

การผลิตสเคลอโรทลูแคนจากเชื้อรา Sclerotium rolfsii



นาย หนึ่ง เตยอำรุง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะศึกษาศาสตร์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2532

ISBN 974-56-840-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018280

14936853

Production of the Scleroglucan from Sclerotium rolfsii



Mr. Neung Teaumroong

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1989

ISBN 974-576-840-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตสเคลอโรทูลูแคนจากเชื้อรา Sclerotium rolfsii

โดย นาย หนึ่ง เตียอำรุง

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี นิษฐ์วางกูร



บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ผ. วนะ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชรากัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประสิทธิ์ สุนทร

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประภิตต์สิน สีहनนท์)

สุมาลี นิษฐ์วางกูร

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี นิษฐ์วางกูร)

สุเทพ ธานีวัน

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

สุวิไล จันทร์กระจ่าง

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุวิไล จันทร์กระจ่าง)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

หนึ่ง เตียอร่าจุง : การผลิตสเคลอโรไกลูแคนจากเชื้อรา Sclerotium rolfsii
(Production of the Scleroglucan from Sclerotium rolfsii) อ.ที่ปรึกษา :
รศ.ดร.สุมาลี พิษญากร, 99 หน้า.

จากการศึกษาเชื้อราที่สามารถผลิตโพลีแซคคาไรด์ที่ขับออกมาภายนอกเซลล์นั้น ในขั้นต้นได้ศึกษาโพลีแซคคาไรด์ในเห็ดรับประทานได้ชนิดต่าง ๆ เช่น จากการแยกเชื้อเห็ดทั้งหมด 5 ชนิด รวม 11 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Czapek's Dox ที่แปรผันชนิดของอาหารแหล่งคาร์บอน กลูโคส ซูโครส แลคโตส และกาแลคโตส พบว่าเชื้อเห็ดจำนวน 5 สายพันธุ์สามารถสร้างโพลีแซคคาไรด์ได้ในปริมาณสูงในอาหารที่เป็นกลูโคส 2 สายพันธุ์สร้างโพลีแซคคาไรด์ได้ในปริมาณสูงในอาหารที่เป็นซูโครส และอีก 2 สายพันธุ์สร้างโพลีแซคคาไรด์ได้ในปริมาณสูงในอาหารที่เป็นแลคโตสและกาแลคโตส ในการจำแนกชนิดโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างขึ้นตามลักษณะประจุไฟฟ้า พบว่าโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างจากเห็ดจำนวน 5 สายพันธุ์มีลักษณะประจุเป็นกลาง และอีก 4 สายพันธุ์ที่เหลือมีลักษณะประจุเป็นลบ ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโพลีแซคคาไรด์จากการย่อยสลายสมบูรณ์โพลีแซคคาไรด์ที่สร้างจากเห็ดชนิดต่าง ๆ พบว่าประกอบด้วยกลูโคสเพียงอย่างเดียว


ในการศึกษาการผลิตสเคลอโรไกลูแคนจากเชื้อ S. rolfsii ในอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล น้ำตาลทราย แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ และแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์หลังจากได้ปรับสภาวะให้เหมาะสมแล้ว พบว่า ในอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทรายจะให้ผลผลิตสเคลอโรไกลูแคนสูงสุด เป็น 2.2%

จากการจำแนกชนิดของโพลีแซคคาไรด์ตามลักษณะประจุไฟฟ้า พบว่า สเคลอโรไกลูแคนที่ผลิตได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ทั้งหมด โดยตรวจสอบพบว่าโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มีประจุเป็นกลาง และในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในสเคลอโรไกลูแคนที่ผลิตได้ มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 63-89% และตรวจปริมาณกลูโคสพบว่ามีอยู่ในช่วง 70-89% ของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด คุณสมบัติการอุ้มน้ำของสเคลอโรไกลูแคนต่ออุณหภูมิพบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสแล้ว สมบัติความสามารถในการอุ้มน้ำจะลดลง การเปรียบเทียบความหนืดของสารละลายสเคลอโรไกลูแคนพบว่า สเคลอโรไกลูแคนที่ผลิตจาก กากน้ำตาล น้ำตาลทราย และแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ มีความหนืดอยู่ในช่วง 128.00-137.00 cp ในขณะที่สเคลอโรไกลูแคนที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์มีความหนืดเพียง 55.00 cp จากการทดสอบความเสถียรพบว่า สารละลายสเคลอโรไกลูแคนมีความเสถียรต่อปริมาณของเกลือตั้งแต่ 0.0 ถึง 2.0% ในช่วงค่าพีเอชที่กว้างตั้งแต่ 1.0 ถึง 11.0 และช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 10-70 องศาเซลเซียส ในการตรวจสอบความมีชีวของสเคลอโรไกลูแคนด้วยวิธีอิลแลคโทรเอนโดสไมซิส พบว่าไม่สามารถทำการตรวจสอบได้ เพราะสารละลายสเคลอโรไกลูแคนที่เตรียมได้ไม่แข็งตัวพอที่จะดำเนินการทดลองต่อไป

การศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุล พบว่าสเคลอโรไกลูแคนที่ผลิตจากกากน้ำตาล น้ำตาลทราย แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ และแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 120,000 480,000 360,000 และ 380,000 ตามลำดับ และการศึกษาการไฮโดรไลซ์ในสภาพที่กำหนด โดยมีสภาพเป็นกรดไฮโดรคลอริก 2.0 โมลาร์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลานาน 1 ชั่วโมง ในสเคลอโรไกลูแคนที่ผลิตจากแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ พบว่ามีขนาดโมเลกุลลดลงเหลือประมาณ 30,000

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิติต 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 

NEUNG TEAMROONG : Production of the Scleroglucan from Sclerotium rolfsii. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUMALEE PICHYANGKURA, Ph.D. 99 pp.

The preliminary study of extracellular polysaccharides secreted by fungi was studied from 11 species in 5 genera of edible mushroom. Eleven strains were isolated by tissue culture technique from fruiting bodies. All strains were grown in liquid Czapek's Dox medium and varied 4 kinds of carbon sources: glucose, sucrose, lactose and galactose. Five species gave high polysaccharide production in glucose, two species in sucrose, one species in lactose and one species in galactose. When classified polysaccharide based on their charge properties in nine species, five species were neutral polysaccharide and four species were acidic polysaccharide. Only glucose monomer was detected in each of complete hydrolysis sample.

The production of scleroglucan from S. rolfsii in 4 types of optimized carbon source medium; molasses, sucrose, non-hydrolyzed tapioca starch and enzyme hydrolyzed tapioca starch. In sucrose medium gave the highest of scleroglucan production 2.20%

The classification of polysaccharides were identified base on their charge properties. All scleroglucans produced from four type of carbon sources media were identified as neutral polysaccharide. The sugar analysis of produced scleroglucan, the amount of total sugar were 63-89% and the amount of glucose were 70-89% of calculated total sugar. The effects of temperature on water imbibition property of scleroglucan showed that when temperature increased up to 40 C there, the ability of water imbibition was decreased. Scleroglucans produced from varied type of carbon sources medium were detected the viscosity. From molasses, sucrose and non-hydrolyzed tapioca starch showed the value of viscosity in the range of 128.00-137.00 cp, scleroglucan from hydrolyzed tapioca starch medium showed 55.00 cp. The viscosity stability of scleroglucan solution were observed. They maintained the stability in sodium chloride concentration 0.0-2.0%, broad range of pH from 1.0-11.0 and the temperature range 10 -70 C. The determination polarity by electroendosmosis (EEO) method, it was failure because scleroglucan solution unable to form stable gel, even though increased the concentration of scleroglucan up to 3.5% than agarose gel.

The molecular weight of scleroglucans were determined from various carbon sources, molasses, sucrose, non-hydrolyzed and hydrolyzed tapioca starch by column chromatography with known molecular weight standard dextran. The molecular weight were estimated approximately 120,000 480,000 360,000 and 380,000 respectively, and when partial hydrolyzed in condition 2.0 M HCl 100 C at 1 hour, the scleroglucan produced from hydrolyzed tapioca starch has the molecular weight about 30,000.



ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต *เนื้องเตา*
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา *สมาลี*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้สมบูรณ์ ภายใต้นแนวความคิดค่าปรึกษาอย่างดียิ่งในเชิงวิชาการและการปฏิบัติของรองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี นิษฎางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุวลี จันทร์กระจ่าง หัวหน้าหน่วยวิจัย ไบโอดีโพลีเมอร์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่กรุณาแนะนำและเอื้อเฟื้อการใช้อุปกรณ์ต่าง ๆ ในการวิจัย อีกทั้งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ชนธิวัฒน์ และรองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสะอาด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ค่าปรึกษาเกี่ยวกับการศึกษาคุณสมบัติสำคัญบางประการ Dr. S. Kinoshita ภาควิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยโอซากา ประเทศญี่ปุ่น ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการตรวจสอบความบริสุทธิ์ และ ดร. ทวี เก่าศิริ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่เอื้อเฟื้อจุลชีพที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย รวมทั้งเพื่อนและน้อง ๆ ที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณ บิดาและมารดา ที่ได้สนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตั้งแต่เริ่มต้นจนสมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ



หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฅ
คำย่อ.....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	10
3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง.....	25
4 สรุปผลการวิจัย.....	85
เอกสารอ้างอิง.....	88
ภาคผนวก.....	95
ประวัติผู้เขียน.....	99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงผลการเปรียบเทียบโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อเห็ดชนิดต่าง ๆ.....	27
2. แสดงผลสรุปของชนิดแหล่งอาหารคาร์บอนที่ให้ปริมาณโพลีแซคคาไรด์สูงสุด....	28
3. แสดงการจำแนกของโพลีแซคคาไรด์จากเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ.....	29
4. แสดงความบริสุทธิ์ของสเคลอโรกลูแคนในรูปที่ยังไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์.....	62
5. แสดงความบริสุทธิ์ของสเคลอโรกลูแคนในรูปที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์.....	63
6. แสดงผลเปรียบเทียบความสามารถในการอุ้มน้ำของสเคลอโรกลูแคน.....	67
7. แสดงค่าความหนืดเปรียบเทียบของสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตจากแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่าง ๆ.....	68



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ผลของปริมาณกากน้ำตาลต่อการเจริญ.....	32
2. ผลของสัดส่วนและชนิดของอาหารแหล่งไนโตรเจนและวิตามินที่มี กากน้ำตาลปริมาณ 10.0%.....	33
3. ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญในกากน้ำตาล.....	34
4. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญในกากน้ำตาล.....	35
5. ผลของการเจริญและการผลิตสเซลล์ูโรกลูแคนในกากน้ำตาล.....	36
6. ผลของปริมาณน้ำตาลทรายต่อการเจริญ.....	39
7. ผลของสัดส่วนและชนิดของอาหารแหล่งไนโตรเจนและวิตามินที่มี น้ำตาลทรายปริมาณ 10.0%.....	40
8. ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญในน้ำตาลทราย.....	41
9. ผลของชนิดและปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ต่อการเจริญในน้ำตาลทราย.....	42
10. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญในน้ำตาลทราย.....	43
11. ผลของการเจริญและการผลิตสเซลล์ูโรกลูแคนในน้ำตาลทราย.....	44
12. ผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ต่อการเจริญ.....	47
13. ผลของสัดส่วนและชนิดของอาหารแหล่งไนโตรเจนและวิตามินที่มี แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ปริมาณ 3.5%.....	48
14. ผลของสัดส่วนที่เหมาะสมของแหล่งวิตามินในแป้งมันสำปะหลังที่ ไม่ไฮโดรไลซ์.....	49
15. ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญในแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์.....	50
16. ผลของชนิดและปริมาณแร่ธาตุต่าง ๆ ต่อการเจริญใน แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์.....	51
17. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญในแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์.....	52
18. ผลของการเจริญและการผลิตสเซลล์ูโรกลูแคนใน แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์.....	53
19. ผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ต่อการเจริญ.....	57
20. ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญในแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์.....	58
21. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญในแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์.....	59
22. ผลของการเจริญและการผลิตสเซลล์ูโรกลูแคนใน แป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์.....	60
23. ผลของอุณหภูมิต่อความหนืดของสารละลายสเซลล์ูโรกลูแคน.....	69

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
24. ผลของค่าพีเอชต่อความหนืดของสารละลายสเคลอโรกลูแคน.....	71
25. ผลของปริมาณเกลือต่อความหนืดของสารละลายสเคลอโรกลูแคน.....	72
26. แสดงโครมาโตกราฟีของเค็ช้แทรนมาตรฐานและกลูโคส.....	75
27. การหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคนจากค่า K_{av}	76
28. แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหาร แหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล.....	77
29. แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหาร แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย.....	78
30. แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหาร แหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์.....	79
31. แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหาร แหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์.....	80
32. แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่ถูกไฮโดรไลซ์บางส่วน.....	82
33. แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่ถูกไฮโดรไลซ์สมบูรณ์.....	84

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

มล. = มิลลิลิตร

ศร.ซม. = ตารางเซนติเมตร

มก. = มิลลิกรัม



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย