟิล์มพูลลูแลนบริสุทธิ์พบว่า ค่าความทนต่อแรงดึงและเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของ พูลลูแลนฟิล์มที่เติม NP-EPS มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นของ NP-EPS ในฟิล์ม สูงขึ้น (ตารางที่ 22) โดยฟิล์มที่เติม NP-EPS ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ไม่สามารถทำการ วิเคราะห์ผลได้ เนื่องจากฟิล์มมีลักษณะเปราะ และแตกหักง่าย จนไม่สามารถตัดแผ่นฟิล์มเพื่อนำไป วิเคราะห์ค่าความแข็งแรงต่อแรงดึงได้

4.6.3 ทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มที่ผลิต

การศึกษาทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์ม โดยนำฟิล์มพูลลูแลน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ผสม NP-EPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1 0.5 1 1.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มาละลายในน้ำ พบว่า ฟิล์ม เกิดการบวมตัวและละลายกลายเป็นเจล ได้ช้าลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเติม NP-EPS ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (ตารางที่ 23) และไม่สามารถละลายได้หมด แต่จะพบเป็น ตะกอนเล็กๆ ของ NP-EPS เหลืออยู่ โดยที่ความเข้มข้นของ NP-EPS สูงขึ้นก็จะพบตะกอนเหลืออยู่ มากขึ้นด้วย

ตารางที่ 22 Tensile strength และเปอร์เซ็นต์ elongation ของฟิล์มพุลลูแลนที่เติม NP-EPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Film composition (w/v)	Tensile strength (kgf/mm ²)	Elongation (%)
3% Pullulan (Hayashibara)	128.77±5.31 ^{a*}	12.59±0.10 ^{A*}
3% Pullulan (Hayashibara) + 0.1% NP-EPS	78.70±8.78 ^b	11.80±2.55 ^B
3% Pullulan (Hayashibara) + 0.5% NP-EPS	44.88±0.01 ^c	8.67±0.77 ^C
3% Pullulan (Hayashibara) + 1.0% NP-EPS	12.43±4.77 ^d	6.97±0.30 ^C

*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกัน ในแนวตั้งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 23 สมบัติการละลายน้ำของฟิล์มพุลลูแลนที่เติม NP-EPS ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Film composition (w/v)	เวลาที่ใช้ในการละลาย (นาทีก)
3% Pullulan (Hayashibara)	0.87±0.10 ^{c*}
3% Pullulan (Hayashibara) + 0.1% NP-EPS	1.03±0.07 ^c
3% Pullulan (Hayashibara) + 0.5% NP-EPS	1.53±0.09 ^d
3% Pullulan (Hayashibara) + 1.0% NP-EPS	1.90±0.09 ^c
3% Pullulan (Hayashibara) + 1.5% NP-EPS	2.4±0.09 ^b
3% Pullulan (Hayashibara) + 3.0% NP-EPS	3.95±0.12 ^a

*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกัน ในแนวตั้งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

5.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะระดับโมเลกุลของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนโดย Manitchotpisit และคณะ (2009) ซึ่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่ง เช่น Internal Transcribed Spacer (ITS) Intergenic Spacer 1 (IGS1) Translation Elongation Factor-1 Alpha (*EF-1 α*) Beta Tubulin (*BT2*) และ RNA Polymerase II (*RPB2*) ร่วมกับความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ และการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส พบว่า สามารถจัดกลุ่มความหลากหลายของสายพันธุ์ออกเป็น 12 กลุ่ม (Clade) โดยในกลุ่มที่ 12 ซึ่งประกอบด้วย *Aureobasidium* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีการสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่ไม่ใช่พุลลูแลน เมื่อพิจารณาลักษณะทางสรีรวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ Manitchotpisit และคณะ ได้เสนอว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 อาจมีความแตกต่างจาก *A. pullulans* สายพันธุ์อื่นๆ ในระดับชนิด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาลักษณะบางประการของ *Aureobasidium* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 เพิ่มเติมเพื่อใช้ประกอบการจัดจำแนก โดยได้ตรวจสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงที่สร้างพุลลูแลน (*A. pullulans* NRRL 58560) พบว่าทั้ง *Aureobasidium* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 สามารถใช้แหล่งอาหารได้คล้ายคลึงกับ *A. pullulans* สายพันธุ์อ้างอิง ต่างกันเพียงการใช้ D-Trehalose \cdot 2H₂O glycerol และ urea โดยสายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ไม่สามารถใช้ได้ ในขณะที่สายพันธุ์อ้างอิงใช้ได้ดี และ ทั้งสองสายพันธุ์สามารถใช้ D-mannitol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี ในขณะที่สายพันธุ์อ้างอิงสามารถใช้น้อย รวมถึง glycerol และ glycine ที่ทั้งสองสายพันธุ์ใช้น้อย ในขณะที่สายพันธุ์อ้างอิงใช้ได้ดี แม้ว่าจากรายงานของ Federici (1982) พบว่า *A. pullulans* ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ แต่จากการศึกษานี้จะพบว่า *A. pullulans* ทั้งสามสายพันธุ์สามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้งสามสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้แต่ไม่มาก เนื่องจากสามารถใช้เซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ทั้งนี้เคยมีรายงานถึง *A. pullulans* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ β -glucosidase ซึ่งเป็น

เอนไซม์ที่สามารถย่อย crystalline cellulose cellobiose และ cello-oligosaccharide และ α -glucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อย cellobiose ได้เช่นกัน (Saha และคณะ, 1994; Hayashi และคณะ, 1999; Okagbure และคณะ, 2001 และ Iembo และคณะ, 2002) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2005 Kudanga และ Mwenje ได้ผลิตเซลลูเลสจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดแยกจากเขตร้อน (tropical isolate) โดยใช้เปลือกของต้น Msasa (*Brachystegia* sp.) เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้สามารถผลิต endoglucanase และ exoglucanase ได้ โดย *A. pullulans* ดังกล่าวจะสามารถใช้ Carboxymethyl cellulose และ α -cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ Cernakova และคณะ (1980) พบว่า *A. pullulans* มีแอกติวิตีของเซลลูเลส α -glucosidase β -glucosidase และ exo-1,4- α -glucosidase ทำให้สามารถสรุปได้ว่า *A. pullulans* มีทั้งสายพันธุ์ที่สามารถใช้ α -cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนได้และไม่ได้ อย่างไรก็ตามบางรายงานก็พบว่า *A. pullulans* ไม่สามารถใช้ α -cellulose ได้ แต่สามารถใช้ cellobiose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Dennis และ Euhagiar, 1973; De Hook และ Yurlova, 1994; Saha และคณะ, 1994 และ Freer และ Bothast, 1994) สำหรับ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 สามารถใช้ α -cellulose ได้

จากการศึกษาของ Yurlova และ De Hoog (1997) พบว่าสายพันธุ์ที่ไม่สร้างพุลลูแลน เช่น *A. pullulans* var. *aubasidani* ไม่สามารถใช้มิลลิลแอลฟาดีกลูโคส (methyl- α -D-glucose) และ แลคโตส (lactose) เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งต่างจาก *Aureobasidium* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ที่แม้จะไม่สร้างพุลลูแลน แต่มีการใช้แหล่งอาหารคล้ายคลึงกับ *A. pullulans* สายพันธุ์อ้างอิงที่สร้างพุลลูแลน ประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงอาจเป็นไปได้ว่าทั้ง 2 สายพันธุ์น่าจะยังเป็นชนิด *A. pullulans* แต่จะเป็น variety ใดนั้น ต้องทำการศึกษาลักษณะระดับโมเลกุล เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอื่นๆ เพิ่มเติมจากที่ Manitchotpisit และคณะ (2009) ได้ศึกษาไว้ อย่างไรก็ตามในปี 2008 Zalar และคณะพบว่า แม้ว่า *A. pullulans* var. *aubasidani* จะใช้อาหารและผลิต EPS ได้แตกต่างจาก *A. pullulans* var. *pullulans* แต่ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ระบุว่าทั้ง *A. pullulans* var. *pullulans* และ *A. pullulans* var. *aubasidani* อาจจะเป็น variety เดียวกัน ดังนั้นการใช้แหล่งอาหารและชนิดของ EPS ที่สร้างอาจไม่เพียงพอต่อการนำมาใช้จัดจำแนก *A. pullulans* ในระดับที่ต่ำกว่าชนิด ในส่วนความสามารถในการใช้ Ethanol และ Methanol ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 สอดคล้องกับรายงานของ De Hoog และ Yurlova (1994) ที่รายงานว่า *A. pullulans* ไม่สามารถใช้ Methanol เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ส่วน Ethanol *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถใช้ได้เล็กน้อย ดังนั้นจากการศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่กล่าวข้างต้น ยังไม่เพียงพอที่จะใช้ระบุ variety ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ได้

สำหรับการเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ได้เลือกบริเวณ ITS LSU และ ELO เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีผู้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้หลายสายพันธุ์ก่อนหน้านี้ ทำให้มีข้อมูลที่ใช้ในการเปรียบเทียบได้มาก (White และคณะ, 1990 ; Boekhout และคณะ, 1995 และ Zara และคณะ, 2008) แม้ว่า ITS เป็นบริเวณที่ Manitchotpisit และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาไว้แล้ว แต่เนื่องจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากสายพันธุ์อื่นๆ ค่อนข้างมาก จึงเป็นไปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง LSU และ ELO จะมีความแตกต่างกับสายพันธุ์อื่น ซึ่งอาจทำให้เกิดข้อสงสัยว่าเป็น ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของจุลินทรีย์อื่นที่ปนเปื้อนมาหรือไม่ ดังนั้นเพื่อเป็นการอ้างอิงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ตำแหน่ง LSU และ ELO จะเป็นของสองสายพันธุ์นี้จริง จึงต้องทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS นี้ซ้ำอีกครั้ง ซึ่งจากการทำ PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 5.8s และ ITS2 บางส่วน ได้อย่างจำเพาะ ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความยาว 1,293 และ 1,076 คู่เบสตามลำดับ และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ ITS1 ของ *Aureobasidium* sp. NRRL 58539 และ *Aureobasidium* sp. NRRL 58543 ในฐานข้อมูล Genbank ที่ Manitchotpisit และคณะ (2009) ได้รายงานไว้ 100 และ 98 เปอร์เซ็นต์ (identity) ตามลำดับ ทั้งนี้ Manitchotpisit และคณะ (2009) ได้รายงาน ลำดับนิวคลีโอไทด์ ไว้เฉพาะบริเวณ ITS1 จึงไม่ได้ทำการเปรียบเทียบบริเวณ 5.8s และ ITS2 บางส่วน

สำหรับบริเวณ LSU และ ELO เป็นบริเวณที่ยังไม่ได้มีการศึกษา ไว้ก่อนหน้านี้ ใน การศึกษานี้จึงได้เลือกบริเวณดังกล่าวเพื่อนำมาศึกษาเพิ่มเติม พบว่า บริเวณ LSU สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอที่มีความยาว 841 และ 670 คู่เบส ได้อย่างจำเพาะ และลำดับนิวคลีโอไทด์มีความ คล้ายคลึงกับ *Aureobasidium* sp. HB110 และ *A. pullulans* I-Y383b ในฐานข้อมูล Genbank โดยมี เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 99 และ 87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ELO ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ *A. pullulans* var. *pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58560 ที่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ELO ได้ โดยมีความยาว ประมาณ 700 คู่เบส ซึ่งใกล้เคียงกับ รายงานของ Zalar และคณะ (2008) ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ELO ของ *A. pullulans* ได้ โดยมีขนาด 699 คู่เบส การที่ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ELO ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ได้นั้น อาจเป็นผลมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง *A. pullulans* สองสายพันธุ์นี้ กับ *A. pullulans* var. *pullulans* สายพันธุ์อื่นๆ ทำให้ไพรเมอร์ไม่ สามารถจับกับสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์บริเวณนี้ได้

5.2 ศึกษาการเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

จากการศึกษาการเติบโตและช่วงเวลาของการผลิต NP-EPS ในอาหารสูตร PM พบว่า ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถผลิต NP-EPS ในช่วง late log phase และจะมีการผลิตอย่างต่อเนื่องจนถึงช่วง stationary phase โดย *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้ดีที่สุดในวันที่ 9 ของการเลี้ยงคือ 4.32 และ 4.86 เปอร์เซ็นต์ conversion ตามลำดับ ซึ่งค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตพุลลูแลน โดย มีรายงานว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยสามารถผลิต พุลลูแลนได้อยู่ในช่วง 7.4 – 15.8 เปอร์เซ็นต์ conversion (Prasongsuk และคณะ, 2005) และเมื่อพิจารณารูปแบบการผลิต NP-EPS พบว่า NP-EPS มีการผลิตแบบ secondary metabolite คล้ายกับการผลิตพุลลูแลน คือ จะเริ่มผลิตในช่วง late log phase ทั้งนี้ การผลิตพุลลูแลนจะผลิตได้มากขึ้นในภาวะที่การเติบโตจำกัด หรือช่วงที่เข้าสู่ stationary phase (Zwietering, 1974 และ Leathers, 2002) และการผลิตจะเริ่มลดลงในวันที่ 10 ซึ่งอาจเกิดจากภาวะที่อาหารถูกใช้หมด หรือมีการสร้างเอนไซม์บางชนิดมาย่อย NP-EPS เช่น β -1, 3-D-glucanase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ Dake และคณะ (2002) พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NCIM-1041 สามารถผลิตได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติม β -glucan เป็นตัวชักนำ

5.3 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

จากการศึกษาโครงสร้างของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ด้วยวิธี $^1\text{H-NMR}$ ของ Manitchotpisit และคณะ (2009) พบว่า เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตมีพิกที่แตกต่างจากพุลลูแลนที่ผลิตจากสายพันธุ์อื่นๆ โดยไม่พบพิกที่แสดงถึงพันธะแอลฟา จึงได้สรุปไว้ว่า *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์มีการสร้างเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่ไม่ใช่พุลลูแลน ดังนั้นเพื่อระบุชนิด NP-EPS ที่ผลิตได้นี้ จึงทำการวิเคราะห์โครงสร้างเพิ่มเติมโดยทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ (Leathers และคณะ, 1988) ของ NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า NP-EPS มีความไวต่อเอนไซม์ β -glucanase มากเมื่อเปรียบเทียบกับออบาซิเดน (aubasidan) ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58013 แต่มีความไวต่อเอนไซม์ pullulanase น้อยมากเมื่อเทียบกับพุลลูแลนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์อ้างอิง (NRRL 58560) และ พุลลูแลนมาตรฐาน (Sigma Chemical, USA)

และ Hayashibara Co., Ltd., Japan) ซึ่งจากผลดังกล่าวข้างต้นสามารถระบุชนิดของ NP-EPS ได้ในเบื้องต้นว่าน่าจะเป็นบีต้ากลูแคน ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี ที่พบว่า NP-EPS ที่ผลิตโดย สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีรูปแบบของ FT-IR spectra แตกต่างกับค่าของพอลิกลูแคนมาตรฐาน (Sigma Chemical, USA และ Hayashibara Co., Ltd., Japan) โดยใน NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ไม่พบหมู่ฟังก์ชัน α -configuration แต่พบหมู่ฟังก์ชันที่เป็น β -configuration เช่นเดียวกันกับออบาซิเดนที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* สายพันธุ์ NRRL 58013 โดยจากการทดลองจะพบพีกที่ตำแหน่ง $\lambda = 879.61$ 887.49 และ 891.88 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yurlova และ De Hoog (1997) ที่พบว่า *A. pullulans* var. *aubasidani* สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดออบาซิเดน ซึ่งจะพบหมู่ฟังก์ชัน β -configuration ที่บริเวณความถี่ที่ $\lambda = 890$ cm^{-1} และรายงานของ Leal-Serrano และคณะ (1980) ที่ระบุว่า β -configuration ของเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* จะมีความถี่ที่ $\lambda = 890$ cm^{-1} และจากการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนสเปกโตรสโคปีชนิด ^{13}C และ ^1H ของ NP-EPS เทียบกับออบาซิเดน ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58013 พบว่าโครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตจาก NRRL 58539 มีพีก $^1\text{H-NMR}$ ที่แสดง β -1, 3 (4.497 - 4.650 ppm) β -1, 6 (4.266 - 4.289 ppm) α -1, 4 (4.266 - 4.289 ppm) และ α -1, 6 (4.916 ppm) ส่วนโครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตจาก NRRL 58543 มีพีก $^1\text{H-NMR}$ ที่แสดง β -1, 3 (4.407 - 4.498 ppm) β -1, 6 (4.250 - 4.274 ppm) α -1, 4 (5.110 - 5.149 ppm) และ α -1, 6 (4.916 ppm) configurations ซึ่งคล้ายกันกับโครงสร้างออบาซิเดน คือมีพีก $^1\text{H-NMR}$ ที่แสดง β -1, 3 (4.497 - 4.513 ppm) β -1, 6 (4.241 - 4.265 ppm) α -1, 4 (5.226 - 5.299 ppm) และ α -1, 6 (4.918 ppm) configurations (Manitchotpsit และคณะ, 2009 และ Reis และคณะ, 2002) ในส่วนการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค $^{13}\text{C-NMR}$ พบว่า โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตจากสายพันธุ์ NRRL 58539 มีพีกขึ้นที่บริเวณ C-3 ของ β -1, 3 (81.000 - 84.063 ppm) C-1 ของ α -1, 6 (98.251 - 98.623 ppm) คล้ายกันกับออบาซิเดน แต่โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตจาก สายพันธุ์ NRRL 58543 ไม่พบพีก C-1 ของ α -1, 4 (100.775 - 100.789 ppm) ในขณะที่ในโครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตจากสายพันธุ์ NRRL 58539 และออบาซิเดน มีพีกชนิดนี้ และไม่พบพีก C-1 ของ β -1,6 (104.200) ในโครงสร้างของ NP-EPS ของทั้งสองสายพันธุ์ ในขณะที่พบพีกชนิดนี้ในโครงสร้างออบาซิเดน (Prasongsuk และคณะ, 2007 และ Reis และคณะ, 2002) เมื่อทำการประมวลผลการวิเคราะห์โครงสร้างทั้งหมดสามารถกล่าวได้ว่า NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 คือ บีต้ากลูแคนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับออบาซิเดน (aubasidan-like β -glucan)

5.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS จาก *A. pullulans*

จากการศึกษาการผลิต NP-EPS พบว่าผลผลิตที่ได้ มีปริมาณค่อนข้างน้อย จึงสนใจทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อกิจกรรมของเซลล์ที่ใช้ในการเติบโต และการสร้างสารประกอบต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิต NP-EPS ให้มากขึ้น โดยจากการศึกษาพบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้มากที่สุดในอาหาร PM ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และไซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ 3.53 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Reese และ Maguire (1971) ที่พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากลูโคส เนื่องจาก *A. pullulans* สามารถผลิตเอนไซม์ซูเครส (invertase, EC. 3.2.1.26) ได้ ซึ่งเมื่อทำการสังเกตจากการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นที่ *A. pullulans* ผลิตก็พบว่าส่วนใหญ่สามารถใช้ซูโครสได้ดี เช่น รายงานของ Leathers และคณะ (1998) ที่พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดพุลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และจากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์ P56 ของ Schuster และคณะ (1993) พบว่าซูโครสให้ผลผลิตสูงสุด (0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) เช่นกัน สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิต NP-EPS นั้น พบว่า NRRL 58543 สามารถใช้ไซเดียมไนเตรทได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yurlova และคณะ (1995) ที่พบว่า *A. pullulans* var. *aubasidani* สามารถใช้ไซเดียมไนเตรทในการผลิตออบาซิแดนได้ดีที่สุดในขณะที่ถ้าเป็น *A. pullulans* var. *pullulans* จะสามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตพุลลูแลนได้ดีกว่า

แม้ว่าการปรับชนิดของแหล่งไนโตรเจนจากเปปโตินมาเป็นไซเดียมไนเตรทจะสามารถเพิ่มผลผลิตของ NP-EPS สูงขึ้น 2.10 เท่าจากสูตรอาหารเดิม แต่ปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่อาจส่งผลกระทบต่อการผลิตคือความเข้มข้นและอัตราส่วนของทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการศึกษานี้เลือกใช้วิธี response surface methodology (RSM) ซึ่งเป็นวิธีทางสถิติที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาตัวแปรที่ซับซ้อน เข้ามาช่วยทำนายความเข้มข้นที่เหมาะสมและผลผลิตที่คาดว่าจะได้ โดยวางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) (Ghadge และ Raheman, 2006) เพื่อวิเคราะห์ multiple regression และ correlation ในการประเมินผลของตัวแปรต้น (independent variable) (Yuan และคณะ, 2008) ซึ่งมีสองหรือมากกว่าหนึ่งตัวแปรต่อการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตาม (dependent variable) (Tiwari และคณะ, 2007) โดยเทคนิค RSM

สามารถลดจำนวนกลุ่มการทดลองและได้ผลการทดลองซึ่งเป็นที่ยอมรับทางสถิติ (Jeong และคณะ, 2009) ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ โซเดียมไนเตรท 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สามารถผลิต NP-EPS ได้มากที่สุด เท่ากับ 10.25 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งอัตราการเปลี่ยนแปลงการผลิตสูงขึ้น และจากการตรวจสอบสมการอธิบายการผลิต NP-EPS จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 โดยทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่ง พบว่าสามารถผลิต NP-EPS ได้ 7.70 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่สมการทำนายได้ (7.35 - 11.74 กรัมต่อลิตร) ดังนั้นแสดงว่าสมการที่ได้ สามารถนำมาใช้ในการอธิบายการผลิต NP-EPS จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ได้อย่างแม่นยำ

จากการศึกษาผลของความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหาร โดยเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM ที่มีซูโครสความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และ โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า สามารถผลิต NP-EPS ได้ดีที่สุด เมื่อความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.5 คือ 9.28 ± 0.04 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถเติบโตในอาหารที่มี pH เริ่มต้นเป็นกรด ได้ดีกว่าที่เป็นกลาง หรือเป็นด่างอ่อน ดังนั้นปริมาณการผลิต NP-EPS จึงไม่สัมพันธ์กับการเติบโตในกรณีของความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Youssef และคณะ (1998) ที่ศึกษาผลของความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตพุลูลาน จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ P-56 พบว่า ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.5 เหมาะสมกับการผลิตพุลูลานมากที่สุด อย่างไรก็ตามจากการศึกษาอื่นๆ พบว่าผลของความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมมีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ที่ใช้ผลิต เช่น การศึกษาการผลิตพุลูลานจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRM2 ที่คัดแยกได้จากเขตร้อนของ Prasongsuk และคณะ (2007) พบว่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 สามารถผลิตพุลูลานได้มากที่สุด และงานวิจัยของ Thirumavalavan และคณะ (2009) ที่พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ MTCC 2195 ผลิตพุลูลานมากที่สุดเมื่อความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต NP-EPS โดยเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM ที่มีซูโครสความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และ โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของอาหาร เท่ากับ 7.5 พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถ เติบโตได้ดีที่สุดและผลิต NP-EPS ได้ มากที่สุด ที่ 14.72 ± 0.03 กรัมต่อลิตร แต่การผลิตและการเติบโตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิ

เพิ่มสูงขึ้น รายงานของ Ueda และคณะ (1963) ที่พบว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตพอลิกลูแลนสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการผลิตมีแนวโน้มลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และ West และ Hamer (1993) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิในการผลิตพอลิกลูแลนที่อุณหภูมิ 23 – 33 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยทั่วไปคือ 24 – 26 องศาเซลเซียส

เมื่อประมวลผลจากการทดลองทั้งหมดพบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้มากที่สุด ในอาหารสูตร PM ที่มีการเปลี่ยนชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยเปลี่ยนจากเปปโตเนมาเป็นโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของซูโครสเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้นเป็น 7.5 และเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะสามารถ ผลิต NP-EPS ได้สูงสุดที่ 14.72 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่ไม่ผ่านการปรับองค์ประกอบถึง 6.06 เท่า

5.5 การทดสอบสมบัติของ NP-EPS ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า มีพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากราหลายชนิดที่มีคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกได้ (Bogaert และคณะ, 2009) เช่น บีต้ากลูแคนซึ่งสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *S. cerevisiae*, *Bipolaris spicifera* and *Sporothrix schenckii* (Odabasi et al., 2006) รวมถึง *A. pullulans* ก็มีรายงานว่าสามารถผลิตบีต้ากลูแคนได้เช่นกัน (Finkelman และ Vardanis, 1987) ซึ่งจากการทดลองในหนูทดลองของ Snart และคณะ (2006) พบว่าบีต้ากลูแคนที่ผลิตจากข้าวบาร์เลย์มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *Lactobacillus* spp. สารอาหารที่สามารถเป็นพรีไบโอติกที่คั้นนั้น จะต้องไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น (Fooks และคณะ, 1999) สามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Clostridium* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษ รวมทั้งส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ดีในลำไส้ เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* (Gibson และ Roberfroid, 1995) โดยทั่วไปมีจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติก โดยแบ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มของ *Bifidobacterium* ซึ่งประกอบด้วย *B. animalis* *B. longum* *B. lactis* *B. infantis* *B. breve* *B. bifidum* *B. thermophilum* และ *B. adolescents* กลุ่ม *Lactobacillus* ได้แก่ *L. acidophilus* *L. casei* *L. farciminis* *L. gasseri* *L. johnsonii* *L. plantarum* *L. reuteri* *L. rhamnosus* *L. salivarius* *L. delbrueckii* sub *Bugaricus*

B. brevis *B. cellobiosus* *B. curvatus* *B. fermentum* *L. helveticus* และแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ *Streptococcus thermophilus* *Enterococcus faecium* *Lactobacillus lactis* *Propionibacterium freudenreichii* *Escherichia coli* *Bacillus clauui* และ *Bacillus oligonitrophilus* รวมถึงยีสต์บางชนิด คือ *S. cerevisiae* และ *S. boulardi* (Penner และคณะ, 2005) โดยในการทดลองนี้เราคัดเลือก จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* ซึ่งได้แก่ *L. acidophilus* และ *L. casei* ซึ่งเป็นแลคติกแอซิด แบคทีเรียที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตโยเกิร์ต และนมเปรี้ยว (Sultana และคณะ, 2000) การศึกษาบีต้ากลูแคนที่ผลิตจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะมุ่งเน้น สมบัติในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มากกว่าความสามารถในการส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์โพรไบโอติก ในการทดลองนี้จึงได้ ทดลองนำ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 มาทดสอบสมบัติความเป็น โพรไบโอติก ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. ซึ่งในการเปรียบเทียบ การเติบโตของแบคทีเรีย วิธีที่นิยมใช้มี 3 วิธีคือ การวัดการดูดกลืนแสง การวัดน้ำหนักแห้งเซลล์ และการนับจำนวนเซลล์เป็น CFU แต่ในการทดลองนี้ต้องการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต และสามารถเติบโตได้เท่านั้น จึงเลือกใช้วิธีวัดค่าการเติบโตด้วยวิธีการนับเซลล์ที่มีชีวิตที่โตเป็น โคลนีได้ (colony count) ซึ่งจากการทดลองพบว่า NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 มีผลกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เติมกลูโคสได้ถึง 6.9 และ 5.1 เท่าตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับ อาหารที่เติมบีต้ากลูแคน จากยีสต์ (food-grade) พบว่าสามารถกระตุ้นการเติบโตของ *Lactobacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจะเห็นว่า NP-EPS มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกได้ดีเทียบเท่ากับ บีต้ากลูแคนเกรดการค้า ซึ่งจากการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Gardiner (2000) ที่พบว่า β -glucan ที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก สามารถกระตุ้นการเติบโตของ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ได้ โดยแบคทีเรียเหล่านี้มีผลในการ ป้องกันปัญหาต่างๆ ในระบบย่อยอาหาร ของมนุษย์ เช่น อาการท้องผูก และ โรคกระเพาะ และจาก การศึกษาความเป็นโพรไบโอติกของสารอื่นๆ เช่น การศึกษาของ Huebner และคณะ (2007) ซึ่ง ทดสอบความเป็นโพรไบโอติกของ กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ต่อการเติบโตของ *L. acidophilus* สายพันธุ์ 3320 และ NCRM พบว่าสามารถกระตุ้นการเติบโตเพิ่มขึ้น 0.7 และ 0.66 เท่าตามลำดับ นอกจากนี้จากทดลองของ Mitsou และคณะ (2010) กับอาสาสมัคร 52 คน อายุระหว่าง 39 – 70 ปี โดยทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระของอาสาสมัครที่ทานเล็กผสมบีต้ากลูแคนที่ผลิตจากข้าวบาร์เล่หมา ตรวจพบว่า มีผลในการเพิ่มจำนวน *Bifidobacterium* ทั้งนี้ได้เคยมีรายงานว่าพุลูลแลนนั้นก็สามารถ กระตุ้นการเติบโตของ *Bifidobacterium* ได้เช่นกัน ซึ่งเป็น lactic acid bacteria เช่นเดียวกับ *Lactobacillus* spp. ได้ (Leathers, 2003) แต่จากการทดลองนี้ได้ทดสอบความเป็นโพรไบโอติกของ

พอลิเมอร์ในการกระตุ้น *Lactobacillus* พบว่าพอลิเมอร์ไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเติบโตของ *Lactobacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้

5.6 ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

ในปัจจุบันฟิล์มที่ขึ้นรูปจากสารทางชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่ ที่นำมาใช้เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ กินได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค สารที่พบในธรรมชาติหลากหลายชนิดที่นำมาขึ้นรูปฟิล์ม เช่น ไคติน (Su และคณะ, 1997) ไคโตซาน (Howling และคณะ, 2001) และ β (1-3),(1-6)-D-glucan (Kofuji และคณะ, 2010) ดังนั้นเพื่อให้สามารถนำ NP-EPS ไปประยุกต์ใช้ได้ทางอุตสาหกรรมทางด้านเกษตรกรรม และผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ในการทดลองนี้เราจึงทำการนำ NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 มาขึ้นรูปฟิล์มที่ระดับความเข้มข้น 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่า ไม่สามารถขึ้นเป็นแผ่นฟิล์มได้ โดยจะมีลักษณะกรอบ เปราะ แตกหักง่าย จนไม่สามารถลอกออกจาก acrylic plate ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงนำ NP-EPS ไปผสมกับพอลิเมอร์ ซึ่งมีคุณสมบัติขึ้นฟิล์มได้ดี เนื่องจากพอลิเมอร์มีโครงสร้างของพันธะ α -1, 6 ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีผลต่อการขึ้นแผ่นฟิล์ม (สีหนาท ประสงค์สุข, 2552) โดยใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการขึ้นเป็นแผ่นฟิล์ม (ปริศนา มังสา, 2555) และเมื่อทำการทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ประกอบด้วยค่าความเค้นหรือการทนต่อแรงดึง (tensile strength) และความยืดหยุ่น (elongation) ของฟิล์ม ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติความต้านทานของวัสดุต่อแรงที่มากระทำ พบว่า ค่าความทนต่อแรงดึง และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของพอลิเมอร์ฟิล์มที่เติม NP-EPS ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NP-EPS ในฟิล์มสูงขึ้น และเมื่อยิ่งเพิ่มความเข้มข้นของ NP-EPS มีผลทำให้คุณสมบัติการยืดหยุ่นของฟิล์มลดน้อยลง และจากการทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์ม ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติในการละลายในน้ำหรือสารละลายของฟิล์ม พบว่า ฟิล์มมีแนวโน้มเกิดการบวมตัวและสลายกลายเป็นเจลได้ช้าลงเมื่อเติม NP-EPS ความเข้มข้นสูงขึ้น และไม่สามารถละลายได้หมด แต่จะพบเป็นตะกอนเล็กๆของ NP-EPS เหลืออยู่ เนื่องจาก NP-EPS บางส่วนไม่ละลายน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Manners และคณะ (1973) รวมถึง Novak และคณะ (2012) ที่พบว่าบีต้ากลูแคนที่ผลิตจากยีสต์มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ โดยจากภาพรวมของฟิล์มพบว่าคุณภาพของฟิล์มลดลงเมื่อเติม NP-EPS ลงไป แต่การปรับปรุงคุณสมบัติเชิงกลของฟิล์มสามารถทำได้โดยการเติมกลีเซอรอล หรือสาร plasticizer อื่นๆ เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นหรือลดความเปราะของแผ่นฟิล์ม (Novak และคณะ, 2012)

โดยกลีเซอรอลจะมีผลต่อสมบัติเชิงกลของฟิล์มในลักษณะที่เป็นทั้ง plasticizer และ antiplasticizer ขึ้นกับค่า water activity (a_w) (Chang และคณะ, 2006) จากรายงานของ Alves และคณะ (2007) พบว่า การเติมกลีเซอรอลในอัตราส่วนที่น้อย ส่งผลให้กลีเซอรอล แสดงสมบัติเป็น antiplasticizer ในขณะที่การเติมกลีเซอรอลร้อยละ 32.5 และ 45 ส่งผลให้ฟิล์มแป้งมันสำปะหลังมีความยืดหยุ่น เพิ่มขึ้นและมีความเปราะน้อยลง ทำให้ฟิล์มที่ได้มีความเป็นพลาสติกมากขึ้น

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

6.1 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและลักษณะระดับโมเลกุลของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

6.1.1 การใช้แหล่งอาหารของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

A. pullulans สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เกือบทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ยกเว้น methanol และ D-Trehalose·2H₂O และเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง (*A. pullulans* var. *pullulan* สายพันธุ์ NRRL 58560) แล้วพบว่าส่วนใหญ่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้เหมือนกัน ยกเว้น D-Mannitol ที่ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถใช้ได้ดี ในขณะที่สายพันธุ์อ้างอิงใช้น้อย และ D-Trehalose·2H₂O ที่ทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สามารถใช้ได้ ในขณะที่สายพันธุ์อ้างอิงสามารถใช้ได้ดี (ตารางที่ 4.1) และสำหรับการตรวจสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ รวมทั้งสายพันธุ์อ้างอิงสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้ดีเกือบทุกชนิดที่ทำการทดสอบ ยกเว้น L-Phenylalanine ที่สามารถใช้ได้น้อย และยูเรีย ที่สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ไม่สามารถใช้ได้ ในขณะที่สายพันธุ์อ้างอิงสามารถใช้ได้ดี

6.2 ศึกษาการเติบโตและการผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

6.2.1 การเติบโตของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีการเติบโตในช่วง lag phase ใน 6 ชั่วโมงแรกหลังการลงเชื้อ จากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วเข้าสู่ช่วง log phase ระหว่างชั่วโมงที่ 6 – 24 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และหลังจาก 24 ชั่วโมงพบว่า มีจำนวนเซลล์คงที่ (stationary phase)

6.2.2 การผลิต NP-EPS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

A. pullulans สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ผลิต NP-EPS ได้มากที่สุดในวันที่ 9 ของการเลี้ยง คือ 2.16 ± 0.00 และ 2.43 ± 0.01 กรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ 4.49 ± 0.01 และ 4.99 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

6.3 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

6.3.1 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ

เมื่อนำเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์มาทดสอบความไวต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ ประกอบด้วย α -amylase pullulanase glucoamylase และ β -glucanase พบว่า NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีความไวต่อเอนไซม์ pullulanase และ glucoamylase น้อยมากเมื่อเทียบกับพุลลูแลนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์อ้างอิง (NRRL 58560) และพุลลูแลนมาตรฐาน (Sigma Chemical, USA และ Hayashibara Co., Ltd., Japan) นอกจากนี้ยังพบว่า NP-EPS จากทั้ง 2 สายพันธุ์มีความไวต่อเอนไซม์ β -glucanase มาก คล้ายคลึงกับออบาซิแดน ในขณะที่เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ทุกชนิดที่ทดสอบมีความต้านทานต่อเอนไซม์ α -amylase ใกล้เคียงกัน

6.3.2 วิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของ NP-EPS ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) เปรียบเทียบกับพุลลูแลนมาตรฐาน (Sigma Chemical, USA และ Hayashibara Co., Ltd., Japan) พบว่าโครงสร้างของ NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 ไม่พบหมู่ฟังก์ชัน α -configuration แต่พบหมู่ฟังก์ชันที่เป็น β -configuration เช่นเดียวกับออบาซิแดน (*aubasidan*) ที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* สายพันธุ์ NRRL 58013 โดยจะมีพีคที่ตำแหน่ง $\lambda = 879.61$ 887.49 และ 891.88 cm^{-1} ตามลำดับ

6.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต NP-EPS จาก *A. pullulans*

A. pullulans สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถผลิต NP-EPS ได้มากที่สุดในอาหารสูตร PM ที่มีการปรับองค์ประกอบต่างๆ คือ 1. ความเข้มข้นของซูโครส จาก 5 % (w/v) เป็น 6 % (w/v) 2. ชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยเปลี่ยนจากเปปโตนมาเป็นโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ 3. ปรับค่าความเป็นกรดต่างของอาหารเริ่มต้น จาก 6.5 เป็น 7.5 และเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะสามารถผลิต NP-EPS ได้สูงสุดเป็น 14.72 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่ไม่ผ่านการปรับองค์ประกอบถึง 6.06 เท่า

6.4 การทดสอบสมบัติของ NP-EPS ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

6.4 ศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของ NP-EPS ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน

6.6.1 การเตรียมฟิล์ม

NP-EPS ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ไม่สามารถขึ้นเป็นแผ่นฟิล์มได้ ดังนั้นจึงต้องนำไปผสมกับพอลูลูแลน โดยพบว่าฟิล์มพอลูลูแลนที่เติม NP-EPS จะมีสีที่ขุ่นขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NP-EPS สูงขึ้น

6.6.2 ทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มที่ผลิต

ค่าความทนต่อแรงดึง และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของพอลูลูแลนฟิล์มที่เติม NP-EPS ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NP-EPS ในฟิล์มสูงขึ้น

6.6.3 ทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มที่ผลิต

จากการทดสอบการบวมตัว (swelling) ของฟิล์มพบว่า ฟิล์มมีแนวโน้มเกิดการบวมตัวและสลายกลายเป็นเจลได้ช้าลงเมื่อเติม NP-EPS ความเข้มข้นสูงขึ้น และไม่สามารถละลายได้หมด แต่จะพบเป็นตะกอนเล็กๆของ NP-EPS เหลืออยู่ เนื่องจาก NP-EPS บางส่วนไม่ละลายน้ำ

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้พบว่า NP-EPS ที่ผลิตได้นั้นค่อนข้างน้อย และมีสีดำ ดังนั้นจึงควรที่ทำการคัดแยกเพื่อหา *A. pullulans* สายพันธุ์ที่สามารถผลิต NP-EPS ได้ในปริมาณที่มากขึ้น รวมทั้งทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต NP-EPS ต่อไป และในการขึ้นรูปฟิล์ม อาจทำการเติมกลีเซอรอลเพื่อให้ฟิล์มที่ขึ้นรูปนั้นมีคุณสมบัติที่ดีขึ้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นบีต้ากลูแคนฟิล์มที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีได้ต่อไปในอนาคต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ปริศนา มั่งสา. 2555. ผลของภาวะการผลิตที่มีต่อหน้าหมักโมเลกุลของพุลูลแลนที่ผลิตได้จาก

Aureobasidium pullulans สายพันธุ์เขตร้อน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล. 2547. เบต้ากลูแคนสารมหัสจรรย์จากธรรมชาติ. วิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยี. 19: 47-49.

สีหนาท ประสงค์สุข. 2552. การผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพพุลูลแลนและการประยุกต์ใช้. วารสาร
วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 37: 268-274.

สุญณี พงษ์ธนานิกร. 2549. พรีไบโอติกและโพรไบโอติก: อาหารสุขภาพ. ภาควิชาอาหารเคมี
คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Alves, V. D., Mali, S., Beleia, A., and Grossman, M. V. E. 2007. Effect of glycerol and amylase
enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*. 78: 941–946.

Atlas, R. M. 1993. In: Parks, L. C. (eds.), *Handbook of Microbiological Media*. CRC Press,
Boca Raton.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In Lactic acid bacteria:
microbiology and functional aspects. (Salminen, S. and Wright, A. eds.). pp.1-72.
Marcel. Dekker, Inc. New York.

- Bengmark, S. 2005. Bioecologic control of the gastrointestinal tract: the role of flora and supplemented probiotics and synbiotics. *Gastroenterol Clinic North*. 34: 413-36.
- Boekhout, T., Fell, J. W., and O'Donnell, K. 1995. Molecular systematics of some yeast-like anamorphs belonging to the *Ustilaginales* and *Tilletiales*. *Studies in Mycology* 38: 175–183.
- Bond, C. 2007. Freeze-drying of yeast culture. *Chemistry and Materials Science*. 368: 99-107.
- Brown, R. G., Hanic, L. A., and Hsiao, M. 1973. Structure and chemical composition of yeast chlamydospores of *Aureobasidium pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology*. 19: 163-168. important yeast. *Applied Microbiology Biotechnology*. 82: 793-804.
- Cernakova, M., Kratochvilova, K., Suty, L., Zemek, J., and Kuniak, E. 1980. Biochemical similarities among strains of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) arnaud. *Folia Microbiological*. 25: 68-73.
- Chang, Y. P., Karim, A. A., and Seow, C. C. 2006. Interactive plasticizing – antiplasticizing effect of water and glycerol on the tensile properties of tapioca starch films. *Food Hydrocolloids*. 20: 1-8.
- Chi, Z., Wang, F., Chi, Z., Yue, L., Liu, G., and Zhang, T. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology Biotechnology*. 82: 793-804.
- Collins, M. D. and Gibson, G. R. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Journal of Clinical Nutrition*. 69: 1052S-1057S.
- Cooke, W. B. 1959. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Journal of Mycopathologia Mycologia Application*. 17: 1-43.
- Dais, P. and Perlins, A. S. 1982. High field ¹³C-NMR spectroscopy of β-glucan amylopectin, and glycogen. *Carbohydrate Research*. 252: 6861.

- Dake, M. S., Jadhav, J. P., and Patil, N. B. 2004. Induction and properties of (1, 3)- β -D-glucanase from *Aureobasidium pullulans*. *Indian Journal of Biotechnology*. 3: 58-64.
- De Hoog, G. S. and Yurlova, N. A. 1994. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 65: 41-54.
- De Hoog, G. S., Zalar, P., Urzi, C., Leo, F., Yurlova, N. A., and Sterflinger, K. 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. *Enzyme Microbiology Technology*. 14: 514-527.
- Deslandes, Y., Marchessault, R. H., and Sarko, A. 1980. Triple-helical structure of (1, 3)- β -D-glucan. *Macromolecules*. 13: 1466-1471.
- Domsch, K. H., Gams, W., and Anderson, T. H. 1993. *Compendium of soil fungi*. Volume I. London: Academic Press.
- Elinov, N. P., Glazova, N. V., Kravchenko, S. B., Potekhina, T. S., and Siluyanova, N. A. 1987. Method of producing aubasidan. *U. S. S. R. Patent* 1,339,129.
- Feldman, S., Schwartz, H. J., Kalman, D. S., Mayers, A., Kohrman, H. M., Clemens, R., and Krieger, D.R. 2009. Randomized Phase II Clinical Trials of Wellmune WGP® for Immune Support During Cold and Flue Season. *Journal Application Research*. 9: 30-42.

- Fincher, G. B. and Stone, B. A. 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. In Y. Pomeranz (eds.). *Advances in Cereal Science and Technology* pp. 207. Minnesota: American Association and Cereal Chemists.
- Finkelman, M. A. J. and Vardanis, A. 1987. Glycogen metabolism in *Aureobasidium pullulans*: A glycogen synthetase with unusual activation properties. *Critical Review Biotechnology*. 5: 185-193.
- Fooks, J. L., Fuller, R., and Gidson, R. G. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Introduction Dairy Journal*. 9: 53-61.
- Fuller, R. 1993. Probiotic food current use future developments. *International Food Ingredient*. 3: 23-26.
- Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Ross, R. P., and Stanton, C. 2002. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal*. 12: 749-756.
- Ghadge, S. V. and Raheman, H. 2006. Process optimization for biodiesel production from mahua (*Madhuca indica*) oil using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 97: 379-384.
- Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introduction the concept of prebiotic. *Journal Nutrient*. 125: 1401-1402.
- Ha, C. H., Lim K. H., Kim, Y. T., Lim, S. T., Kim C. W., and Chang, H. I. 2002. Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutants. *Applied Microbiology Biotechnology*. 58: 370-377.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.

- Harada, T. and Yoshimura, T. 1964. Production of a new acidic polysaccharide containing succinic acid by a soil bacterium. *Biochemistry Biophysical Acta*. 83: 374–376.
- Harada, T. 1992. The story of research into curdlan and the bacteria producing it. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 4: 309.
- Hayashi, S., Matsumoto, K., Wada, Y., Takasaki, Y., and Imada, K. 1993. Stable β -glucosidase from *Aureobasidium*. *Letters in Applied Microbiology*. 17: 75-77.
- Hermanides-Nijhof, E. J. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology*. 15: 141-166.
- Herrera, J. R. 1991. Biosynthesis of β -glucans in fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*. 60: 73-81.
- Ho, L. T., Le, T.B., Doan, T. H. T., Quyen, D. V., Le, K. X. T., Pham, V. C., Nagataki, M., Nomura, H., Ikeue, Y., Watanabe, Y., and Agatsuma, T. 2011. The Adjuvant Effect of Sophy β -Glucan to the Antibody Response in Poultry Immunized by the Avian Influenza H5N1 and H5N2 Vaccines. *Journal Microbiology Biotechnology*. 21: 405–411.
- Hofer, M., Pospisil, I., Pipalova, H., and J. Sandula. 1995. Hemopoiesis-enhancing effect of repeatedly administered carboxymethylglucan in mice exposed to fractionated irradiation. *Folia Biologica*. 41: 249-256.
- Howling, G. I., Dettmar, P. W., Goddard, P. A., Hampson, F. C., Dornish, M., and Wood, E. J. 2001. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*. 22: 2959–2966.
- Huebner, J., Wehling, R. L., and Hutkins, R. W. 2007. Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*. 17: 770-775.
- Iembo, T., De Silva, R., Pagnocca, F. C., and Gomes, E. 2002. Production, Characterization and properties of β -glucosidase and β -xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 38: 549-552.
- Jeong, G. T., Yang, H. S., and Park, D. H. 2009. Optimization of transesterification of animal fat ester using responsesurface methodology. *Bioresource Technology*. 100: 25-30.

- Kahlon, T. S., Chow, F. I., Knuckles, B. E., and Chiu, M. M. 1993. Cholesterol-lowering effects in hamsters of β -glucan-enriched barley fraction, dehulled whole barley, rice bran, and oat bran and their combinations. *Cereal Chemistry*. 70: 435-440.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C. Vink, E. Llobell, A. Douwes, J. E. Shimoi, H. Lipke, P. N., and Klis, F. M. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a Phosphodiester-linked β -(1, 3)- β -(1, 6)-glucan heteropolymer. *Glycobiology*. 6: 337-345.
- Kikuchi, Y., Taguchi, R., Sakano, Y., and Kobayashi, T. 1973. Comparison of extracellular polysaccharide produced by *Pullularia pullulans* with polysaccharides in the cells and cell wall. *Agriculture Biology Chemistry*. 37: 1751-1753.
- Kofuji, K., Huang, Y., Tsubaki, K., Kokido, F., Nishikawa, K., and Isobe, T. 2010. Preparation and evaluation of a novel wound dressing sheet comprised of β -glucan–chitosan complex. *Reactive and Functional Polymers*. 70: 784–789.
- Kollar, R., Reinhold, B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M., and E. Cabib. 1997. Architecture of the yeast cell wall. β (1, 3)-glucan, and chitin. *Journal Biology Chemistry*. 272: 17762-17775.
- Kontula, P. 1998. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on fermented oat bran product: effect on gastrointestinal microbiota. *Journal Applied Microbiology*. 50: 246-252.
- Kopecka, M. and Kreger, D. R. 1986. Assembly of microfibrils *in vivo* and *in vitro* from (1, 3)- β -D-glucan synthesized by protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*. 143: 387–395.
- Kristo, E., Biliaderis, C. G., and Zampraka, A. 2007. Water vapour barrier and tensile properties of composite caseinate-pullulan films: Biopolymer composition effects and impact of beeswax lamination. *Food Chemistry*. 101: 753-764.

- Kudanga, T. and Mwenje, E. 2005. Extracellular production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology*. 51: 773-776.
- Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., Roukas, T., and Izydorczyk, M. 2002. Production and characterization of pullulan from beet molasses using a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 97: 1-22.
- Leathers, T. D. 2003. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 62: 468-473.
- Leathers, T. D. 2002. Pullulan. In: E. J. Vandamme, S. De Baets, A. Steinbuchel (eds), *Biopolymer*, vol. 6. *Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes*. pp.1-35. Wiley-VCH, Weinheim.
- Leathers, T. D., Nofsinger, G. W., Kurtzman, C. P., and Bothast, R. J. 1988. Pullulan production by color variants of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology*. 3: 231-239.
- Leathers, T. D., Kurtzman C. P., and Detroy, R. W. 1984. Overproduction and regulation of xylanase in *Aureobasidium pullulans* and *Cryptococcus albidus*. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 14: 225-240.
- Lee, W. C., Yusof, S., Hamid, N. S. A., and Baharin, B. S. 2006. Optimizing condition for enzymatic clarification of banana juice using response surface methodology (RSM). *Journal of Food Engineering*. 73: 55-63.
- Lin, T. S. and Kolattukudy, P. E. 1978. Induction of a Biopolyester Hydrolase (Cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *Pisiti*. *Journal of Bacteriology*. 133: 942-951.

- Lotrakul, P., Deenarn, P., Prasongsuk, S., and Punnapayak, H. 2009. Isolation of *Aureobasidium pullulans* from bathroom surfaces and their antifungal activity against some Aspergilli. *African Journal of Microbiology Research*. 3: 253-257.
- 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.
- Manners, D. J., Masson, J. C. Bjorndal, H., and Lindberg, B. 1973. The structure of a β -(1,6)-D glucan from yeast cell walls. *Journal Biochemistry*. 135: 31-36
- Meada, I., Saito, H., Masada, M., Misaki, A., and Harada, T. 1967. Properties of gels formed by neat treatment of curdlan, a bacterial β -1, 3-glucan. *Agricultural and Biological Chemistry*. 31: 1184-1188.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31: 426-428.
- Mitsou, E. K., Panopoulou, N., Turunen, K., Spiliotis, V., and Kyriacou, A. 2010. Prebiotic potential of barley derived β -glucan at low intake levels: A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical study. *Food Research International*. 43: 1086-1092.
- Nagata, N., Nakahara, T., and Tabuchi, T. 1993. Fermentative production of poly (β -L-malic acid), a polyelectrolytic biopolyester, by *Aureobasidium* sp. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 57: 638-642.
- Newman, R. K., Klopfenstein, C. F., Newman, C. W., Guritno, N., and Hofer, P. 1992. Comparison of the cholesterol-lowering properties of whole barley, oat bran and wheat red dog in chicks and rats. *Cereal Chemistry*. 69: 240-244.

- Novak, M. and Vetvicka, V. 2009. Glucan of biological response modifiers. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders-Drug Targets*. 9: 67-75.
- Novak, M., Synytsya, A., Gedeon, O., Slepicka, P., Prochazka, V., Synytsya, A., Blahovec, J., Hejlova, A., and Copikova, J. 2012. Yeast β (1, 3) (1, 6)-D-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. *Carbohydrate Polymer*. 87: 2496-2504.
- Odabasi, Z., Paetznick, V. L., Rodrigvez, J. R., and Chen, E. 2006. Differences in β -glucan levels in culture supernatants of a variety of fungi. *Medical Mycology*. 44: 267-272.
- Okaglure, R. N., Mwenje, E., Kudanga, Siwela, M., and Sibanda, T. 2001. Isolation of *Aureobasidium pullulans* from Zimbabwean sources and glucosidase activities of selected isolates. *South African Journal of Botany*. 67: 157-160.
- Ovington, L. G. 1998. Macrophage manipulation for improved wound healing. *Wound Care*, October: 116–118.
- Pelizon, A. C., Kaneno, R., Soares, A. M. V. C., Meira, D. A., and Sartori, A. 2004. Immunomodulatory activities associated with β -glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiology Research*. 54: 557-564.
- Penner, R., Richard, N. F., and Caren, L. M. 2005. Probiotics and nutraceutical: non medicinal treatment of gastrointestinal diseases. *Current Opinion in Pharmacology*. 5: 596-603.
- 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 of 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 and Biotechnology*. 21: 393-398.

- Ptitchkina, N. M., Novokreschonova, L. V., and Ishin, A. G. 1993. Rheological properties of aqueous solutions of aubasidan (eds.), *Food Hydrocolloids : Structure, Properties, and Functions*. pp.193-196. New York
- Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S., and Pichayangkura, S. 2003. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 89-94.
- Ramos, S. and Acha, G. I. 1975. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. *Transactions British Mycological Society*. 64: 129-135.
- Reis, R. A., Tischer, C. A., Gorrin, P. A. J., and Iacomini, M. 2002. A new pullulan and a branched (1, 3)-, (1, 6)-linked β -glucan from the lichenised ascomycete *Teloschistes flavicans*. *FEMS Microbiology Letters*. 210: 1-5.
- Rycroft, C., Jone, M. R., Gibson, G., and Rastall, R. A. 2001. A comparative in vitro evaluation of fermentation properties of probiotic oligosaccharides. *Journal Applied Microbiology*. 91: 878-887.
- Reese, E. T. and Maguire, A. 1971. *Aureobasidium pullulans* as a source of sucrase *Canadian Journal of Microbiology*. 17: 329-332.
- Saha, B. C., Silman, R. W., and Bothast, R. J. 1993. Amylolytic enzymes produced by a color variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Current Microbiology*. 26: 267-273.
- Saha, B. C., Freer, S. N., and Bothast, R. J. 1994. Production, purification, and properties of a thermostable β -glucosidase from a color-variant strain of *Aureobasidium pullulans*. *Applied Environment Microbiology*. 60: 3774-3780.
- Saito, H., Yoshioka, Y., Uchara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Shibata, Y. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1,3)- β -D-glucans in the activation of coagulation Factor G from limulus amebocyte lysate and host-mediated antitumour

- activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydrate Research*. 217: 181-190.
- Schuster, R., Wenzig, E., and Mersman, A. 1993. Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 39: 155-158
- Sener, G., Toklu, H., Ercan, F., and Erkanli, G. 2005. Protective effect of β -glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *International Immunopharmacology*. 5: 1387-1396.
- Serrano, G. L., Ruperez, P., and Leal, J. A. 1980. Acidic polysaccharide from *Aureobasidium pullulans*. *Transactions of the British Mycological Society*. 75: 57-62.
- 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.
- Shin, H. T., Baig, S. Y., Lee, S. W., Suh, D. S., Kwon, S. T., Lim, Y. B., and Lee, J. H. 2004. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. *Bioresource Technology*. 93: 59-62.
- Shingel, K. I. 2004. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical Modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research*. 339: 447-460.
- Simon, I., Caye-Vaugien, C., and Bouchonneau, M. 1993. Relation between pullulan production, Morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observation. *Journal General Microbiology*. 139: 979-985.
- Skendi, A., Biliaderis, C. G., Lazaridou, A., and Izydorczyk, M. S. 2003. Structure and rheological properties of water soluble β -glucans from oat cultivars of *Avena sativa* and *Avena bysantina*. *Journal Cereal Science*. 38: 15-31.

- Snart, J., Bibiloni, R., Grayson, T., Lay, C., Zhang, H., Allison, G. E., Laverdiere, J. K., Temelli, F., Vasanthan, T., Bell, R., and Tannock, G. W. 2006. Supplementation of the Diet with High-Viscosity β -Glucan Results in Enrichment for Lactobacilli in the Rat Cecum. *Applied and environmental microbiology*. 72: 1925–1931.
- Su, C. H., Sun, C. S., Juan, S. W., Hu, C. H., Ket, W. T., and Sheu, M. T. 1997. Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes. *Biomaterials*. 16: 1169–1174.
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., and Kailasapathy, K. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and yoghurt. *International Journal Food Microbiology*. 62: 47-55.
- Tada, R., Tanioka, A., Iwasawa, H., Hatashima, K., Shoji, Y., Ishibashi, K., Adachi, Y., Yamazaki, M., Tsubaki, K. and Ohno, N. 2008. Structural characterization and biological activities of a unique type β -D-glucan obtained from *Aureobasidium pullulans*. *Glycoconjugation Journal*. 25: 851-861.
- Takeo, K. and De Hoog, G. S. 1991. Karyology and hyphal characters as taxonomic criteria in Ascomycetous black yeasts and related fungi. *Antonie van Leeuwenhoek*. 60: 35-42.
- Takesako, K., Kuroda, H., Inoue, T., Haruna, F., Yoshikawa, Y., Kato, I., Uchida, K., Hiratani, T., and Yamaguchi, H. 1993. Biological properties of aureobasidin A, a cyclic desipeptide antifungal antibiotic. *Journal of Antibiotics*. 46: 1414-1420.
- Takesako, K., Ikai, K., Haruna, F., Endo, M., Shimanaka, K., and Sono, E. 1991. Aureobasidins, new antifungal antibiotics taxonomy, fermentation, isolation and properties. *Journal of Antibiotics*. 44: 919-924.

- 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.
- Tiwari, R. K. and Das, M. K. 2007. Heat transfer augmentation in a two-sided lid-driven differentially heated square cavity utilizing nanofluids. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 50: 2002-2018.
- 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.
- Volman, J. J., Ramakers, J. D., and Plat, J. 2008. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology and Behavior*. 94: 276–284.
- West, T. P. and Reed-Hamer, B. 1993. Polysaccharide production by a reduced pigmentation mutant of the fungus *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiology Letters*. 113: 345–349.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. pp. 315-322. New York: Academic Press.
- Wickerham, L. J. and Kurtzman, C. P. 1975. Synergistic color variants of *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*. 67: 342-361.
- Williams, D. L., Mueller, A., and Browder, W. 1996. Glucan-based macrophage stimulators: a review of their anti-infective potential. *Clinic Immunother*. 5: 392-399.

- Youssef, F., Roukas, T., and Biliaderis, C. G. 1999. Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*. 34: 355-366.
- Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., and Zhao, J. 2008. Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*. 107: 1300-1306.
- Yurlova, N. A., Mokrousov, I. V., and de Hoog, G. S. 1995. Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 68: 57-63.
- Yurlova, N. A., De Hoog, G. S., and Gerrits van den Ende, A. H. G. 1999. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology*. 43: 63-69.
- Yurlova, N. A. and De Hoog, G. S. 1997. A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek*. 72: 141-147.
- Yurlova, N. A., Uijthof, J. M., and De Hoog, G. S. 1996. Distinction of species in *Aureobasidium* and related genera by PCR-ribotyping. *Antonie van Leeuwenhoek*. 69: 323-329.
- Yurlova, N. A., Mokrousov, I. V., and de Hoog, G. S. 1995. Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 68: 57-63.
- Zalar, P., Gostincar, C., De Hoog, G. S., Ursic, V., Sudhadham, M., and Gunde-Cimerman, N. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*. 61: 21-38.

Zhou, Z. K., Rabards, K., Helliwell, S., and Blanohard, C. 2002. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*. 37: 849-868.

Zweiring, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., and Rice, V. K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied Environmental Microbiology*. 56: 1875-1881.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. สูตรอาหาร Yeast malt broth/ agar (YMB/ YMA)

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

Yeast extract	5	g
Malt extract	5	g
Peptone	5	g
Glucose	20	g
Distilled water	1000	ml
Yeast extract	5	g

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามอัตราส่วนในน้ำกลั่น หากต้องการเตรียม yeast malt agar ให้เติม agar น้ำหนัก 15 g แล้วนำไปอุ่นให้ร้อนจนอุ่นละลาย ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ถ่ายใส่พลาสติกขนาด 250 ml ให้มีปริมาตร 100 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. Production medium

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

Sucrose	5	g
Peptone	0.06	g
K_2HPO_4	0.5	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	g
NaCl	0.2	g
Yeast extract	0.08	g
Distilled water	1000	ml

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามอัตราส่วน ในน้ำกลั่น 950 ml ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ถ่ายใส่ฟลasks ขนาด 250 ml ให้มีปริมาตร 95 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3. MRS broth/ agar

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

Peptone	10	g
Beef extract	10	g
Yeast extract	5	g
Glucose	20	g
Tween 80	1	ml
K ₂ HPO ₄	2	g
Sodium acetate	5	g
Tri-ammonium citrate	2	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.02	g
Distilled water	1000	ml

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามอัตราส่วนในน้ำกลั่น หากต้องการเตรียม MRS agar ให้เติม agar น้ำหนัก 15 g แล้วนำไปอุ่นให้ร้อนจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ถ่ายใส่ฟลasks ขนาด 250 ml ให้มีปริมาตร 100 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4. Mineral medium

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	g
KH_2PO_4	4	g
Na_2HPO_4	6	g
MgSO_4	0.2	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	mg
CaCl_2	1	mg
H_3BO_3	10	μg
MnSO_4	10	μg
ZnSO_4	70	μg
CuSO_4	50	μg
MoO_3	10	μg
Distilled water	1000	ml

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามอัตราส่วน ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.2 ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ถ่ายใส่ฟลasks ขนาด 250 ml ให้มีปริมาตร 50 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันที่ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารเคมีสำหรับการตรวจสอบดีเอ็นเอ

1.1 Chloroform: isoamyl alcohol (24:1)

Chloroform	96	ml
Isoamyl alcohol	4	ml

1.2 2X CTAB buffer

1.0 M Tris-HCl (pH 8.4)	10	ml
4.0 M NaCl	35	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	4	ml
cetyl-trimethylammonium bromide (CTAB)	2	ml
* β -mercaptoethanol	2	ml
* Polyvinylpyrrolidone (PVP)	2	g
น้ำกลั่น	100	ml

หมายเหตุ *เติมก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

1.3 70% Ethanol

Ethanol absolute (analytical grade)	700	ml
น้ำกลั่น	300	ml

ผสม Ethanol absolute และ น้ำกลั่น ให้เข้ากันเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.4 TE buffer (pH 8.0)

1.0 M Tris-HCl (pH 8.0)	10	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	2	ml
น้ำกลั่น	1	L

ผสมสารละลาย 1.0 M Tris-HCl (pH 8.0) และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อเพื่อปรับปริมาตรให้ได้เป็น 1000 ml แล้วจึงนำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.5 1% (v/w) Agarose gel

Agarose	0.2	g
1X TBE	20	ml

ละลาย Agarose 0.2 g ใน 1X TBE ปริมาตร 20 ml โดยให้ความร้อนจนได้สารละลายใส

1.6 Ethidium bromide (10 mg/ml)

Ethidium bromide	1	g
น้ำกลั่น	100	ml

ละลาย Ethidium bromide 1 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิห้อง

1.6 10X TBE buffer

89 mM Tris base (pH 8.3)	108	g
89 mM Boric Acid	55	g
2 mM EDTA (pH 8.3)	40	ml
น้ำกลั่น	1000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อแล้วปรับปริมาตรเป็นปริมาตร 1000 ml หลังจากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.8 CTAB buffer

ละลาย CTAB 2 g ในสารละลายผสม 1.0 M Tris-HCl (pH 8.4), 4.0 M NaCl และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) ให้ความร้อนจน CTAB ละลายหมดและจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 ml

หมายเหตุ * เติมน้ำก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

1.9 Phenol (1x STE saturated)

ชั่ง phenol (crystalline) 250 g ใส่ในขวดสีชานำไปละลายที่อุณหภูมิ 65 °C เติม 8-hydroxyquinoline 0.25 g (0.1% w/v) และ 2x STE buffer 250 ml ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นแยกชั้น phenol ด้วยกรวยแยก แล้วเติม 1x STE buffer นำไปปั่นต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำซ้ำจน phenol มี pH ประมาณ 8.0 จึงเติม 1x STE buffer 30 ml ปิดฝิขวดชั้น phenol เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

1.10 STE buffer

4x STE buffer (200 mM Tris, 400 mM NaCl, 4mM EDTA, pH 8.0)

ละลาย Tris 24.23 g NaCl 23.38 g ในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH เป็น 8.0 ละลาย EDTA 1.49 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเป็น 1000 ml นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.11 TE buffer

10x TE buffer (100 mM Tris, 10mM EDTA, pH 8.0)

ละลาย Tris 6.06 g ในน้ำกลั่น 80 ml ปรับ pH เป็น 8.0 ละลาย 0.37 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนเป็น 100 ml นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.12 TBE buffer

5X TBE buffer

ละลาย Tris 54 g boric acid 27.5 g ในน้ำกลั่น แล้วเติม 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับการทดสอบความไวต่อเอนไซม์

DNS reagent

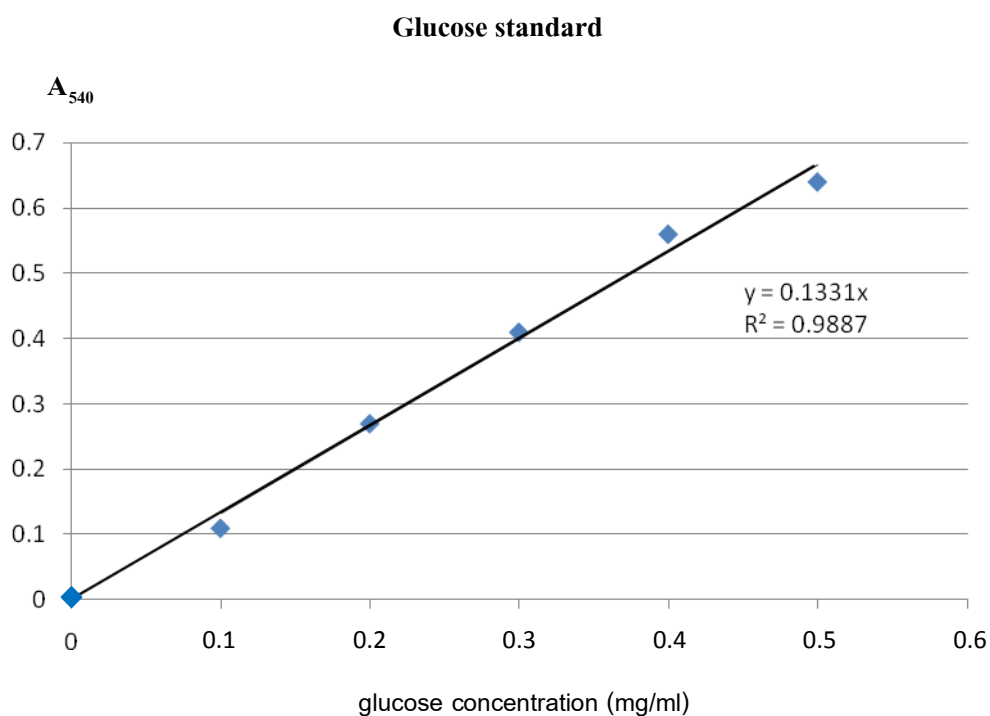
1. เตรียมสารละลาย NaOH 10% ปริมาตร 22 มิลลิลิตร ใส่ Phenol 10 g ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml คนให้เข้ากัน เทแบ่งออกมา 69 ml เติม NaOSO₃ 6.9 g คนให้เข้ากัน
2. เตรียมสารละลาย DNS 1% ปริมาตร 880 ml และเตรียมสารละลาย Rochelle salt 255 g ด้วยสารละลาย NaOH 4.5% ปริมาตร 300 ml จากนั้นนำมาเทรวมกับสารละลาย DNS 1% คนให้เข้ากัน
3. นำสารละลายจากข้อ 1. และ ข้อ 2. เทรวมกัน จะได้ DNS reagent เก็บในขวดสีชา เก็บในตู้เย็นอย่างน้อย 1 คืน ก่อนนำไปใช้

0.05 M Sodium acetate buffer

ละลาย Sodium acetate buffer (MW = 82.08 g/mol) 4.1 g ในน้ำกลั่น 990 ml ปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ได้ 5.0 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 ml

การสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสสำหรับการทดสอบความไวต่อเอนไซม์ (enzyme sensitivity test)

เตรียมสารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 mg/ml ใส่น้ำในหลอดทดลอง เติมน้ำกลูโคส DNS reagent ปริมาณ 3 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นหลอดละ 20 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส ดังรูป

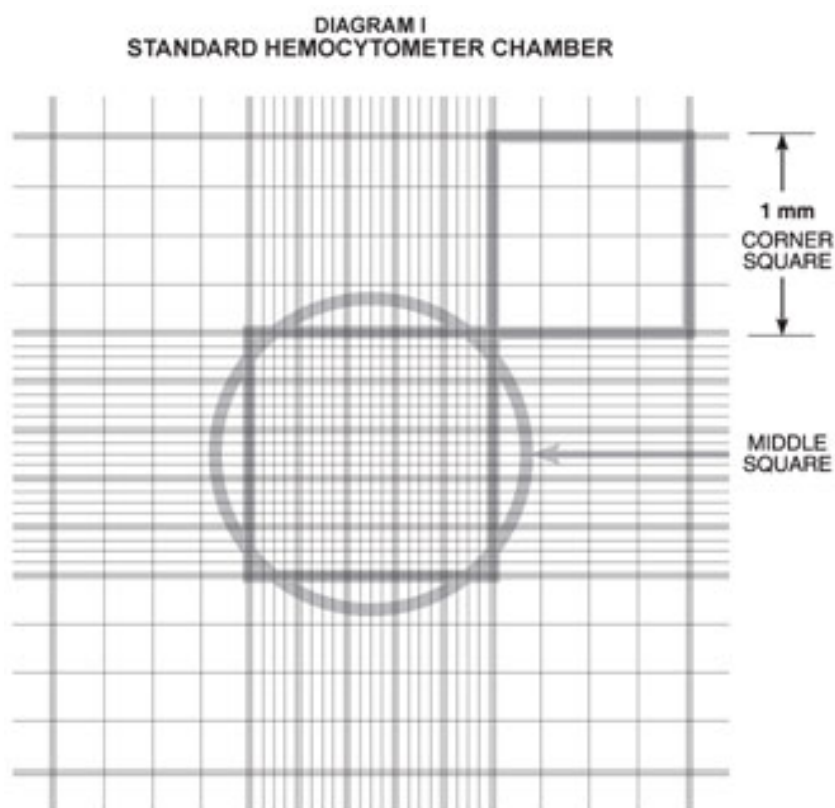


รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานกลูโคส

ภาคผนวก ก

1. การนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Direct Microscopic โดยใช้ Counting chamber ของ Heamacytometer

ภาพแสดง Haemacytometer เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภายใน \bigcirc ประกอบด้วย 25 ช่องใหญ่ และภายในช่องใหญ่แต่ละช่องจะประกอบไปด้วย 16 ช่องเล็ก (ที่มา: <http://www.sigmaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>)

วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่	= 0.1 mm ³
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่	= A เซลล์
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก	= B เซลล์
นั่นคือ	X = 16Y เซลล์
เพราะฉะนั้น	
ใน 0.1 mm ³ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	Ax25 หรือ Bx16x25 เซลล์
ใน 1.0 mm ³ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	Ax25x10 หรือ Bx16x25x10 เซลล์
ใน 1.0 cm ³ มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	Ax25x10x1000 หรือ Bx16x25x10x1000 เซลล์
	= 25Ax10 ⁴ หรือ 4Bx10 ⁶ เซลล์/มิลลิลิตร

2. การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร colony forming unit (CFU) ด้วยวิธีการ spread plate

ทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นโดยทำเป็นลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial dilution) แล้วหยดเชื้อจุลินทรีย์ 0.1 มิลลิลิตรลงบนจานอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแข็งตัวแล้ว (solidified agar medium) จากนั้นเกลี่ยเชื้อจุลินทรีย์ให้กระจายทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วพิเศษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (spreader) ทำ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อทิ้งไว้ 2 วันแล้วทำการนับเซลล์เพื่อคำนวณให้เป็นหน่วย CFU โดยนำค่าเฉลี่ยของโคโลนีที่นับได้มาคูณกับ dilution

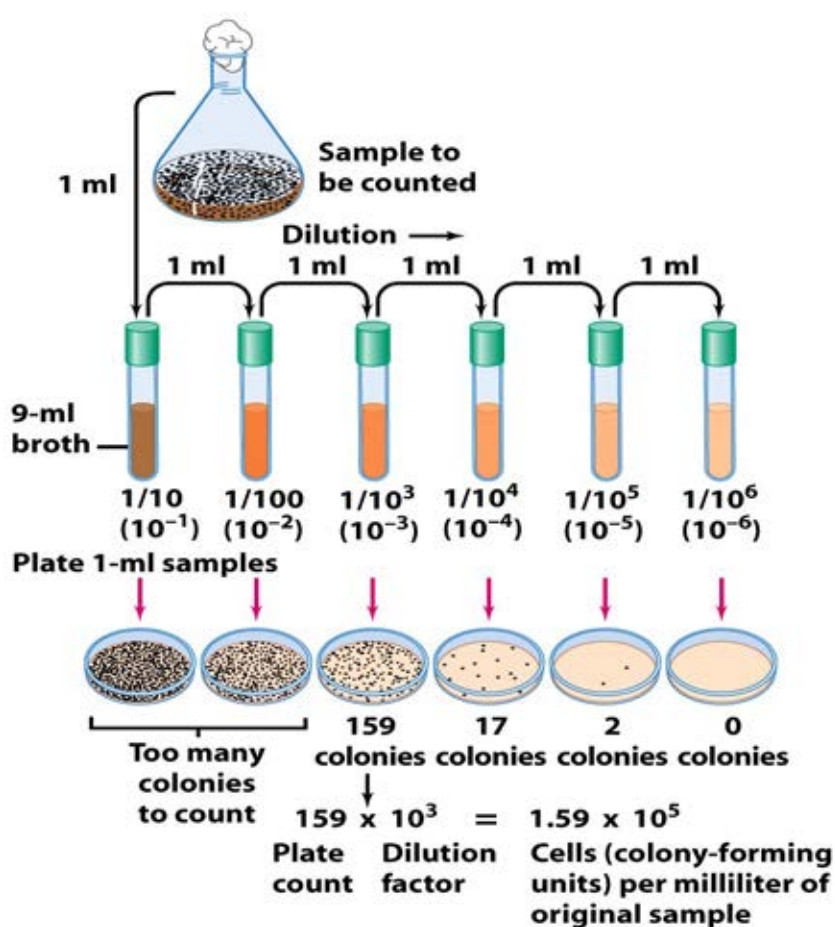
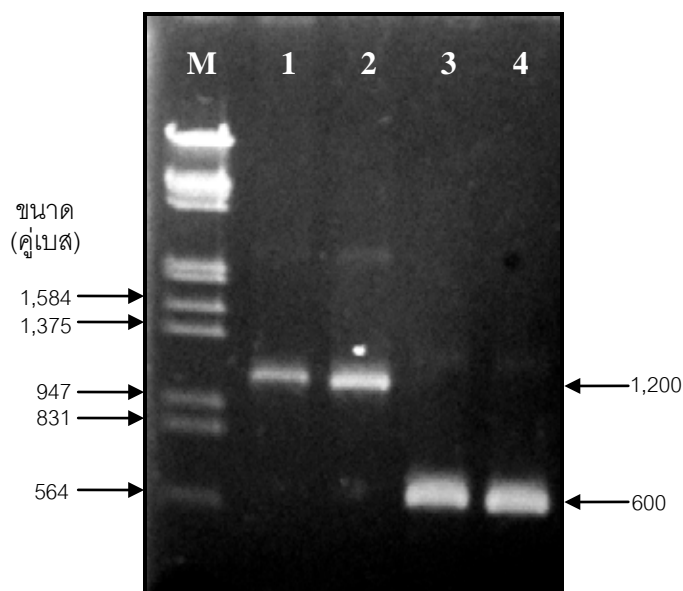


Figure 6-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

รูปที่ 22 วิธีการเจือจางเชื้อเริ่มต้นโดยทำเป็นลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial dilution)

3. ขนาดของนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส



รูปที่ 23 ผลิตรหัสที่ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสบริเวณ ITS และ LSU ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 56 และ 59 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

M แบคทีริโอฟาจแลมปีดาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Eco*RI

1-2 ผลิตรหัสที่ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสบริเวณ ITS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

3-4 ผลิตรหัสที่ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสบริเวณ LSU ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543

5-6 ผลิตรหัสที่ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสบริเวณ ITS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank

ตารางที่ 24 Nucleotide sequence identity (%) ระหว่างลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 กับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ *A. pullulans* variety ต่างๆ ในฐานข้อมูล Genbank

ชนิด/สายพันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษา	Accession Number	ชนิด/สายพันธุ์ที่พบใน Genbank	Identitie	Gaps	Nucleotide identity (%)
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539	FJ150906	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	455/497	12/497	92
	FJ150905	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>aubasidani</i>	455/497	12/497	92
	FJ150886	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	451/495	18/495	91
	FJ150895	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>	446/493	14/493	91
	FJ150875	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>namibiae</i>	454/496	11/496	92
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543	FJ150906	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	454/511	25/511	89
	FJ150905	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>aubasidani</i>	454/511	25/511	89
	FJ150886	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	450/509	31/509	88
	FJ150895	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>	445/407	27/507	88
	FJ150875	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>namibiae</i>	453/510	24/510	89

5. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank

ตารางที่ 25 Nucleotide sequence identity (%) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ LSU ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. pullulans* variety ต่างๆ ในฐานข้อมูล Genbank

ชนิด/สายพันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษานี้	Accession Number	ชนิด/สายพันธุ์ที่พบใน Genbank	Identitie	Gaps	Nucleotide identity (%)
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58539	FJ150942	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	556/589	6/589	94
	FJ150952	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>aubasidani</i>	554/588	4/588	94
	FJ150926	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	553/587	0/587	94
	FJ150913	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>	550/588	3/588	94
	FJ150937	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>namibiae</i>	548/587	0/587	93
<i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 58543	FJ150942	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>pullulans</i>	524/623	42/623	84
	FJ150952	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>aubasidani</i>	521/622	43/622	84
	FJ150926	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>melanogenum</i>	523/623	42/623	84
	FJ150913	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>subglaciale</i>	520/621	40/621	84
	FJ150937	<i>Aureobasidium pullulans</i> var. <i>namibiae</i>	522/623	42/623	84

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว พันธกานต์ อุนหภัทรฐิติกุล เกิดเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม พ.ศ. 2529 ที่ กรุงเทพมหานคร สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2552 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทวิทยาศาสตรบัณฑิต หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2555

ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขณะศึกษาได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต ครั้งที่ 2 ปีงบประมาณ 2555 จาก บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หมายเลขโครงการ F-31-GS-ES13 เลขที่ 107

การเสนอผลงาน

Unhapattaratitikul, P., Punnapayak, H., Prasongsuk, p., Siraleartmukul K. and Lotrakul, P. 2012. Production Optimization and Prebiotic Activity of a Non-pullulan Exopolysaccharide from a Tropical Isolate of *Aureobasidium pullulans*. In Proceeding of The 38th Congress on Science and Technology of Thailand: The Empress Chiangmai, Thailand. October 17-19, 2012.