การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* NRRL 58543 และสมบัติพรีไบโอติกและการขึ้นรูปฟิล์ม

นายปุณชรัชต์ ปิลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM *Aureobasidium pullulans* NRRL 58543 AND ITS PREBIOTIC AND FILM FORMER PROPERTIES

Mr. Puncharat Pilong

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 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* NRRL 58543 และสมบัติพรีไบโอติกและการขึ้นรูปฟิล์ม
โดย	นายปุณชรัชต์ ปิลอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ ดร.กฤษณา ศิรเลิศมุกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร.กฤษณา ศิรเลิศมุกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร เปรมจิต)

ปุณชรัชต์ ปิลอง : การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* NRRL 58543 และสมบัติพรีไบโอติกและการขึ้นรูปฟิล์ม (PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM *Aureobasidium pullulans* NRRL 58543 AND ITS PREBIOTIC AND FILM FORMER PROPERTIES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.สีหนาท ประสงค์สุข, อ. ดร.กฤษณา ศิรเลิศมุกุล, 95 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 วิเคราะห์สมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ศึกษาสมบัติพรีไบโอติกและการขึ้นรูปฟิล์ม โดยเมื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยการปรับแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน อาหารเสริม (ความเข้มข้นของน้ำมันมะกอก) พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และอุณหภูมิ พบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 ให้ผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 21.04±0.19 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีซูโครสความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน โซเดียมไนเตรท 0.06 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำมันมะกอกเป็นอาหารเสริมที่ระดับความข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) พีเอชเริ่มต้นที่ 6.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน จากนั้นวิเคราะห์โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ด้วยวิธีอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (FT-IR) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (NMR) ชนิด ^{1}H และ ^{13}C พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นบีตากลูแคนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับออบาซิแดน นอกจากนี้พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) มีผลในการส่งเสริมการเติบโตของแบคทีเรียโพรไบโอติก 2 ชนิด คือ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ได้มากถึง 7.1 6.5 6.7 และ 5.3 เท่า ตามลำดับ เมื่อทดสอบสมบัติของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นตัวขึ้นรูป พบว่า ค่าความทนต่อแรงดึง เปอร์เซ็นต์การยืดตัว และสมบัติการละลายของฟิล์มมีแนวโน้มลดลง เมื่อความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในแผ่นฟิล์มสูงขึ้น และฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สามารถส่งเสริมการเติบโตของ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ซึ่งการเติบโตของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในแผ่นฟิล์มเพิ่มสูงขึ้น

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5672204523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS: AUREOBASIDIUM PULLULANS/ EXOPOLYSACCHARIDE/ OLIVE OIL

PUNCHARAT PILONG: PRODUCTION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM *Aureobasidium pullulans* NRRL 58543 AND ITS PREBIOTIC AND FILM FORMER PROPERTIES. ADVISOR: ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. SEHANAT PRASONGSUK, Ph.D., KRISANA SIRALERTMUKUL, Ph.D., 95 pp.

This research aimed to investigate the optimum condition for exopolysaccharide production from *A. pullulans* NRRL 58543, the exopolysaccharide structure and its prebiotic and film forming properties were also determined. The optimum condition for exopolysaccharide production was studied by varying carbon and nitrogen sources, concentration of carbon and nitrogen sources, nutrient supplement (concentration of olive oil), initial pH and temperature. It was found that *A. pullulans* NRRL 58543 gave the highest exopolysaccharide at 21.04±0.19 g/L under the condition of sucrose 6% (w/v) as a carbon source, sodium nitrate 0.06% (w/v) as a nitrogen source and 5% (v/v) of olive oil as a nutrient supplement, initial pH 6.5, temperature at 25 °C with shaking at 150 rpm for 6 days. The structural analyses using FT-IR and NMR (^{1}H and ^{13}C) suggested that this exopolysaccharide was aubasidan-like β-glucan. Moreover, the exopolysaccharide concentration at 0.5 and 1.0 % (w/v) was found to enhance the growth of 2 probiotic bacteria, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*, up to 7.1, 6.5, 6.7 and 5.3 fold, respectively. The test ofexopolysaccharide film forming properties with alginate as a film former revealed that the tensile strength, elongation and solubility of the exopolysaccharide film tended to decrease when the concentration of exopolysaccharide in the film increased. The exopolysaccharide film was able to enhance the growth of both *L. acidophilus* and *L. casei* in which the growth of bacteria was increased when the concentration of exopolysaccharide in the film increased.

Field of Study: Biotechnology
Academic Year: 2014

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. กฤษณา ศิรเลิศมุกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องครบถ้วน

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ หัวหน้าภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงพร เปรมจิต ที่กรุณาเป็นกรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้ต้นฉบับให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ และหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบคุณ สมาชิกในหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช บุคลากรในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน

สุดท้ายนี้ขอกราบระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดา ผู้วางรากฐานให้โอกาสทางการศึกษา และญาติพี่น้องผู้มีอุปการคุณทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีตลอดมา ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฏ

สารบัญรูป ..... ฒ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย 3

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 *Aureobasidium pullulans* 5

2.2 ภาวการณ์ในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ 10

2.2.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source) 10

2.2.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) 11

2.2.3 แหล่งอาหารเสริม 11

2.2.4 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 12

2.2.5 อุณหภูมิ (temperature) 13

2.3 บีตากลูแคน 14

2.4 โพรไบโอติก (probiotic) 16

2.5 พรีไบโอติก (prebiotic) 18

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง 21

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 21
3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 22
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 23
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย 23
3.4.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543 23
3.4.1.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน 23
3.4.1.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน 24
3.4.1.3 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมที่เหมาะสม 24
3.4.1.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม 24
3.4.1.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม 24
3.4.2 วิเคราะห์สมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ 25
3.4.3 การทดสอบสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* 25
3.4.4 การขึ้นรูปฟิล์มผสมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์มและศึกษาสมบัติฟิล์ม 26
3.4.4.1 การเตรียมฟิล์ม 26
3.4.4.2 สมบัติการละลายในน้ำร้อน น้ำเย็น (solubility) Teramoto และ Shibata (2006) 26
3.4.4.3 ความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ Standard (1991) 26
3.4.4.4 ทดสอบสมบัติของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย L. acidophilus และ L. casei 27
บทที่ 4 ผลการวิจัย 28

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

4.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543 28
4.1.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน 28
4.1.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม ของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน 31
4.1.3 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมที่เหมาะสม 42
4.1.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม 44
4.1.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม 47
4.2 วิเคราะห์สมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ 50
4.3 การทดสอบสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* 58
4.4 การขึ้นรูปฟิล์มผสมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์มและศึกษาสมบัติฟิล์ม 60
4.4.1 การเตรียมฟิล์ม 60
4.4.2 สมบัติการละลายในน้ำร้อน น้ำเย็น (solubility) 60
4.4.2.1 สมบัติการละลายในน้ำเย็น 61
4.4.2.2 สมบัติการละลายในน้ำร้อน 62
4.4.3 ความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ 63
4.4.4 ทดสอบสมบัติของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* 64
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย 65
5.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543 65
5.1.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน 65
5.1.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม ของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน 66

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

5.1.3 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมที่เหมาะสม 67

5.1.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม 68

5.1.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม 69

5.2 วิเคราะห์สมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ 70

5.3 การทดสอบสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* 71

5.4 การขึ้นรูปฟิล์มผสมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์มและศึกษาสมบัติฟิล์ม 72

5.4.1 สมบัติการละลายในน้ำร้อน น้ำเย็น (solubility) 72

5.4.2 ทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ 73

5.4.3 ทดสอบสมบัติของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* 73

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 75

6.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543 75

6.2 วิเคราะห์สมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ 75

6.3 การทดสอบสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* 76

6.4 การขึ้นรูปฟิล์มผสมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์มและศึกษาสมบัติฟิล์ม 76

6.4.1 การเตรียมฟิล์ม 76

6.4.2 สมบัติการละลายในน้ำร้อน น้ำเย็น (solubility) 76

6.4.3 ความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ 77

หน้า

6.4.4 ทดสอบสมบัติของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* 77

ข้อเสนอแนะ 77

รายการอ้างอิง 78

ภาคผนวก 88

ภาคผนวก ก 89

ภาคผนวก ข 92

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 95

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* และการนำไปใช้ประโยชน์..... 8

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักแห้งเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 5.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ชนิดต่าง ๆ pH เริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12..... 29

ตารางที่ 3 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนองต่อปัจจัยศึกษาที่ได้ (น้ำหนักเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์) สำหรับการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมของการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดย *A. pullulans* NRRL58543 32

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM (ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน) โดยปรับระดับความเข้มข้นของซูโครสต่อโซเดียมไนเตรท ที่ 3.0:0.04, 3.0:0.06, 3.0:0.08, 4.0:0.04, 4.0:0.06, 4.0:0.08, 5.0:0.04, 5.0:0.06, 5.0:0.08, 6.0:0.04, 6.0:0.06, 6.0:0.08, 7.0:0.04, 7.0:0.06, 7.0:0.08, 8.0:0.04, 8.0:0.06 และ 8.0:0.08 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 35

ตารางที่ 5 ผลของการเติมแหล่งอาหารเสริมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ระดับpH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 0 3 5 และ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร)..... 43

ตารางที่ 6 ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) โดยปรับระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 45

ตารางที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 และเติมแหล่งอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 25 28 และ30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12..... 48

ตารางที่ 8 หมู่ฟังก์ชัน และตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก FTIR สเปกตราของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 เปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013..... 50

ตารางที่ 9 ตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก ^{1}H–NMR สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์..... 54

ตารางที่ 10 ตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก ^{13}C–NMR สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์..... 56

ตารางที่ 11 ผลของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ต่อการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*..... 58

ตารางที่ 12 ผลของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ต่อการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*..... 59

ตารางที่ 13 สมบัติการละลายน้ำของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยน้ำหนักของอัลจิเนตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส..... 61

ตารางที่ 14 สมบัติการละลายน้ำของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยน้ำหนักของอัลจิเนตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 61

ตารางที่ 15 สมบัติการละลายน้ำของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยน้ำหนักของอัลจิเนตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 62

ตารางที่ 16 สมบัติการละลายน้ำของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยน้ำหนักอัลจิเนตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 62

ตารางที่ 17 ค่าความเค้น (Stress) และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ 63

ตารางที่ 18 ผลของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *L. acidophilus* และ *L. casei* 64

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Aureobasidium pullulans* ในระยะต่างๆ (Ramos และ Acha, 1975)..... 7

รูปที่ 2 ภาพแสดงชั้นของพอลิแซ็กคาไรด์บนผนังเซลล์ด้านนอกของ *Aureobasidium pullulans* (Shingel, 2004)..... 10

รูปที่ 3 โครงสร้างของ β-1,3-1,6-glucan ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ (Volman และคณะ, 2008)..... 14

รูปที่ 4 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 5.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ชนิดต่าง ๆ pH เริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12..... 31

รูปที่ 5 ภาพพื้นผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซูโครส และโซเดียมไนเตรท ต่อน้ำหนักของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543..... 33

รูปที่ 6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM (ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน) โดยปรับระดับความเข้มข้นของซูโครสต่อโซเดียมไนเตรท ที่ 3.0:0.04, 3.0:0.06, 3.0:0.08, 4.0:0.04, 4.0:0.06, 4.0:0.08, 5.0:0.04, 5.0:0.06, 5.0:0.08, 6.0:0.04, 6.0:0.06,6.0:0.08, 7.0:0.04, 7.0:0.06, 7.0:0.08, 8.0:0.04, 8.0:0.06 และ 8.0:0.08 (น้ำหนักต่อปริมาตร) pH เริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12... 41

รูปที่ 7 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 0 3 5 และ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12..... 44

รูปที่ 8 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยปรับระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ 5.0 5.5 6.0 6.5 และ7.0 เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 . 47

รูปที่ 9 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 และเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 25 28 และ30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 49

รูปที่ 10 FT-IR spectrum ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 51

รูปที่ 11 FT-IR spectrum ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 51

รูปที่ 12 FT-IR spectrum ของออบาซิแดนที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013 52

รูปที่ 13 ^{1}H-NMR spectrum ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก (A) *A. pullulans* NRRL 58543 เปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตจาก (B) *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL58013 55

รูปที่ 14 ^{13}C-NMR spectrum ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก (A) *A. pullulans* NRRL 58543 เปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตจาก (B) *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL58013 57

รูปที่ 15 ฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ 60

รูปที่ 16 เปอร์เซ็นต์การยืดตัวของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0 5 10 20 30 และ 50 โดยน้ำหนักอัลจิเนต 63

รูปที่ 17 วิธีการเจือจางเชื้อเริ่มต้น (serial dilution) 94

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

Aureobasidium pullulans เป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) ที่มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถผลิตสารสำคัญต่างๆ เช่น การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single cell protein) Deshpande และคณะ (1992) สารต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. Takesako และคณะ (1993); Lotrakul และคณะ (2009); Prasongsuk และคณะ (2005) และเอนไซม์หลายชนิด เช่น อะไมเลส โปรติเอส ไลเปส เอสเทอร์เรส เพคติเนส และเฮมิเซลลูเลส เป็นต้น Chi และคณะ (2009) *A. pullulans* สามารถผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพที่เรียกว่า พูลลูแลน (pullulan) Leathers (2002) โดยพลูลูแลนนั้นเป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วย น้ำตาลมอลโตไตรโอส หรือมอลโตเตตระโอสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,4 (α-1,4 linkage) และพันธะแอลฟา 1,6 (α- 1.6 linkage) นอกจากพูลลูแลน ออบาชิแดนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์อีกชนิดที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ของ *A. pullulans* บางสายพันธุ์ โดยมีโครงสร้างเป็นกลูแคน (glucan) ที่ต่อกันด้วยพันธะบีตา 1,3 (β-1,3 linkage) และมีโซ่ข้างที่ต่อด้วยพันธะบีตา 1,6 (β-1,6 linkage) และมีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นพันธะแอลฟา 1,4 (α-1,4 linkage) Yurlova และ De Hoog (1997) จึงจัดเป็นบีตากลูแคนชนิดหนึ่ง ออบาซิแดนเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส ละลายน้ำยาก และไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ มีแคลอรี่ต่ำสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ มีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีสมบัติคล้ายกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ มีสมบัติในการเชื่อมติด (adhesive property) จึงนิยมใช้เป็นสารยึดเกาะ Ptitchkina และคณะ (1993) และนำไปใช้ประโยชน์ในทางผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมและเครื่องสำอาง เป็นต้น

บีตากลูแคน (β-glucan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ เห็ดบางชนิด สาหร่าย Ruiz-Herrera (1991) และผนังเซลล์พืช เช่น ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล (2547) จากการศึกษาบีตากลูแคนซึ่งเตรียมได้จากผนังเซลล์ยีสต์ พบว่ามีสมบัติเป็นสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ปัจจุบันมีการนำเอาบีตากลูแคนมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น Burkus และ Temelli (2000) บีตากลูแคนที่ใช้เป็นอาหารนั้นยังสามารถทำหน้าที่เป็นพรีไบโอติก (prebiotics) Gardiner และคณะ (2002); Mitsou และคณะ (2010) ; Snart และคณะ (2006)

พรีไบโอติก (prebiotics) คือ ใยอาหารที่มนุษย์รับประทานเข้าไปแล้วถูกลำเลียงผ่านมาที่ลำไส้ส่วนล่างโดยไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร และลำไส้เล็กผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ เพื่อไปเลี้ยงหรือส่งเสริมการเจริญการเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพแต่ทำให้แบคทีเรียชนิดที่มีผลเสียต่อสุขภาพร่างกายลดจำนวนลง ซึ่งแตกต่างจาก Colonic food ซึ่งเป็นใยอาหารที่ไม่

ถูกย่อยและถูกดูดซึมโดยกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กเช่นเดียวกับพรีไบโอติกแต่ Co-lonic food เป็นใยอาหารที่ไม่เลือกจำเพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์เท่านั้นแต่จะเลี้ยงจุลินทรีย์ทุกชนิด ทั้งที่มีผลดีและผลเสียต่อสุขภาพทุกชนิด อาหารตามธรรมชาติที่มีพรีไบโอติกมากได้แก่ ข้าวสาลี กระเทียม กล้วย หอมหัวใหญ่ ต้นหอม น้ำผึ้ง หน่อไม้ฝรั่ง และรากชีโครี พรีไบโอติกที่นำไปใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharides) และเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น บีตากูลแคน ซึ่งทำหน้าที่ส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ใหญ่ที่ก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ Collins และ Gibson (1999) นอกจากนี้ยังช่วยลดอาการท้องผูก รักษาสมดุลน้ำและเกลือแร่ในร่างกาย และช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียม และสังกะสีอีกด้วย Bengmark (2005) มีการรายงานการศึกษาหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่าบีตากูลแคนจากพืช ยีสต์ และเห็ดราหลายชนิดสามารถทำหน้าที่เป็นพรีไบโอติกที่ดีคือสามารถกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ได้ Gardiner และคณะ (2002); Mitsou และคณะ (2010) และ Snart และคณะ (2006)

สำหรับในประเทศไทยมีการรายงานการคัดแยก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนหลายสายพันธุ์จากแหล่งอาศัยที่แตกต่างกัน Punnapayak และคณะ (2003); Prasongsuk และคณะ (2005); Manitchotpisit และคณะ (2009); Lotrakul และคณะ (2009) โดยที่บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส และพูลลูแลนได้ในปริมาณมาก Manitchotpisit และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของ *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนเหล่านี้ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS, IGS1, *EF-1*α, *BT2* และ *RPB2* ร่วมกับความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และการผลิตเอนไซม์ไซแลนเนส จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์เหล่านี้ออกเป็น 12 กลุ่ม (clade) โดยพบว่าในกลุ่มที่ 12 ซึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์ NRRL 58539 และ NRRL 58543 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกลุ่มอื่นๆมาก และต่อมา Lotrakul และคณะ (2013) ได้รายงานถึงการผลิตสารคล้ายบีตากลูแคน จาก *A. pullulans* ทั้งสองสายพันธุ์เป็นครั้งแรกในประเทศไทย และจากการศึกษาของ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) พบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุดในวันที่ 9 ของการเลี้ยงในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งค่อนข้างยังมีปริมาณน้อย และตรวจสอบโครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์นี้ด้วยวิธี Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) พบว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58543 มีหมู่ฟังก์ชันที่เป็นพันธะแอลฟา 1,4 มีพันธะบีตา 1,3 และพันธะบีตา 1,6 ซึ่งมีลักษณะพันธะคล้ายกับโครงสร้างของบีตากลูแคน (β-glucan) อย่างไรก็ตามซึ่งแม้โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 จะมีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างของบีตากลูแคน แต่ปัจจุบันไม่มีการศึกษาถึงสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

และจากการทดสอบการขึ้นรูปฟิล์มโดยสารเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* สายพันธุ์นี้ พบว่า ฟิล์มที่ได้มีค่าความทนต่อแรงดึง เปอร์เซ็นต์การยืดตัวและสมบัติการละลายของฟิล์มมีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงขึ้นจึงเป็นข้อจำกัดในการนำฟิล์มที่ผลิตไปใช้ประโยชน์ในระดับทางการค้าต่อไป

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* NRRL 58543 ตลอดจนการวิเคราะห์โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากภาวะที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และแนวทางการใช้ประโยชน์พรีไบโอติกโดยการนำไปผสมในฟิล์มชนิดรับประทานได้เพื่อการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์ฟิล์มพรีไบโอติกชนิดรับประทานแทนผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกโดยทั่วไปโดยการใช้อัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์ม และการเตรียมขึ้นรูปสารเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ในรูปฟิล์มรับประทานได้โดยการใช้อัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์มและใช้การขึ้นรูปด้วยตัวทำละลาย (solvent casting) เพื่อรักษาคุณภาพสารพรีไบโอติกที่ได้และศึกษาสมบัติการละลายน้ำ และความแข็งแรงของฟิล์มชนิดรับประทานได้

1.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรค์จาก *Aureobasidium pullulans* NRRL 58543
2. เพื่อศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของเอกโซพอลิแซ็กคาไรค์ที่ผลิตได้
3. เพื่อผลิตและศึกษาสมบัติการขึ้นรูปฟิล์มผสมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์ม

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษา ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลจากฐานข้อมูล
2. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543
3. วิเคราะห์สมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้
4. การทดสอบสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei*
5. การขึ้นรูปฟิล์มผสมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์มและศึกษาสมบัติฟิล์ม
6. วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง เผยแพร่ผลงานวิจัยและเขียนวิทยานิพนธ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตและทราบถึงภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *A. pullulans* NRRL 58543 รวมทั้งสมบัติการเป็นพรีไบโอติกและประยุกต์เป็นฟิล์ม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 *Aureobasidium pullulans*

Aureobasidium pullulans เป็นราที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) มีชื่อสามัญว่า “ยีสต์ดำ” (black yeast) เนื่องจากสามารถผลิตเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ได้ในระหว่างการเจริญเติบโต โคโลนีจึงมีสีดำ แต่เดิมมีการจัดจำแนกอยู่ใน Class Deuteromycetes (Fungi imperfecti) Order Moniliales Family Dermatiacae Cooke (1959) และในปัจจุบันมีการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของ *A. pullulans* ไว้ ดังนี้ De Hoog และคณะ (1999); Yurlova และคณะ (1999); Thambugala และคณะ (2014)

Kingdom Fungi
Phylum Ascomycota
Class Dothideomycetes
Order Dothideales
Family Aureobasidiaceae
Genus *Aureobasidium*
Species *Aureobasidium pullulans*

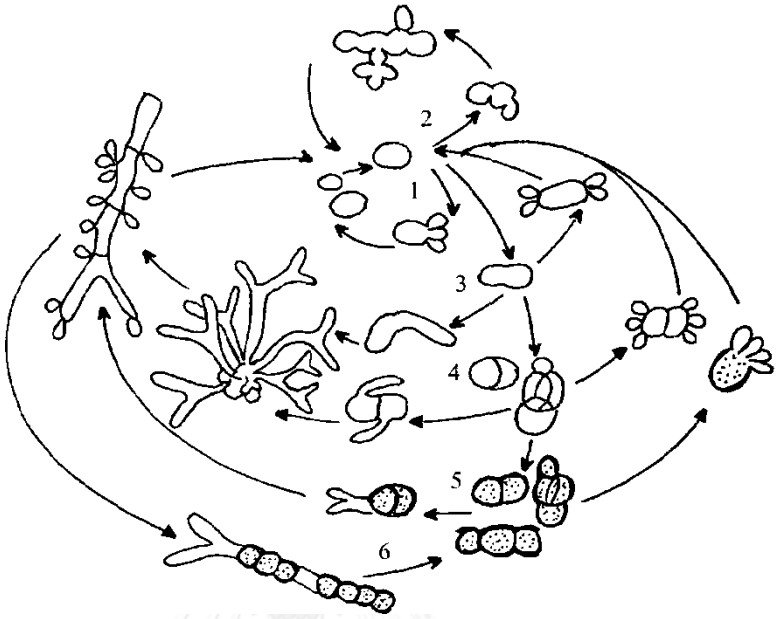
A. pullulans แต่เดิมนั้นมีการจัดจำแนกโดยใช้หลายวิธีประกอบกัน ทั้งทางสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของโคโลนี และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ Hermanides-Nijhof (1977) การใช้แหล่งอาหาร (substrate utilization) การสร้างโคนิเดีย (conidiogenesis) การสร้างเมลานิน Dennis และ Buhagiar (1973) ลักษณะของเส้นใย Takeo และ De Hoog (1991) และภาวการณ์สร้างพอลิแซ็กคาไรด์ De Hoog และ Yurlova (1994) เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ร่วมในการจัดจำแนก ซึ่งทำให้มีความสะดวกมากขึ้น สามารถแยกความแตกต่างในระดับชนิดได้ (Species) เทคนิคที่นิยมใช้ ได้แก่ การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer (ITS) เป็นต้น Yurlova และคณะ (1999); Punnapayak และคณะ (2003)

A. pullulans มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น *Dermatium pullulans*, *Pullulaia pullulans A. vitis* และ *P. fermentans* เป็นต้น Cooke (1959; Hermanides-Nijhof (1977) และ *A. pullulans* มีรูปร่างได้หลายลักษณะ (polymorphic) ประกอบด้วย บลาสโตสปอร์ (blastospore) เซลล์พอง (swollen cell) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เส้นใยแท้ (hyphae) หรือ เส้นใยเทียม (pseudohyphae) เป็นต้น Ramos และ Acha (1975) ในการเกิดเซลล์รูปร่างต่างๆ ซึ่งมักจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

จากที่มีการรายงาน *A. pullulans* มีแหล่งที่อยู่ที่หลากหลายในธรรมชาติสามารถพบได้ทั่วไป เช่น บนผิวใบพืช และผลไม้ ในดิน Ramos และ Acha (1975) หญ้าแห้ง เศษฟาง Cooke (1959) หรือสถานที่ที่มีความชื้นสูง เช่น ผนังห้องน้ำ Prasongsuk และคณะ (2005) เป็นต้น *A. pullulans* ยังสามารถพบได้ในแถบประเทศเขตร้อน เช่น อินเดีย มาเลเซีย บราซิล และจาไมกา แถบประเทศเขตอบอุ่น เช่น แคนาดา เยอรมนี เดนมาร์ก ออสเตรีย เนเธอร์แลนด์ อังกฤษ และสหรัฐอเมริกา และในเขตแห้งแล้ง เช่น อิรัก อียิปต์ ปากีสถาน และ อัฟริกาใต้ รวมทั้งในเขตขั้วโลกเหนือ เช่น นอร์เวย์ Zalar และคณะ (2008) ; Wickerham และ Kurtzman (1975) สำหรับในประเทศไทย พบว่า มีรายงานการคัดแยก *A. pullulans* ได้จากเขตกรุงเทพมหานครและป่าสนเขาในประเทศไทย Punnapayak และคณะ (2003) บนผิวใบไม้ Prasongsuk และคณะ (2005); Manitchotpisit และคณะ (2009) ผนังทาสี และผนังห้องน้ำ Prasongsuk และคณะ (2005); Lotrakul และคณะ (2009)

เมื่อเลี้ยง *A. pullulans* เติบโตบนอาหารกึ่งแข็ง Malt extract agar (MEA) เป็นเวลา 7 วัน โคโลนีของ *A. pullulans* จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 เซนติเมตร ลักษณะโคโลนีจะเรียบ เป็นเมือกและมันวาว มีสีครีมหรือชมพูอ่อนในระยะแรกที่เลี้ยง แต่เมื่อเวลาผ่านไป โคโลนีจะเปลี่ยนแปลงมีลักษณะเหมือนกำมะหยี่สีเข้มขึ้นหรือเปลี่ยนเป็นสีอื่น เช่น สีแดง เหลือง สีเขียวมะกอก น้ำตาลอ่อน และดำ เป็นต้น เกิดเส้นใยสั้นๆ ขึ้นรอบๆโคโลนี ลักษณะเส้นใยเรียบ โปร่งใส เห็นผนังกั้นชัดเจน เส้นใยกว้างประมาณ 3-12 ไมโครเมตร แต่เมื่อเลี้ยงนานขึ้นอาจเปลี่ยนเป็นสีเข้ม และมีผนังเซลล์หนาขึ้นเรียกว่า คลาไมโดสปอร์ (Chlamydospore) เริ่มมีการสร้างโคนีเดียจากภายใน (endoconidia) ด้านข้าง หรือปลายของเส้นใย Hermanides-Nijhof (1977) ลักษณะโคนิเดียปฐมภูมิ (primary conidia) เป็นเซลล์เดี่ยว ค่อนข้างกลม ผนังเรียบ โปร่งใส มีรูปร่างหลากหลาย และมีขนาดแตกต่างกัน มักสร้างโคนิเดียทุติยภูมิ (secondary conidia) ขนาดเล็ก หรือ budding cell โดยอาจสร้าง secondary conidia ขนาดเล็กหลายเซลล์โดยยังติดอยู่กับเซลล์แม่ มีรูปร่างคล้ายกับนิ้วมือ และเมื่อ

secondary conidia หลุดออกไป ในบางเซลล์อาจปรากฏแผลจากการหลุดออกของโคนิเดีย (bud scar) Hermanides-Nijhof (1977); Domsch และคณะ (1993) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Aureobasidium pullulans* ในระยะต่างๆ Ramos และ Acha (1975)

ระยะที่ 1 การสร้างบลาสโตสปอร์เกิดการแตกหน่อได้บลาสโตสปอร์ใหม่

ระยะที่ 2 การสร้างบลาสโตสปอร์สร้างซูโดไมซีเลียมแบบไม่มีผนังกั้น (aseptate)

ระยะที่ 3 บลาสโตสปอร์เปลี่ยนเป็นเซลล์พอง และเริ่มสร้างเส้นใย

ระยะที่ 4 บลาสโตสปอร์ที่เปลี่ยนเป็นเซลล์พอง และเซลล์พองเริ่มสร้างผนังเซลล์ให้หนาขึ้น เปลี่ยนเป็นคลาไมโดสปอร์

ระยะที่ 5 คลาไมโดสปอร์เริ่มสร้าง germ tubes และเส้นใย

ระยะที่ 6 เส้นใยสร้างเม็ดสี และผนังเซลล์หนาขึ้น

A. pullulans เป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายอย่างมากจากความสามารถในผลิตพอลิเมอร์ชีวภาพ ที่เรียกว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งจะหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ขณะเพาะเลี้ยง พูลลูแลนซึ่งเป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์อีกชนิดหนึ่ง ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตไตรโอส หรือ มอลโตเตตระโอสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1, 4 (α-1,4 linkages) และพันธะแอลฟา 1, 6 (α-1, 6 linkages) ซึ่งพอลิเมอร์ดังกล่าว มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีการใช้ประโยชน์จาก *A. pullulans* ในการนำมาใช้ผลิตสารต้านเชื้อราก่อโรคในกลุ่ม *Aspergillus* spp. Lotrakul และคณะ

(2009) และการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) Deshpande และคณะ (1992) รวมไปถึงการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมพลาสติก และงานทางด้านอิเลคโทรนิคส์ Chi และคณะ (2009) *A. pullulans* ยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด เช่น อะไมเลส ไลเปส โปรติเอส เพคติเนส เอสเทอร์เรส และ เฮมิเซลลูเลส เป็น Chi และคณะ (2009); Leathers (2002) (ตารางที่ 1)

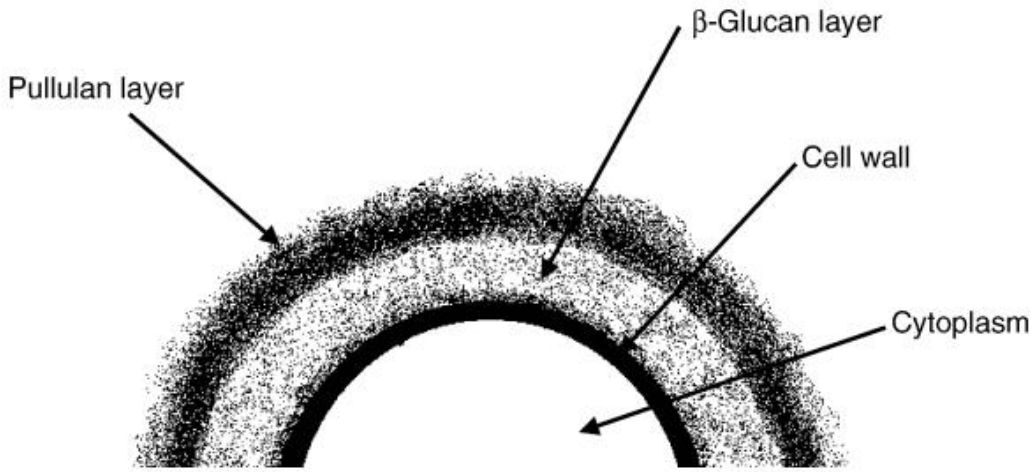
ตารางที่ 1 ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* และการนำไปใช้ประโยชน์

ผลิตภัณฑ์	ประโยชน์
พูลลูแลน	สารที่ทำให้หนาและมีความยืดหยุ่น สารยึดติด หรือสารห่อหุ้ม สารผสมในอาหารที่มีแคลอรีต่ำ สารต้านไวรัส สารป้องกันการตกตะกอนของเลือด ใช้เป็นวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมทางสารเคมี Ptitchkina และคณะ (1993)
บีตากลูแคน	เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ลดระดับคอเลสเตอรอล ช่วยรักษาระดับน้ำตาลในเลือด เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสามารถนำมารักษาโรคมะเร็ง เป็นใยอาหารที่ช่วยระบบการย่อย Fincher และ Stone (1986)
เซลลูเลส	ปรับปรุงเส้นใยเซลลูโลส สารผสมสารซักฟอก สารฟอกนิ่ม ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว และเชื้อเพลิงชีวภาพ บำบัดของเสีย Gupta และคณะ (2003)
ไซแลนเนส	ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ และอุตสาหกรรมอาหาร Li และคณะ (1993) รวมทั้งการบำบัดของเสีย
ไลเปส	ใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยาหลายชนิด เช่น ไฮโดรไลซิส อินเตอร์-เอสเทอร์ริฟิเคชัน Hassan-Montero และ Herrero-Solana (2006) แอลกอฮอล์ไลซิส อะซิโดไลซิส เอสเทอร์ริฟิเคชัน และอะมิโนไลซิส สารที่ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	ประโยชน์
อะไมเลส	ใช้ในกระบวนการทำให้แป้งเป็นของเหลวและเปลี่ยนเป็นน้ำตาล สารล้างน้ำแป้งออกในอุตสาหกรรมผ้า ใช้ในการผลิตเอทานอล สารเติมในผลิตภัณฑ์ซักล้าง Chi และคณะ (2009) ใช้วิเคราะห์ในทางการแพทย์และคลินิก ใช้ผลิตน้ำเชื่อมฟรุกโทส ใช้ในการผลิตยีสต์เซลล์เดี่ยว และจุลชีพอื่นๆ
แมนนาเนส	ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ การเปลี่ยนแปลงของเหลือทิ้งจากชีวมวลเป็นน้ำตาลที่สามารถหมักได้ ใช้ในการลดความหนืดของสารสกัดกาแฟ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหารสัตว์ Lin และ Kolattukudy (1978) ใช้ในการผลิตแมนโน-โอลิโกแซ็กคาไรด์
โปรตีนเซลล์เดียว	เป็นอาหารสัตว์ และอาหารมนุษย์ เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับผลิต bioactive peptide Chi และคณะ (2009)

นอกจากเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดที่เรียกว่าพูลลูแลนแล้ว ยังมีรายงานว่า *A. pullulans* สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆอีกหลากหลายชนิด ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอาหารที่ใช้ผลิต Kikuchi และคณะ (1973) รายงานถึงการผลิต heteropolysaccharide ที่ไม่ละลายน้ำของ *A. pullulans* โดยผนังเซลล์ของ *A. pullulans* จะประกอบด้วย เฮทเทอโรโพลีแซคคาไรด์ และบีตากลูแคน เชื่อมต่อกันด้วย β-(1,3) และ β-(1,6) Brown และคณะ (1973); Elinov และคณะ (1987) ได้รายงานถึงการผลิตกลูแคน ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1,3) α-(1,4) และ β-(1,6) ไกลโคซิดิก ซึ่งภายหลังเรียกว่า ออบาซิแดน Simon และคณะ (1993) ได้ศึกษาผนังเซลล์ของ *A. pullulans* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงให้เห็นถึงพูลลูแลน และ heteropolysaccharide ที่ไม่ละลายน้ำบริเวณวงรอบๆพื้นผิวด้านนอกของคลาไมโดสปอร์ มีองค์ประกอบของพูลลูแลน อยู่อย่างหนาแน่นถัดเข้ามาจะเป็นบีตากลูแคน (รูปที่ 2) ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส และแมนโนส ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นชนิด β-(1, 3)-glucan ซึ่ง β-glucan ที่ผลิตจาก *A. pullulans* พบว่ามีผลต่อ biological activities โดยสามารถยับยั้งมะเร็ง และป้องกันการแพ้อาหาร Tada และคณะ (2008) รวมถึงฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharide) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่สำคัญอีกด้วย Shin และคณะ (2004)



รูปที่ 2 ภาพแสดงชั้นของพอลิแซ็กคาไรด์บนผนังเซลล์ด้านนอกของ *Aureobasidium pullulans* Shingel (2004)

2.2 ภาวการณ์ในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

2.2.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิดในการเจริญเติบโตทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลโมเลกุลคู่ Catlay (1971) เช่น น้ำตาลกลูโคส (glucose) ฟรุคโตส (fructose) ไซโลส (xylose) ซูโครส (sucrose) แรมโนส (rhamnose) กาแลคโตส (galactose) แลคโตส (lactose) มอลโตส (maltose) เซลโลไบโอส (cellobiose) ที่นิยมใช้ในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ คือ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส มอลโตส และไซโลส จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนและสายพันธุ์ของ *A. pullulans* จะมีความสัมพันธ์ต่อปริมาณของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ ซึ่งสอดคล้องกับ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม โดยจากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนซึ่งประกอบด้วย ซูโครส ฟรุกโทส และกลูโคส ที่ความเข้มข้น 5 6 และ 7 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมและสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ ซูโครส 3.53±0.03 กรัมต่อลิตร และรายงานของ Reese และ Maguire (1971) ที่พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากลูโคส เนื่องจาก *A. pullulans* สามารถผลิตเอนไซม์ซูเครสได้ และจากการศึกษาแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต *A. pullulans* สายพันธุ์ P56 พบว่า ซูโครสให้ผลผลิตสูงสุดถึง 0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Schuster และคณะ (1993)

2.2.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* เช่นเดียวกันชนิดของไนโตรเจนที่แตกต่างกันจะส่งผลให้การเจริญเติบโตและสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้แตกต่างกัน ขณะที่ Yurlova และคณะ (1995) ที่พบว่า *A. pullulans* var. *aubasidani* สามารถใช้โซเดียมไนเตรทได้ดีที่สุดในการผลิต ออบาซิแดน แต่ถ้าเป็น *A. pullulans* var. *pullulans* จะสามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตพูลลูแลนได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม โดยจากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนซึ่งประกอบด้วย เปปโตน โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 0.04 0.06 และ 0.08 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่า อาหารสูตร PM ที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ 3.53±0.03 กรัมต่อลิตร Seviour และ Kristiansen (1983) การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* ในถังหมักขนาด 6 ลิตร พบว่า การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นกับระดับของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถ้าระดับไนโตรเจนที่สูงเกินความจำเป็นจะส่งผลให้อัตราการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ลดลง

2.2.3 แหล่งอาหารเสริม

วิตามินจัดเป็นสารอินทรีย์ซึ่งวิตามินมีหน้าที่เกี่ยวข้องในการเร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์โดยทำหน้าที่เป็น coenzyme หรือเป็นส่วนประกอบของ coenzyme ที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ที่เหมาะสม และกรดไขมันต่างๆยังช่วยให้เชื้อเจริญได้ดีมากขึ้น สารอินทรีย์หลายชนิดที่เชื้อราต้องการปริมาณน้อยแต่ความเข้มข้นมากกว่าวิตามิน ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดต่างๆได้แตกต่างกันคือสารที่เป็น growth factor ได้แก่ fatty acids, amino acids, succinic acid, sterols, purine, pyrimidine inositol และ choline Roukas (1999) ได้ศึกษาการผลิตพูลลูแลนที่คัดแยกได้จากโรงงานบียร์โดยใช้ *A. pullulans* ในการทดลองศึกษาผลของการเติมแหล่งอาหารเสริม พบว่าเมื่อเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตร และ Tween 80 ร้อยละ 0.5 ปริมาตรโดยปริมาตร ให้ปริมาณพูลลูแลน 8.5±0.3 กรัมต่อลิตร ขณะที่ในอาหารสูตรปกติที่ไม่เติมแหล่งอาหารเสริมให้ปริมาณพูลลูแลน 6.0±0.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับ ปริศนา มังสา (2554) ได้ทำการศึกษาผลของภาวการณ์ผลิตที่มีน้ำหนักโมเลกุลของพลูลูแลนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน โดยศึกษาทดลองเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว น้ำกะทิ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 5 และ 7 (v/v) พบว่า น้ำมันมะกอก ความเข้มข้น

ร้อยละ 5 (v/v) สามารถผลิตพลูลูแลนได้สูงสุด 36.01±0.12 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง จากการศึกษาการเติมแหล่งอาหารเสริม Lazaridou และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจากกากน้ำตาลบีทโดยใช้สายพันธุ์ nonpigmented จาก *Aureobasiidium pullulans* โดยเติมแหล่งอาหารเสริมคือน้ำมันมะกอกร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตรและใส่ Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตรโดยปริมาตรให้ผลดีที่สุด Silva และ Smith (2008) ศึกษาผลของน้ำมันถั่วเหลืองและ Tween 80 ในการผลิต botryosphaeran โดย *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 โดยเติมน้ำมันถั่วเหลืองที่ 0-10 มิลลิลิตรต่อลิตรและ Tween 80 ที่ 0-5 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของกลูโคสที่ 10-50 กรัมต่อลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากผลการศึกษาที่ดีที่สุดคือความเข้มข้นกลูโคสที่ 40 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นน้ำมันถั่วเหลืองที่ 10 มิลลิลิตรต่อลิตรและ Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4.5 กรัมต่อลิตร Thirumavalavan และคณะ (2009) ศึกษาการผลิตพูลลูแลนโดย *A. pullulans* MTCC 2195 โดยศึกษาผลของการเติมน้ำกะทิเป็นแหล่งอาหารเสริม พบว่า ปริมาณพูลลูแลนที่ได้คือ 58.0 กรัมต่อลิตร โดยในการศึกษานี้สนใจแหล่งอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอก โดยมีรายละเอียดดังนี้

น้ำมันมะกอก (olive oil) คือ น้ำมันที่สกัดได้จากผลมะกอก ประกอบไปด้วย กรดไขมันอิ่มตัวร้อยละ 8-27 และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวร้อยละ 55-83 จากการศึกษาของ Kachouri และ Hamdi (2004) พบว่า น้ำมันมะกอกมีสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เช่น โทโคเฟอรอล (tocopherols) ที่มีมาก คือ อัลฟา-โทโคเฟอรอล อยู่ในรูปของวิตามินอีและมีคาโรทีนในรูปของโปรวิตามินเอ รวมทั้งมีสารฟีนอล เช่น กรดวานิลลิก (vanillic) กรดคาเฟอิก(caffeic) กรดฟีคูมาริก(p-coumaric) กรดเฟฟูริก (ferulic) กรดไซรินจิก (syringic) และ กรดโฮโมวานิลลิก (homovanillic)

2.2.4 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ปัจจัยของ pH ซึ่งมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ pH ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จะขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ *A. pullulans* อย่างไรก็ตามในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ pH จะลดลงระหว่างการผลิตอันเนื่องมาจากตัวพอลิเมอร์เองตลอดจน กรดอินทรีย์ และอินทรีย์บางชนิดที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญเติบโตของ *A. pullulans* One และคณะ (1977) รายงานว่า ระดับ pH เริ่มต้นในการผลิตมีความสำคัญต่อความสามารถของ *A. pullulans* สายพันธุ์ S-1 ในการผลิตพูลลูแลน ที่ระดับ pH เริ่มต้นที่ 2-2.5 จะไม่พบการผลิตพูลลูแลนแต่ถ้าเลี้ยงที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.0 จุลินทรีย์จะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นผลผลิตได้ในอัตรา 50-60 % และระดับ pH เริ่มต้นจะลดลงอย่างรวดเร็วในระหว่างการเลี้ยง Lacroixt และคณะ (1985) ศึกษาผลกระทบจากระดับ pH เริ่มต้นโดยใช้ *A. pullulans* ในการหมัก 2 สายพันธุ์ คือ

2552 และ 140B ซึ่งการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า จากระดับ pH เริ่มต้นที่ 5.5 ถึงระดับ pH สุดท้าย ในอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วและจะคงที่ที่ระดับ pH 2.5 ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบ pH เริ่มต้นที่ต่ำคือ pH 2 พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยมาก West และคณะ (1993) ศึกษาผลของ pH ในการผลิตพูลลูแลนของอาหารสูตร growth medium โดยศึกษา pH ต่างๆกันที่ pH 2.0- pH 7.5 ในอาหารสูตรใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยพบว่า ที่ pH 6.5 ให้ปริมาณพูลลูแลนสูงสุดที่ 8.37 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 5 วัน และ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม โดยศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารโดยเลี้ยง *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM ที่ปรับความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นที่ 5.5 6.5 และ 7.5 พบว่า ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด เมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.5 คือ 9.28±0.04 กรัมต่อลิตร

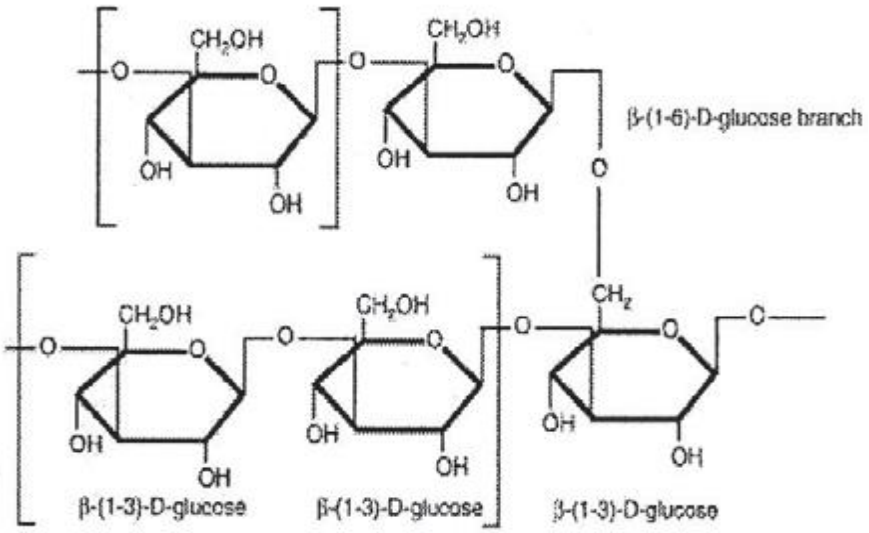
2.2.5 อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่สำคัญต่อการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ Mcneil และคณะ (1989) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* ในช่วง 20 องศาเซลเซียส ถึง 36 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ คืออุณหภูมิที่ 24 องศาเซลเซียส Ueda และคณะ (1963) พบว่า อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตพูลลูแลนสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คือ 2.26 และ 0.38 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับขณะที่อุณหภูมิทั้งสองมีอัตราการเจริญเติบโตของ *A. pullulans* ไม่แตกต่างกัน และ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555)ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม โดยศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิต่างๆ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 25 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ 14.72±0.03 กรัมต่อลิตร

2.3 บีตากลูแคน

บีตากลูแคน (β-glucans) คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ เห็ดบางชนิด สาหร่าย Ruiz-Herrera (1991) และผนังเซลล์พืช เช่น ข้าวบาร์เลย์ และข้าวโอ๊ต เป็นต้น พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล (2547) การศึกษาบีตากลูแคนเริ่มขึ้นในทศวรรษที่ 40 เมื่อ Louis Pillemer ศึกษา Zymosan ที่เตรียมได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่รู้จักกันทั่วไป แต่ยังไม่เป็นที่ทราบว่าเป็นองค์ประกอบใดของ Zymosan ที่สามารถออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ หลังจากราวทศวรรษที่ 50 Nicholas DiLuzio จากมหาวิทยาลัย Tulane ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม พบว่าสารที่ออกฤทธิ์ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันใน Zymosan คือ บีตากลูแคน พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล (2547)

บีตากลูแคนที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันก็จะมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน เช่น บีตากลูแคนที่ผลิตจากยีสต์จะประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ โดยสายหลักประกอบด้วยกลูโคสซึ่งเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1, 3 (β-1, 3 linked) และสำหรับสายที่เป็นกิ่งก้านจะประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1, 6 (β-1, 6 linked) Kapteyn และคณะ (1996) (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 โครงสร้างของ β-1,3-1,6-glucan ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ Volman และคณะ (2008)

ประโยชน์ของบีตากลูแคน

บีตากลูแคนเป็นพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่ช่วยเสริมสร้างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์และสัตว์ ช่วยรักษาระดับน้ำตาลในเลือด ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล และยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สามารถนำมาใช้รักษาโรคมะเร็ง เป็นใยอาหารที่ช่วยในระบบการย่อย Fincher และ Stone (1986) ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของอาหารทำให้อาหารมีความคงตัวเมื่ออยู่ในรูปของอิมัลชัน ใช้ในการควบคุมเนื้อสัมผัสของอาหาร Burkus และ Temelli (2000) และจากรายงานของ Tada และคณะ (2008) พบว่า บีตากลูแคนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สามารถยับยั้ง biological activities ได้แก่ ยับยั้งกระดูกพรุน ยับยั้งมะเร็ง และป้องกันอาการแพ้อาหาร เป็นต้น

นอกจากนี้ บีตากลูแคนยังมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันรังสี จึงนิยมใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางจำพวกครีมกันแดด Hofer (1996) ซึ่งแสงแดดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้การทำงานของเม็ดสีผิดปกติ เกิดเป็นกระ ฝ้า รอยด่างดำ และก่อให้เกิดการชราของผิวหนังเร็วกว่าปกติ (Photoageing) และยังพบว่า แสงแดดเป็นตัวทำลายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง คือ ทำให้เซลล์ Langerhans มีจำนวนลดลง ดังนั้น คนที่ตากแดดนานๆ จึงมีโอกาสเกิดมะเร็งผิวหนัง ซึ่งบีตากลูแคนจะมีคุณสมบัติ โดยจะไปเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้าง collagen ของเซลล์ผิวหนัง สามารถกระตุ้นให้แผลหายเร็วขึ้น ลดการเกิดอนุมูลอิสระ และกระตุ้นการทำงานของเซลล์ Langerhans ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่นำสิ่งแปลกปลอมไปให้แก่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยจะจับสารแปลกปลอมแล้วย่อยเป็นชิ้นเล็กๆ และนำไปเก็บไว้ที่ต่อมน้ำเหลือง จากนั้นเซลล์ภูมิคุ้มกันตัวอื่น เช่น เม็ดเลือดขาว (T-lymphocyte) จะสร้างภูมิคุ้มกัน จากนั้นจะถูกทำลายไปโดย Macrophage กระบวนการทั้งหมดเหล่านี้จะมีผลทำให้ผิวพรรณสดใส เปล่งปลั่ง ลดริ้วรอย และชะลอความแก่ของเซลล์ผิวหนังให้ช้าลง Williams และคณะ (1996)

2.4 โพรไบโอติก (probiotic)

โพรไบโอติกคือกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของมนุษย์และสัตว์โดยทั่วไปมีจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกดังตัวอย่าง เช่น จุลินทรีย์กลุ่มของ *Bifidobacterium* กลุ่ม *Lactobacillus* และแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ เช่น *Lactobacillus lactis, Streptococcus thermophiles, Enterococcus feacium, Propionibacterium freudenreichii, Escherichia coli nessle 1917, Bacillus oligonitrophilis และ Bacillus clauii* รวมทั้งยีสต์บางชนิด คือ *S. boulardi* และ *S. cerevisiae* Penner และคณะ (2005) เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่จะได้รับจากการบริโภคอาหารที่มีส่วนประกอบของโพรไบโอติก เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมักชนิดต่างๆ โดยคุณสมบัติแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติกจะช่วยปกป้องร่างกายไม่ให้ได้รับอันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษ เช่น *Clostridium* Gibson (1995) และยังสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสารอาหารประเภทที่ระบบในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ให้เป็นสารที่มีประโยชน์แล้วร่างกายสามารถดูดซึมนำไปใช้ได้ ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีจะต้องมีคุณสมบัติ สามารถปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียชนิดก่อโรคเจริญได้ยากโดยจะสร้างกรดแลกติก รวมทั้งมีคุณสมบัติทนกรดในกระเพาะอาหารได้ดี Kontula และคณะ (1998) มีความสามารถในการแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดก่อโรคในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ซึ่งจะมีการบีบตัวให้เคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (peristalsis) การที่แบคทีเรียโพรไบโอติกเกาะและเคลือบที่ผนังทางเดินอาหารจะช่วยในการ colonization ของแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ดีขึ้น รวมทั้งช่วยในการดูดซึม และการย่อยอาหารให้เป็นไปอย่างปกติ และสามารถสร้างสารต่างๆ เช่น กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อโรคไม่ให้มีการเพิ่มจำนวนที่มากเกินไป Fuller (1993)

ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* ซึ่งเป็นที่นิยมมากในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตนมเปรี้ยว และโยเกิร์ต Sultana และคณะ (2000) การจัดลำดับอนุกรมวิธาน ได้ดังนี้

Lactobacillus casei

Kingdom Bacteria
Phylum Firmicutes
Class Bacilli
Order Lactobacillales
Family Lactobacillaceae
Genus *Lactobacillus*
Species *Lactobacillus casei*

แบคทีเรีย *L. casei* จัดอยู่ในกลุ่ม facultatively lactobacilli เป็นพวก facultative anaerobe แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียทนกรด (acid tolerant) Axelsson (1998) มีกระบวนการหมักแบบ facultative heterofermentative ตัวอย่างพบได้ในผลิตภัณฑ์ นมหมัก นมดิบ ผักผลไม้หมัก ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ในอุตสาหกรรมมีการผลิตเพื่อเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก ในอุตสาหกรรมนมหมัก Sultana และคณะ (2000)

Lactobacillus acidophilus

Kingdom Bacteria
Phylum Firmicutes
Class Bacilli
Order Lactobacillales
Family Lactobacillaceae
Genus *Lactobacillus*
Species *Lactobacillus acidophilus*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แบคทีเรีย *L. acidophilus* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ จัดอยู่ในวงศ์ Lactobacillaceae มีรูปร่างเซลล์เป็นรูปท่อน เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่ผลิตกรดแลกติก Axelsson (1998) จำนวนมากในกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่ทำให้เกิดสุขภาพดี บริเวณลำไส้เล็ก เพราะว่าบริเวณลำไส้เล็กจะมีจำนวนแบคทีเรียที่มีประโยชน์น้อย ส่วนมากจะเป็นแบคทีเรียชนิดที่ก่อโรค ทำให้สุขภาพร่างกายไม่ดี ดังนั้น แบคทีเรียไพรไบโอติกมีความจำเป็นในการสังเคราะห์และดูดซึมวิตามินในบริเวณลำไส้เล็ก ช่วยควบคุมและขจัดพิษในวัตถุที่เสี่ยงในอาหาร รวมทั้งช่วยลดระดับคลอเลสเตอรอลในเลือด ซึ่งยังสามารถทำงานร่วมกับเอนไซม์ในการย่อยอาหาร ช่วยควบคุมระดับพีเอชของลำไส้ ช่วยป้องกันการเกิดโรคโดยจะผลิตกรดแลกติก และจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 5.5-6.0 Sultana และคณะ (2000)

2.5 พรีไบโอติก (prebiotic)

พรีไบโอติก คือ อาหารที่มนุษย์รับประทานเข้าไปแล้วถูกลำเลียงผ่านมาที่ลำไส้ส่วนล่างโดยไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น Fooks และคณะ (1999) และจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียโพรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ จึงก่อให้เกิดสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกาย ซึ่งจะมีผลในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ แล้วเกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เมื่อจุลินทรีย์โพรไบโอติกในลำไส้ใหญ่นำสารพรีไบโอติกไปใช้จะให้พลังงานและสารบางชนิด เช่น กรดไขมันชนิดสายสั้น (short-chain fatty acids) และกรดแลกติก ซึ่งผลจากกระบวนการหมักนี้จะทำให้เกิดการกระตุ้นการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของกลุ่มจุลินทรีย์สุขภาพ และสภาวะความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจากกรดแลกติกที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Clostridium perfringens Esherichia coli* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น Gibson (1995) นอกจากนี้ยังช่วยรักษาสมดุลน้ำและเกลือแร่ในร่างกาย ลดอาการท้องผูก และช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสีอีกด้วย Bengmark (2005)

พรีไบโอติกส่วนใหญ่จะเป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนสายสั้นๆ ซึ่งเป็นอาหารให้แก่จุลินทรีย์ที่เฉพาะเจาะจง ซึ่งองค์ประกอบในอาหารที่จัดเป็นพรีไบติก ได้แก่ อินนูลิน (inulin) ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylooligosaccharide) ฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructooligosaccharide) กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galactooligosaccharide) ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomaltooligosaccharide) แลคทูโลส (lactulose) Rycroft และคณะ (2001) และ บีตากลูแคน (β-glucan) Gardiner และคณะ (2002); Snart และคณะ (2006) ในปัจจุบันมีการพัฒนา

ผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ โดยการเติมสารที่เป็นพรีไบโอติกลงในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ เพื่อเป็นทางเลือกแก่ผู้บริโภคในการดูแลสุขภาพร่างกาย และเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์อีกด้วย และเป็นการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆ นักวิจัยให้ความสนใจสำหรับสารที่เป็นพรีไบโอติกที่เพิ่มลงไปในส่วนของอาหารและเครื่องดื่มที่บริโภค สุญาณี พงษ์ธนานิกร (2549) ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม น้ำผลไม้ ผลิตภัณฑ์ธัญพืช หรืออาจจะเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่พร้อมใช้บริโภคโดยตรง เช่น กาแฟ เครื่องดื่ม เป็นต้น

ฟิล์มชนิดรับประทานได้ (Edible film) ในการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ฟิล์มชนิดรับประทานได้จะใช้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายในน้ำ และมีสมบัติเด่น คือ สามารถรับประทานได้ เช่น พลูลูแลน (Pullulan), อัลจิเนต (Alginate), กัม (Gum) และแป้งดัดแปลง (Modified starch) Goh และคณะ (2012) สำหรับแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์ พรีไบโอติกที่น่าสนใจรูปแบบหลัก คือ การเตรียมในรูปฟิล์มบรรจุสารพรีไบโอติกชนิดรับประทานได้ และเป็นการสร้างผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกรูปแบบใหม่ใช้รับประทาน

อัลจิเนต (Alginate) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีประจุลบ สกัดได้จากผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาล มีโครงสร้างเป็นเกลืออินทรีย์ของกรดอัลจินิค (alginic acid) ชนิดที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร คือ โซเดียมอัลจิเนต อัลจิเนตจะเป็นโพลิเมอร์ของสาร 2 ชนิดคือ D-mannuronic acid และ L-gulopyranosyluronic acid ซึ่งอัตราส่วนของสาร 2 ชนิดและ โครงสารหลักจะเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของสารละลายอัลจิเนตที่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านความสามารถในการเกิดเจลและความแข็งของเจล อิออนบวกที่มีประจุมากกว่าหนึ่ง เช่น แคลเซียม จะสามารถ ทำปฏิกิริยาเชื่อมข้ามได้กับอัลจิเนต เมื่อปริมาณอิออนในสารละลายเพิ่มมากขึ้นจะ ทำให้เกิดความข้นหนืดการเกิดเจล และการตกตะกอนได้ George และ Abraham (2006) อัลจิเนตสามารถทำหน้าที่เป็น สารให้ความคงตัวได้ดี ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภท เช่น ผักผลไม้ขึ้นรูป ไอศกรีม น้ำตาลไอซิ่ง น้ำสลัด พุดดิ้ง และขนมที่มีลักษณะเป็นเจล และ ISP Food ingredients, USA ได้ผลิตสารให้ความคงตัว เพื่อใช้ในน้ำสลัดและซอสซึ่งมีส่วนผสมของ propylene glycol alginate และ microcrystalline cellulose สารทั้งสองชนิดส่งเสริมการทำงานซึ่งกัน และกันและทำให้เกิดความคงตัวที่ดีเยี่ยม และให้ลักษณะ เนื้อสัมผัสที่เหมือนครีมแม้ในสภาวะที่มีปริมาณไขมันต่ำ น้ำผลไม้ที่ใช้ส่วนผสมของโซเดียมอัลจิเนตและ microcrystalline cellulose จะมีความคงตัวที่ดีมากและเนื้อสัมผัสเนียน ให้ความสดชื่น ปัจจุบันได้พัฒนาผลิตภัณฑ์จากอัลจิเนต เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ผลิตภัณฑ์จากนม ซอส น้ำสลัด ฯลฯ Goh และคณะ (2012) อัลจิเนตยังมีการใช้ประโยชน์ในรูปฟิล์มและเป็นสารผสมในผลิตภัณฑ์ อาหารหลาย

ชนิด และมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางยา และเครื่องสำอาง อัลจิเนตมีการผลิตและจำหน่ายทางการค้าสำหรับในทางอุตสาหกรรม โดยฟิล์มที่ได้จากการขึ้นรูปอัลจิเนตฟิล์มมีลักษณะใสคล้ายพลาสติก แต่มีความแข็งแรงคงรูปได้ดีเหมาะแก่การนำมาใช้เป็นฟิล์มบรรจุสารสำคัญต่างๆได้ดี

การใช้ประโยชน์ของอัลจิเนตในด้านต่างๆ เช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหาร เช่น น้ำสลัด นม ด้านอุตสาหกรรมยา เช่น แคปซูลบรรจุยา และด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น ผสมในครีมเพื่อให้เกิดเจลและเนื้อสัมผัสของครีมนุ่ม และผลิตภัณฑ์ฟิล์มรับประทานได้ในท้องตลาด เช่น ผักผลไม้ขึ้นรูป ไอศกรีม น้ำตาลไอซิ่ง พุดดิ้ง ขนมที่มีลักษณะเป็นเจล และผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เป็นต้น George และ Abraham (2006)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	**บริษัท/ ประเทศ**
1. กลูโคส (glucose)	Sigma/ USA
2. ซูโครส (sucrose)	Ajax/ Australia
3. ยีสต์สกัด (yeast extract)	HiMedia/ India
4. มอลล์สกัด (malt extract)	HiMedia/ India
5. บีฟสกัด (beef extract)	HiMedia/ India
6. เปปโตน (peptone)	HiMedia/ India
7. โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)	Ajax/ Australia
8. โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	Ajax/ Australia
9. ทวีน (tween 80)	Fluka/ Switzerland
10. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Ajax/ Australia
11. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	Carlo Erba Reagent/ Italy
12. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Carlo Erba Reagent/ Italy
13. ถุงแก๊ส (gaspack)	Becton, Dickinson and Company Sparks/ USA
14. โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate)	Aldrich/ China
15. วุ้น (agar)	Sigma/ USA
16. เอทธานอล (95 %)	องค์การสุรา กรมสรรพสามิต/ ประเทศไทย
17. อะซิโตน (acetone)	Duk Sanpure Chemicals/ Korea
18. น้ำมันมะกอก (olive oil)	Naturel/ Spain
19. โซเดียมอะซิเตรต(CH_3COONa)	Ajax/ Australia
20. แอมโมเนียมซิเทรต ($(NH_4)_3C_6H_5O_7$)	Sigma/ USA
21. แมงกานีส ซัลเฟต โมโนไฮเดรต ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	Merck/ Germany
22. ไฮโดรคลอริก แอซิด (HCl)	Merck/ Germany

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

Aureobasidium pullulans NRRL 58543 และ *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013 ได้รับมาจากคลังเชื้อของหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Lactobacillus casei สายพันธุ์ TISTR 390 และ *Lactobacillus acidophilus* สายพันธุ์ TISTR 1338 ได้รับมาจาก คลังเชื้อของหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.4.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543

3.4.1.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน

เลี้ยง *A. pullulans* NRRL 58543 ในอาหารสูตร production medium Prasongsuk และคณะ (2007) โดยใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด เช่น กลูโคส ซูโครส ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 5 0.เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด เช่น เปปโตน โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ เปอร์เซ็นต์ 0.06 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มาวัดน้ำหนักทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 ทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ Prasongsuk และคณะ (2005) และทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยอะซิโตนอีกครั้ง จากนั้นนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ตกตะกอนได้ไปอบให้แห้งที่ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักแห้งคงที่ วัดน้ำหนักของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ และน้ำหนักเซลล์ ออกแบบการทดลองแบบ Factorial Design (FD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

3.4.1.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

คัดเลือกอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนชนิดที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด (ตามข้อมลูที่ได้จากข้อ 3.4.1.1) มาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดยวางแผนการทดลองด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology) แบบ central composite design (CCD) ที่ศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน 6 ระดับ ที่ 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน 3 ระดับ ที่ 0.04 0.06 และ 0.08 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เก็บตัวอย่างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มาวัดน้ำหนักทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4.1.3 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM ที่ปรับผลที่ดีที่สุดจากข้อ 3.4.1.2 โดยเติมน้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 3 5 และ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร) เป็นแหล่งอาหารเสริมเก็บตัวอย่างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มาวัดน้ำหนักทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1

3.4.1.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM ที่ปรับผลที่ดีที่สุดจากข้อ 3.4.1.3 ที่ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารต่างๆ เช่น 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 เก็บตัวอย่างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มาวัดน้ำหนักทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1

3.4.1.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลี้ยง *A. pullulans* NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM ที่ปรับผลที่ดีที่สุดจากข้อ 3.4.1.4 ที่อุณหภูมิต่างๆ เช่น 25 28 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มาวัดน้ำหนักทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12 นำสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS ตามวิธีในข้อ 3.4.1.1

3.4.2 วิเคราะห์สมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

นำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากข้อ 3.4.1 บดเป็นผง และนำไปวิเคราะห์วิเคราะห์โครงสร้างของด้วยด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Infrared spectroscopy) ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (PerkinElmer (Spectrum One), USA) ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยบดตัวอย่าง เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ผสมกับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr poweder) ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อโพแทสเซียม โบรไมด์ 1 : 100 แล้วอัดให้เป็นแผ่น pellet ใช้ความละเอียดในการอ่านค่า (Resolution) 4.0 cm^{-1} จำนวนสแกน (No. of scan) 16 และ Range ที่ใช้วัดอยู่ในช่วง 4,000 - 400 cm^{-1} โดยเปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตโดย *A. pullulans* var *aubasidani* NRRL 58013

วิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy, Varian, USA) ชนิด ^{13}C และ ^{1}H Prasongsuk และคณะ (2007); Manitchotpisit และคณะ (2009) โดยนำตัวอย่างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ละลายในน้ำ D_2O วัดที่ความถี่ 125.76 (^{13}C) และ 500.16 (^{1}H) MHz โดยเปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตโดย *A. pullulans* var *aubasidani* NRRL 58013

3.4.3 การทดสอบสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์ได้แก่ *L. acidophilus* และ *L. casei* โดยเขี่ยเชื้อ *Lactobacillus* จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหาร MRS Broth Lin และ Kolattukudy (1978) 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่า OD_{600} ปรับความหนาแน่นเท่ากับ 0.1 ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความหนาแน่นของเซลล์แล้ว 1 % (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในหลอดที่มี MRS Broth ที่เติมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากข้อ 3.4.1 ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้ออกซิเจนในถังแอนแอโรบิกจาร์ เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นตรวจสอบจากการเจริญของเชื้อด้วยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ (colony forming unit, CFU) โดยการนับด้วยตาเปล่าที่ค่าเชื่อถือประมาณ 30-300 โคโลนี นับเฉพาะโคโลนีที่โตได้และมีชีวิตเท่านั้น การคำนวณโดยนำจำนวนโคโลนีที่นับได้คูณกับจำนวนที่ไดรูท โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียค่าเฉลี่ยที่ได้กับค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองควบคุมที่เติมแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ ได้แก่ บีตากลูแคน (food-grade) (Core-Chematis

Co., Ltd., Thailand) และกลูโคส ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม SPSS

3.4.4 การขึ้นรูปฟิล์มผสมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์มและศึกษาสมบัติฟิล์ม

นำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากข้อ 3.4.1 มาขึ้นรูปฟิล์มโดยใช้อัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์ม โดยใช้เทคนิคการขึ้นรูปด้วยตัวทำละลาย และทำการเทลงบนจานเพสติดิสขนาด 15 x 60 มิลลิเมตร โดยกำหนดปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ต่างๆ กัน ร้อยละ 0 5 10 20 30 และ 50 โดยน้ำหนักของอัลจิเนต จากนั้นทดสอบสมบัติของฟิล์มพรีไบโอติก ประกอบด้วย

3.4.4.1 การเตรียมฟิล์ม

เตรียมแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ต่างๆกันร้อยละ 0 5 10 20 30 และ 50 โดยน้ำหนักของอัลจิเนต และนำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร โดยใช้ magnetic stirrer คนส่วนผสมทั้งหมดจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำสารที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว เทลงจานเพสติดิสสำหรับขึ้นรูปที่มีขนาด 15×60 มิลลิเมตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้น้ำระเหยออกจนได้เป็นแผ่นฟิล์ม ลอกแผ่นฟิล์มออกจากแม่พิมพ์นำแผ่นฟิล์มใส่ถุงพลาสติกแล้วเก็บเข้าตู้อบฆ่าเชื้อประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บแผ่นฟิล์มไว้ใน desiccator เพื่อนำไปทดสอบสมบัติทางกายภาพบางประการต่อไป

3.4.4.2 สมบัติการละลายในน้ำร้อน น้ำเย็น (solubility) Teramoto และ Shibata (2006)

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

3.4.4.3 ความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ Standard (1991)

ศึกษาความสามารถในการยืดตัว (elongation) โดยกำหนดสภาวะของเครื่อง ให้ใช้ load cell ขนาด 5 กิโลกรัม ชุดหัวกดเจาะแบบยาง spherical probe แท่นยึดตัวอย่างฟิล์มที่มีช่องเปิดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร ความเร็วในการเคลื่อน Probe ที่ 10 มิลลิเมตรต่อนาที

ตัวอย่างฟิล์มที่ทดสอบมีขนาดกว้าง 6 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ASTM D 882-02 Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastics Sheeting) เป็นวิธีทดสอบมาตราฐานสำหรับสมบัติแรงดึงของแผ่นฟิล์มบางๆ

3.4.4.4 ทดสอบสมบัติของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรีย *L. acidophilus และ L. casei*

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* 2 สายพันธุ์ได้แก่ *L. acidophilus* และ *L. casei* โดยเขี่ยเชื้อ *Lactobacillus* จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหาร MRS Broth Lin และ Kolattukudy (1978) 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่า OD_{600} ปรับความหนาแน่นเท่ากับ 0.1 ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ปรับความหนาแน่นของเซลล์แล้ว 1 % (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในหลอดที่มี MRS Broth ที่เติมฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่บดแล้วที่ผลิตได้จากข้อ 3.4.4.1 ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะไร้ออกซิเจนในถังแอนแอโรบิกจาร์ เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นตรวจสอบจากการเจริญของเชื้อด้วยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ (colony forming unit, CFU) โดยการนับด้วยตาเปล่าที่ค่าเชื่อถือประมาณ 30-300 โคโลนี นับเฉพาะโคโลนีที่โตได้และมีชีวิตเท่านั้น การคำนวณโดยนำจำนวนโคโลนีที่นับได้คูณกับจำนวนที่ไดรูท โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้กับค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองควบคุมที่ไม่เติมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ด้วยวิธี Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม SPSS

Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543

เมื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543 โดยทำการปรับองค์ประกอบของอาหารสูตร PM และภาวะในการเลี้ยงตามลำดับ ดังนี้

4.1.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเลี้ยง *A. pullulans* NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM ที่ปรับองค์ประกอบชนิดของคาร์บอน ซึ่งประกอบด้วย ซูโครส และกลูโคส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และชนิดของไนโตรเจน ซึ่งประกอบด้วย เปปโตน โพแทสเซียมไนเตรท และโซเดียมไนเตรท ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ได้มากที่สุดในอาหารที่มีซูโครสและโซเดียมไนเตรท ที่ 3.10±0.01 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.09±0.02 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง รองลงมาได้แก่ อาหารที่มีกลูโคสและโพแทสเซียมไนเตรทที่ 2.72±0.02 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 7.8±0.11 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง อาหารที่มีกลูโคสและเปปโตนที่ 2.50±0.02 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 7.7±0.00 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง และอาหารที่มีซูโครสและเปปโตนที่ 2.08±0.04 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 7.90±0.05 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง ตามลำดับ สำหรับในสูตรอาหารอื่นๆ พบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยกว่า 2.0 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกซูโครสและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เพื่อศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนต่อไป เนื่องจากให้น้ำหนักเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 3.10±0.01 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 2) (รูปที่ 4)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักแห้งเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 5.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ชนิดต่าง ๆ pH เริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12

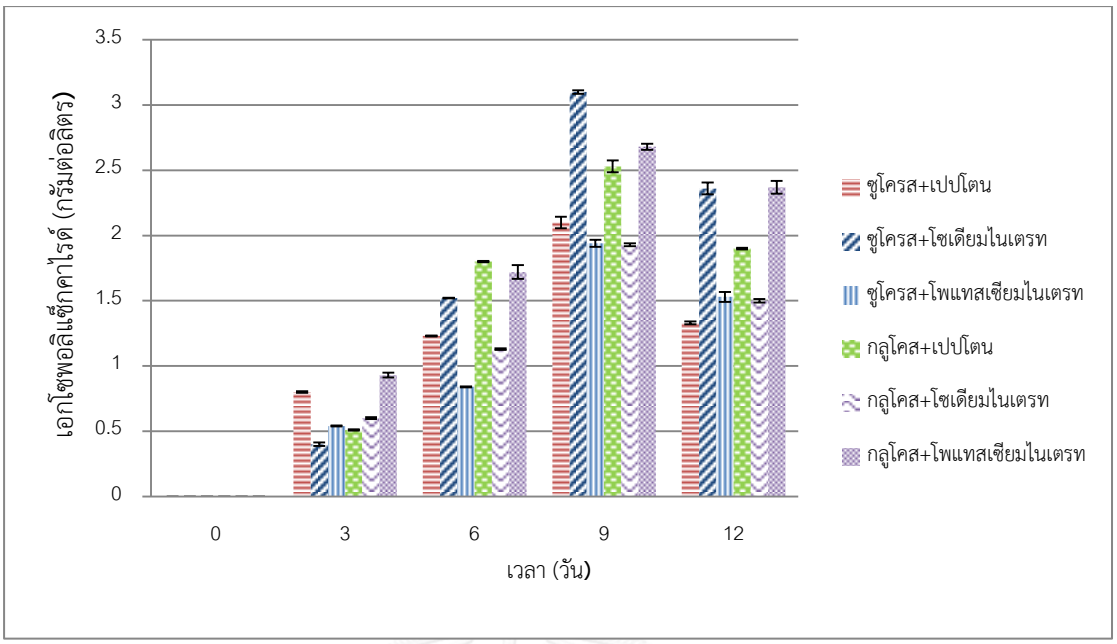
วัน	ซูโครส/เปปโตน		ซูโครส/โซเดียมไนเตรท		ซูโครส/ โพแทสเซียมไนเตรท	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00 ± 0.00^{d}	0.56 ± 0.00^{D}	0.00 ± 0.00^{e}	0.53 ± 0.00^{E}	0.00 ± 0.00^{d}	0.50 ± 0.04^{E}
3	0.80 ± 0.00^{c}	3.42 ± 0.03^{C}	0.40 ± 0.01^{d}	3.70 ± 0.04^{D}	0.54 ± 0.04^{c}	3.50 ± 0.02^{D}
6	1.23 ± 0.01^{b}	6.20 ± 0.01^{B}	1.52 ± 0.03^{c}	5.63 ± 0.08^{C}	0.84 ± 0.00^{c}	5.42 ± 0.05^{C}
9	2.08 ± 0.04^{a}	7.90 ± 0.05^{A}	3.10 ± 0.01^{a}	6.90 ± 0.02^{B}	1.94 ± 0.02^{a}	9.00 ± 0.10^{B}
12	1.33 ± 0.01^{b}	9.10 ± 00.01^{A}	2.36 ± 0.04^{b}	10.71 ± 0.03^{A}	1.53 ± 0.03^{b}	14.80 ± 0.07^{A}

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

ตารางที่ 2 (ต่อ)

วัน	กลูโคส/เปปโตน		กลูโคส/โซเดียมไนเตรท		กลูโคส/โพแทสเซียมไนเตรท	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00 ± 0.00^{d}	0.55 ± 0.01^{D}	0.00 ± 0.00^{e}	0.52 ± 0.01^{C}	0.00 ± 0.00^{d}	0.50 ± 0.01^{D}
3	0.51 ± 0.01^{c}	3.92 ± 0.08^{C}	0.60 ± 0.02^{d}	4.10 ± 0.07^{B}	0.93 ± 0.01^{c}	3.90 ± 0.04^{C}
6	1.80 ± 0.05^{b}	6.70 ± 0.04^{B}	1.13 ± 0.04^{c}	5.13 ± 0.05^{B}	1.72 ± 0.05^{b}	4.36 ± 0.02^{C}
9	2.50 ± 0.02^{a}	7.70 ± 0.00^{B}	1.90 ± 0.01^{a}	7.40 ± 0.06^{B}	2.72 ± 0.02^{a}	7.80 ± 0.11^{B}
12	1.90 ± 0.04^{b}	12.40 ± 0.03^{A}	1.50 ± 0.01^{b}	13.10 ± 0.04^{A}	2.37 ± 0.04^{a}	10.30 ± 0.15^{A}

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



รูปที่ 4 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 5.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ชนิดต่าง ๆ pH เริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12

4.1.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม ของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

จากผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า ซูโครสและโซเดียมไนเตรทสามารถเพิ่มปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ของ *A. pullulan* NRRL 58543 ผลิตได้เป็น 3.10±0.01 กรัมต่อลิตร จึงเลือกมาเพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) โดยมีปัจจัยที่ศึกษาจำนวน 2 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นของซูโครส และ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ประกอบด้วยชุดทดลองจำนวน 9 ชุดทดลอง (ตารางที่ 3) (รูปที่ 5) พบว่า ที่ความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (X_1) และ โซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (X_2) สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด เท่ากับ 8.95±0.03 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3 แผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) และผลการตอบสนองต่อปัจจัยศึกษาที่ได้ (น้ำหนักเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์) สำหรับการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมของการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดย *A. pullulans* NRRL58543

ปัจจัย		รหัสของปัจจัย		น้ำหนักเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)*
ซูโครส เปอร์เซ็นต์ (w/v)	โซเดียมไนเตรท เปอร์เซ็นต์ (w/v)	X_1	X_2	
5.0	0.04	-1	-1	4.95±0.02
5.0	0.06	-1	0	5.54±0.05
5.0	0.08	-1	1	6.60±0.02
6.0	0.04	0	-1	6.21±0.03
6.0	0.06	0	0	8.95±0.03
6.0	0.08	0	1	5.49±0.03
7.0	0.04	1	-1	3.32±0.02
7.0	0.06	1	0	5.72±0.01
7.0	0.08	1	1	7.54±0.02

*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

นำผลการทดลองที่ได้ มาใช้ในการสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ (regression) ระหว่างความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน และการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* NRRL 58543 โดยใช้โปรแกรม Desing-Expert program เวอร์ชั่น 6 ได้ สมการรีเกรสชันดังนี้

$$Y = 8.950-0.480x_1+0.610x_2-2.140x_1^2-1.430x_2^2+0.640x_1x_2$$

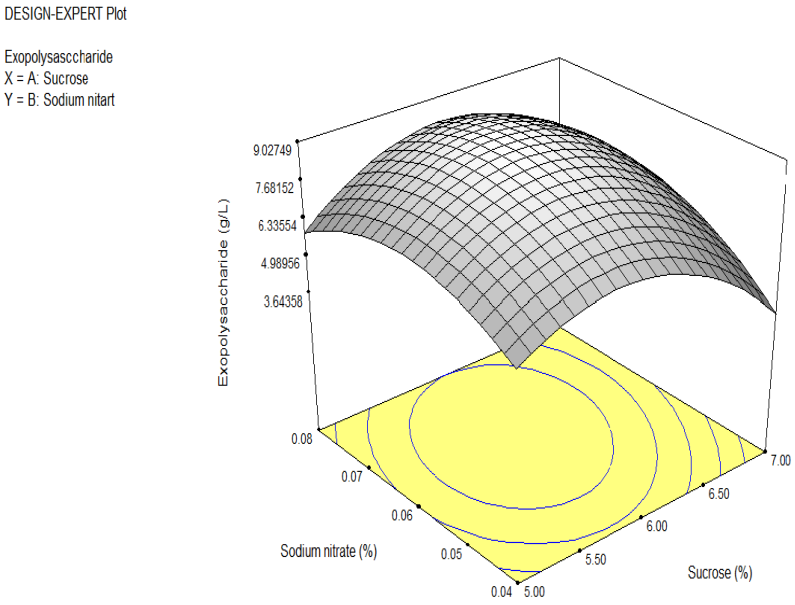
โดย Y คือ ค่าตอบสนองต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* NRRL 58543 (กรัมต่อลิตร)

X_1 คือ ซูโครส (เปอร์เซ็นต์ (w/v))

X_2 คือ โซเดียมไนเตรท (เปอร์เซ็นต์ (w/v))

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร พบว่า ค่า R^2 เท่ากับ 0.87 แสดงว่า การตอบสนองตามสมการดังกล่าวเป็นผลมาจากตัวแปรในค่าตอบสนอง 87.0 เปอร์เซ็นต์ และตัวแปร X และ Y มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่า P = 0.08

แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนอง (contour plot) ถูกนำมาใช้ในการคำนวณหาค่าที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัย ที่ส่งผลให้ *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด จากรูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของความเข้มข้นของซูโครส และ ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท ต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 5 ภาพพื้นผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซูโครส และโซเดียมไนเตรทต่อน้ำหนักของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543

จากการทดสอบสมการรีเกรสชันที่ทำนายการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543 พบว่า ที่ความเข้มข้นของซูโครสร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ โซเดียมไนเตรท ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด เท่ากับ 8.95±0.03 กรัมต่อลิตร โดยทำการทดลองซ้ำในภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตตามที่สมการคำนวณได้อีกครั้งหนึ่ง พบว่า สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 7.21±0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่สมการทำนายได้ (6.29-9.17 กรัมต่อลิตร) ดังนั้น แสดงว่าสมการที่ได้จากแผนการทดลอง

CCD ข้างต้น สามารถนำมาใช้ในการอธิบายการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543 ได้อย่างแม่นยำ

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเลี้ยง *A. pullulans* NRRL 58543 ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้โซเดียมไนเตรท ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับระดับความเข้มข้นของ 2 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของซูโครสต่อความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรท คือ 3.0:0.04, 3.0:0.06, 3.0:0.08, 4.0:0.04, 4.0:0.06, 4.0:0.08, 5.0:0.04, 5.0:0.06, 5.0:0.08, 6.0:0.04, 6.0:0.06, 6.0:0.08, 7.0:0.04, 7.0:0.06, 7.0:0.08, 8.0:0.04, 8.0:0.06 และ 8.0:0.08 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ได้มากที่สุดในอาหารที่ระดับความเข้มข้นของซูโครสต่อโซเดียมไนเตรท ที่ 6.0:0.06 คือ 8.95±0.03 กรัมต่อลิตร และผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นของซูโครสต่อโซเดียมไนเตรท ที่ 3.0:0.08 คือ 3.20±0.05 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 7.34±0.00 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง ดังนั้นจึงเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของซูโครสต่อโซเดียมไนเตรท ที่ 6.0:0.06 เพื่อศึกษาต่อไป เนื่องจากให้น้ำหนักเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 8.95±0.03 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4) (รูปที่ 6)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM (ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน) โดยปรับระดับความเข้มข้นของซูโครสต่อโซเดียมไนเตรท ที่ 3.0:0.04, 3.0:0.06, 3.0:0.08, 4.0:0.04, 4.0:0.06, 4.0:0.08, 5.0:0.04, 5.0:0.06, 5.0:0.08, 6.0:0.04, 6.0:0.06, 6.0:0.08, 7.0:0.04, 7.0:0.06, 7.0:0.08, 8.0:0.04, 8.0:0.06 และ 8.0:0.08 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12

วัน	อัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน					
	3.0:0.04		3.0:0.06		3.0:0.08	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00±0.00^{d}	0.53±0.03^{D}	0.00±0.00^{c}	0.56±0.05^{D}	0.00±0.00^{d}	0.59±0.02^{C}
3	1.22±0.05c	3.40±0.04^{C}	0.93±0.07^{c}	3.60±0.04^{C}	1.50±0.02^{c}	3.30±0.02^{B}
6	1.80±0.05^{c}	4.74±0.00^{B}	4.30±0.30^{b}	4.95±0.04^{B}	1.72±0.02^{c}	4.03±0.03^{B}
9	3.60±0.02^{a}	7.23±0.08^{A}	5.71±0.11^{a}	5.80±0.01^{B}	3.20±0.05^{a}	7.34±0.00^{A}
12	2.33±0.03^{b}	7.10±0.03^{A}	4.60±0.07^{b}	11.24±0.03^{A}	2.20±0.07^{b}	6.30±0.04^{B}

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

ตารางที่ 4 (ต่อ)

วัน	อัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน					
	4.0:0.04		4.0:0.06		4.0:0.08	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00±0.00^{d}	0.54±0.02^{D}	0.00±0.00^{d}	0.52±0.08^{E}	0.00±0.00^{d}	0.56±0.02^{D}
3	1.10±0.06^{c}	3.36±0.04^{C}	1.10±0.01^{c}	3.60±0.04^{D}	0.94±0.04^{c}	3.44±0.12^{C}
6	1.23±0.00^{c}	3.60±0.03^{C}	1.15±0.01^{c}	5.24±0.04^{C}	1.20±0.03^{c}	4.60±0.08^{C}
9	5.51±0.04^{a}	7.20±0.04^{B}	5.52±0.05^{a}	7.50±0.01^{B}	6.22±0.05^{a}	8.27±0.01^{B}
12	3.40±0.01^{b}	8.07±0.02^{A}	2.50±0.08^{b}	12.10±0.03^{A}	4.10±0.03^{b}	10.80±0.01^{A}

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

ตารางที่ 4 (ต่อ)

วัน	อัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน					
	5.0:0.04		5.0:0.06		5.0: 0.08	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตรี)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00 ± 0.00^{d}	0.50 ± 0.07^{D}	0.00 ± 0.01^{d}	0.56 ± 0.01^{E}	0.00 ± 0.00^{c}	0.53 ± 0.06^{D}
3	1.63 ± 0.04^{c}	3.42 ± 0.01^{C}	0.92 ± 0.02^{c}	3.34 ± 0.02^{D}	0.54 ± 0.04^{c}	3.90 ± 0.07^{C}
6	2.50 ± 0.05^{b}	6.90 ± 0.02^{B}	3.20 ± 0.02^{b}	5.70 ± 0.06^{C}	3.30 ± 0.03^{b}	$5.940.02^{B}$
9	4.95 ± 0.02^{a}	9.90 ± 0.07^{B}	5.54 ± 0.05^{a}	7.55 ± 0.02^{AB}	6.60 ± 0.02^{a}	7.28 ± 0.02^{A}
12	4.10 ± 0.04^{a}	10.01 ± 0.02^{A}	3.30 ± 0.01^{b}	7.41 ± 0.04^{A}	3.90 ± 0.05^{b}	6.90 ± 0.05^{A}

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

ตารางที่ 4 (ต่อ)

วัน	อัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน					
	6.0:0.04		6.0:0.06		6.0:0.08	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00 ± 0.00^{e}	0.61 ± 0.02^{C}	0.00 ± 0.00^{d}	0.55 ± 0.00^{C}	0.00 ± 0.00^{d}	0.54 ± 0.01^{C}
3	0.62 ± 0.02^{d}	3.40 ± 0.02^{B}	0.70 ± 0.06^{d}	3.71 ± 0.04^{B}	0.30 ± 0.01^{d}	3.07 ± 0.04^{B}
6	2.20 ± 0.07^{c}	4.86 ± 0.07^{B}	3.11 ± 0.06^{c}	4.10 ± 0.05^{B}	2.80 ± 0.05^{c}	3.20 ± 0.04^{B}
9	6.21 ± 0.03^{a}	8.78 ± 0.17^{A}	8.95 ± 0.03^{A}	11.30 ± 0.06^{A}	5.49 ± 0.03^{a}	8.54 ± 0.07^{A}
12	3.10 ± 0.08^{b}	8.82 ± 0.11^{A}	7.60 ± 0.08^{b}	11.34 ± 0.16^{A}	4.20 ± 0.00^{b}	8.50 ± 0.09^{A}

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

ตารางที่ 4 (ต่อ)

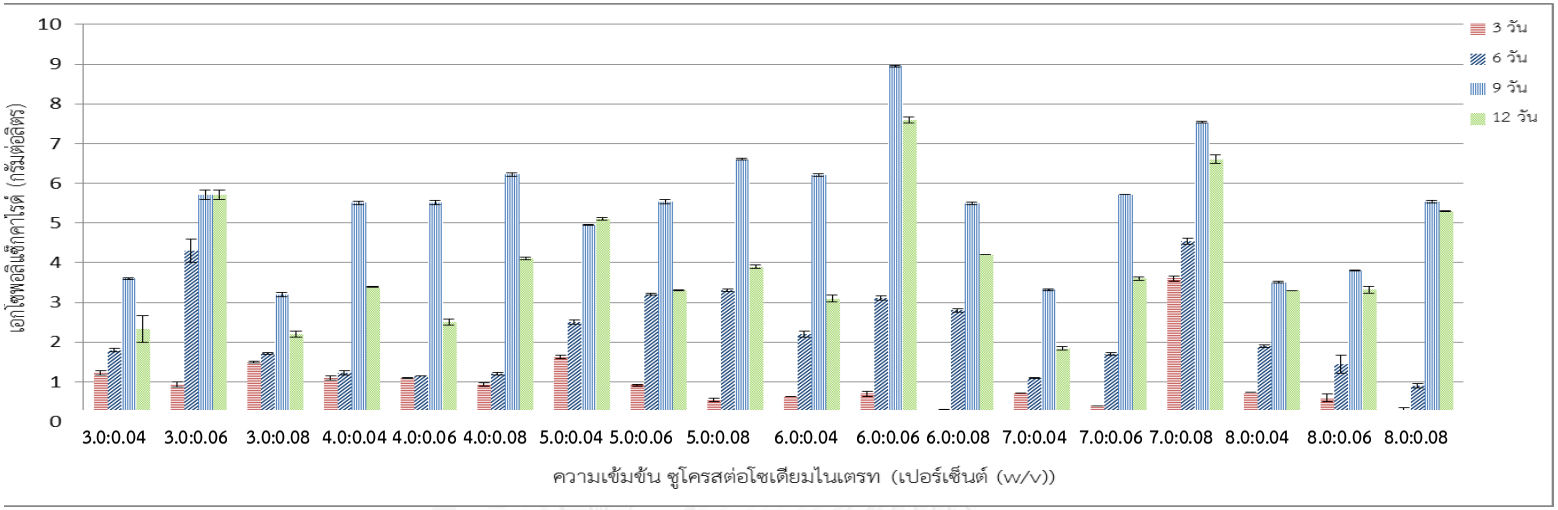
วัน	อัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน					
	7.0:0.04		7.0:0.06		7.0: 0.08	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00 ± 0.00^{e}	0.53 ± 0.00^{C}	0.00 ± 0.00^{c}	0.60 ± 0.02^{C}	0.00 ± 0.00^{c}	0.56 ± 0.00^{C}
3	0.72 ± 0.00^{d}	3.40 ± 0.05^{B}	0.40 ± 0.00^{c}	4.20 ± 0.04^{C}	3.60 ± 0.06^{b}	4.61 ± 0.23^{B}
6	1.10 ± 0.01^{c}	3.83 ± 0.08^{B}	1.70 ± 0.04^{b}	5.26 ± 0.08^{B}	4.54 ± 0.08^{b}	5.00 ± 0.03^{B}
9	3.32 ± 0.02^{a}	8.95 ± 0.07^{A}	5.72 ± 0.01^{a}	10.10 ± 0.02^{A}	7.54 ± 0.02^{a}	9.33 ± 0.05^{A}
12	1.84 ± 0.04^{b}	9.07 ± 0.06^{A}	3.60 ± 0.04^{b}	10.18 ± 0.02^{A}	6.60 ± 0.11^{a}	10.40 ± 0.05^{A}

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

ตารางที่ 4 (ต่อ)

วัน	อัตราส่วนคาร์บอน:ไนโตรเจน					
	8.0:0.04		8.0:0.06		8.0:0.08	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00 ± 0.00^{d}	0.54 ± 0.20^{D}	0.00 ± 0.00^{c}	0.52 ± 0.03^{C}	0.00 ± 0.00^{c}	0.58 ± 0.04^{C}
3	0.73 ± 0.04^{c}	2.13 ± 0.03^{C}	0.60 ± 0.10^{c}	3.60 ± 0.10^{B}	0.23 ± 0.12^{b}	2.30 ± 0.03^{B}
6	1.90 ± 0.03^{b}	3.20 ± 0.02^{B}	1.44 ± 0.22^{b}	4.06 ± 0.07^{B}	0.90 ± 0.05^{b}	2.67 ± 0.00^{B}
9	3.51 ± 0.02^{a}	8.80 ± 0.04^{A}	3.80 ± 0.01^{a}	10.00 ± 0.04^{A}	5.53 ± 0.03^{a}	9.20 ± 0.04^{A}
12	3.30 ± 0.00^{a}	8.04 ± 0.12^{A}	3.30 ± 0.09^{a}	9.07 ± 0.04^{A}	5.30 ± 0.01^{a}	9.66 ± 0.03^{A}

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



รูปที่ 6 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM (ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 5.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน) โดยปรับระดับความเข้มข้นของซูโครสต่อโซเดียมไนเตรท ที่ 3.0:0.04, 3.0:0.06, 3.0:0.08, 4.0:0.04, 4.0:0.06, 4.0:0.08, 5.0:0.04, 5.0:0.06, 5.0:0.08, 6.0:0.04, 6.0:0.06,6.0:0.08, 7.0:0.04, 7.0:0.06, 7.0:0.08, 8.0:0.04, 8.0:0.06 และ 8.0:0.08 (น้ำหนักต่อปริมาตร) pH เริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12

4.1.3 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมที่เหมาะสม

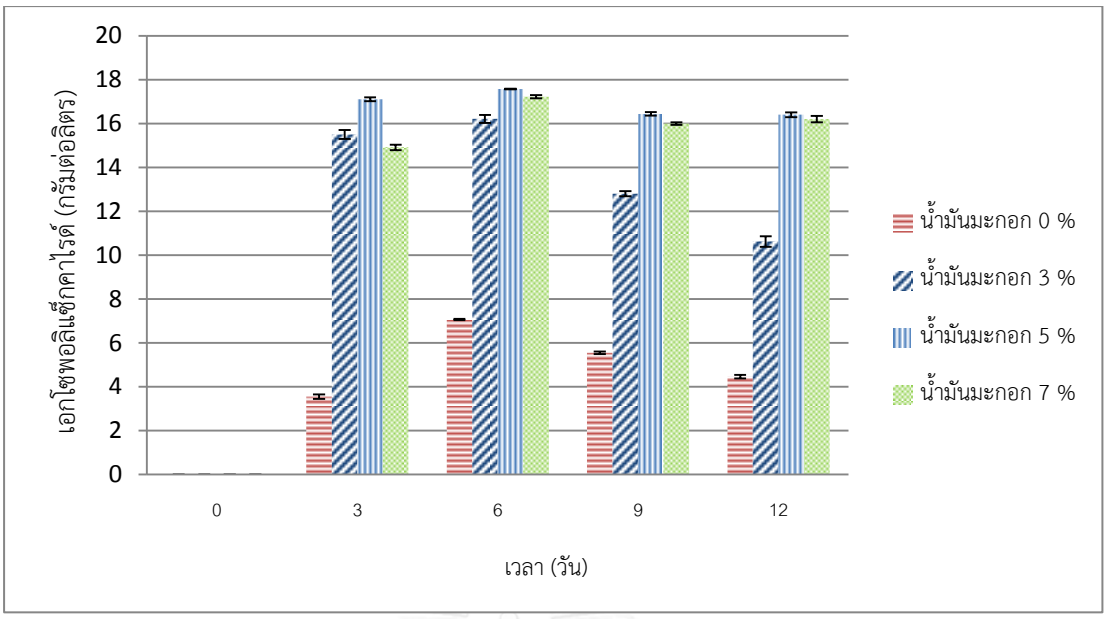
จากการเลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารสูตร PM โดยใช้ซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้โซเดียมไนเตรท ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เมื่อเติมอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 3 5 และ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร) พบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) 17.57±0.01 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 14.48±0.32 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง และผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุดความเข้มข้นของน้ำมันมะกอกร้อยละ 0 (ปริมาตรโดยปริมาตร) 7.06±0.03 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.91±0.17 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง (ตารางที่ 5) (รูปที่ 7) ดังนั้น จึงเลือกน้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในการศึกษาต่อไปเนื่องจากให้น้ำหนักเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 17.57±0.01 กรัมต่อลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 5 ผลของการเติมแหล่งอาหารเสริมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ระดับpH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 0 3 5 และ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร)

วัน	น้ำมันมะกอก ความเข้มข้นร้อยละ 0 (ปริมาตรโดยปริมาตร)		น้ำมันมะกอก ความเข้มข้นร้อยละ 3 (ปริมาตรโดยปริมาตร)		น้ำมันมะกอก ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร)		น้ำมันมะกอก ความเข้มข้นร้อยละ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร)	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00 ± 0.00^{d}	0.25 ± 0.02^{E}	0.00 ± 0.00^{c}	0.17 ± 0.00^{E}	0.00 ± 0.00^{c}	0.18 ± 0.01^{D}	0.00 ± 0.00^{d}	0.20 ± 0.00^{D}
3	3.55 ± 0.10^{c}	3.55 ± 0.10^{D}	15.50 ± 0.20^{a}	4.20 ± 0.22^{D}	17.10 ± 0.09^{b}	2.03 ± 0.01^{C}	14.91 ± 0.12^{c}	3.20 ± 0.01^{C}
6	7.06 ± 0.03^{a}	5.91 ± 0.17^{C}	16.21 ± 0.18^{a}	11.01 ± 0.14^{C}	17.57 ± 0.01^{a}	14.48 ± 0.23^{B}	17.22 ± 0.07^{a}	15.93 ± 0.22^{B}
9	5.55 ± 0.06^{b}	6.55 ± 0.10^{B}	12.80 ± 0.12^{b}	18.71 ± 0.14^{B}	16.44 ± 0.08^{a}	18.60 ± 0.13^{B}	16.00 ± 0.06^{b}	19.50 ± 0.33^{B}
12	4.46 ± 0.08^{b}	8.46 ± 0.08^{A}	10.62±0.24b	24.40 ± 0.31^{A}	16.40 ± 0.11^{a}	23.39 ± 0.33^{A}	16.20 ± 0.14^{b}	21.14 ± 0.02^{A}

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



รูปที่ 7 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 0 3 5 และ 7 (ปริมาตรโดยปริมาตร) เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12

4.1.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

เมื่อศึกษาผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* NRRL 58543 โดยปรับระดับ pH เริ่มต้นของอาหารสูตร PM ที่ใช้ซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน เป็น 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 ก่อนทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) พบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด เมื่อ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 (19.52±0.05 กรัมต่อลิตร)น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.17±0.07 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง และผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุดที่ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 (16.21±0.19 กรัมต่อลิตร) น้ำหนักเซลล์แห้ง 14.72±0.29 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง (ตารางที่ 6) (รูปที่ 8) ดังนั้น จึงเลือก pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม คือ 6.5 ในการศึกษาต่อไปเนื่องจากให้น้ำหนักเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 19.52±0.05 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 6 ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และเติมแหล่งอาหารเสริมคือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) โดยปรับระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12

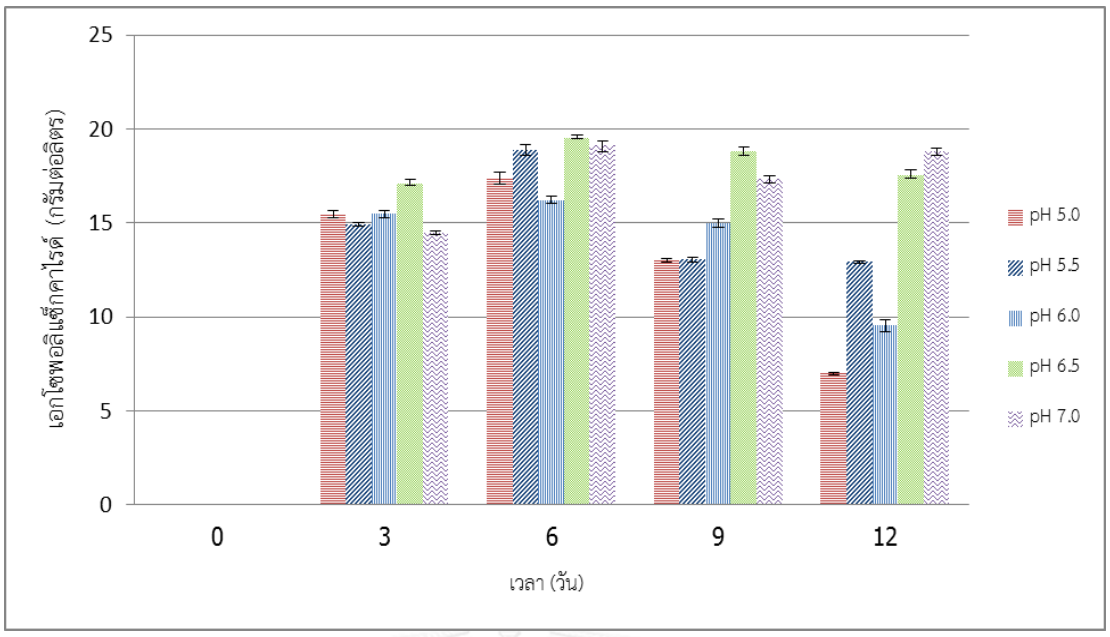
วัน	pH 5.0		pH 5.5		pH 6.0	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00 ± 0.00^{d}	0.20 ± 0.00^{E}	0.00 ± 0.00^{c}	0.17 ± 0.00^{D}	0.00 ± 0.00^{c}	0.15 ± 0.00^{D}
3	15.47 ± 0.20^{b}	4.20 ± 0.22^{C}	14.92 ± 0.12^{b}	4.22 ± 0.02^{C}	15.46 ± 0.18^{a}	4.51 ± 0.18^{C}
6	17.36 ± 0.32^{a}	$13..23\pm0.37^{B}$	18.88 ± 0.30^{a}	17.40 ± 0.22^{b}	16.21 ± 0.19^{a}	14.72 ± 0.29^{B}
9	13.02 ± 0.11^{b}	18.81 ± 0.14^{A}	13.04 ± 0.12^{b}	18.61 ± 0.13^{A}	15.01 ± 0.22^{a}	18.70 ± 0.15^{A}
12	6.97 ± 0.07^{c}	18.60 ± 0.05^{D}	12.91 ± 0.05^{b}	18.00 ± 0.10^{A}	9.54 ± 0.30^{b}	18.07 ± 0.18^{B}

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

ตารางที่ 6 (ต่อ)

วัน	pH 6.5		pH 7.0	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00 ± 0.00^{d}	0.17 ± 0.00^{D}	0.00 ± 0.00^{c}	0.21 ± 0.00^{D}
3	17.11 ± 0.12^{b}	4.28 ± 0.10^{C}	14.81 ± 0.12^{b}	3.95 ± 0.04^{C}
6	19.52 ± 0.05^{a}	17.17 ± 0.07^{B}	19.10 ± 0.29^{a}	15.30 ± 0.20^{B}
9	18.81 ± 0.23^{b}	17.61 ± 0.13^{A}	17.33 ± 0.20^{b}	19.38 ± 0.23^{A}
12	17.54 ± 0.14^{c}	17.30 ± 0.08^{B}	16.80 ± 0.18^{b}	18.60 ± 0.13^{B}

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



รูปที่ 8 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และเติมแหล่งอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยปรับระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่ 5.0 5.5 6.0 6.5 และ7.0 เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12

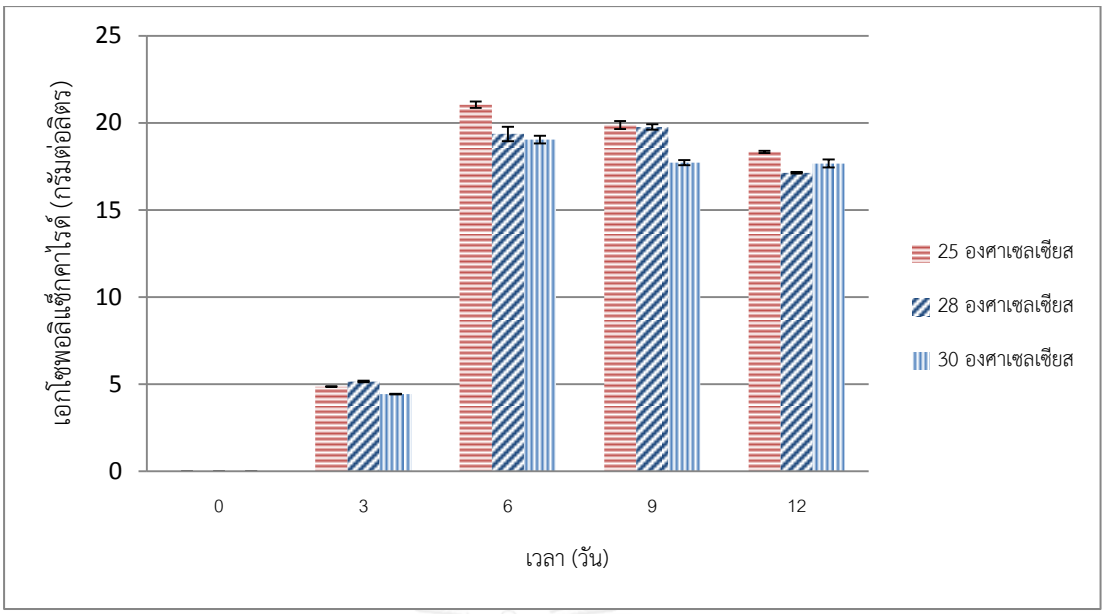
4.1.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ของ *A. pullulans* NRRL 58543 โดยเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่มีซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมี pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 6.5 ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25 28 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือ 21.04±0.19 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.07±0.07 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง และผลิตได้น้อยที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คือ 19.04±0.22 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.70±0.02 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง (ตารางที่ 7) (รูปที่ 9) ดังนั้น จึงเลือกอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในการศึกษาต่อไปเนื่องจากให้น้ำหนักเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 21.04±0.19 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) และน้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 และเติมแหล่งอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 25 28 และ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12

วัน	25 องศาเซลเซียส		28 องศาเซลเซียส		30 องศาเซลเซียส	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)
0	0.00 ± 0.00^{d}	0.20 ± 0.00^{D}	0.00 ± 0.00^{d}	0.18 ± 0.00^{D}	0.00 ± 0.00^{d}	0.16 ± 0.00^{D}
3	4.85 ± 0.01^{c}	7.09 ± 0.05^{C}	5.15 ± 0.05^{c}	5.67 ± 0.03^{C}	4.42 ± 0.02^{c}	5.98 ± 0.02^{C}
6	21.04 ± 0.19^{a}	17.07 ± 0.07^{B}	19.36 ± 0.41^{a}	19.78 ± 0.02^{A}	19.04 ± 0.22^{a}	17.70 ± 0.02^{A}
9	19.88 ± 0.23^{b}	17.50 ± 0.16^{B}	19.76 ± 0.16^{a}	19.57 ± 0.23^{A}	17.71 ± 0.15^{b}	17.08 ± 0.12^{B}
12	18.33 ± 0.07^{b}	18.18 ± 0.22^{A}	17.13 ± 0.05^{b}	19.29 ± 0.13^{B}	17.66 ± 0.23^{b}	17.43 ± 0.03^{A}

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



รูปที่ 9 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (กรัมต่อลิตร) จาก *A. pullulans* NRRL 58543 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่เติมซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมไนเตรทความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 และเติมแหล่งอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 25 28 และ30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที โดยเก็บทุกวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 12

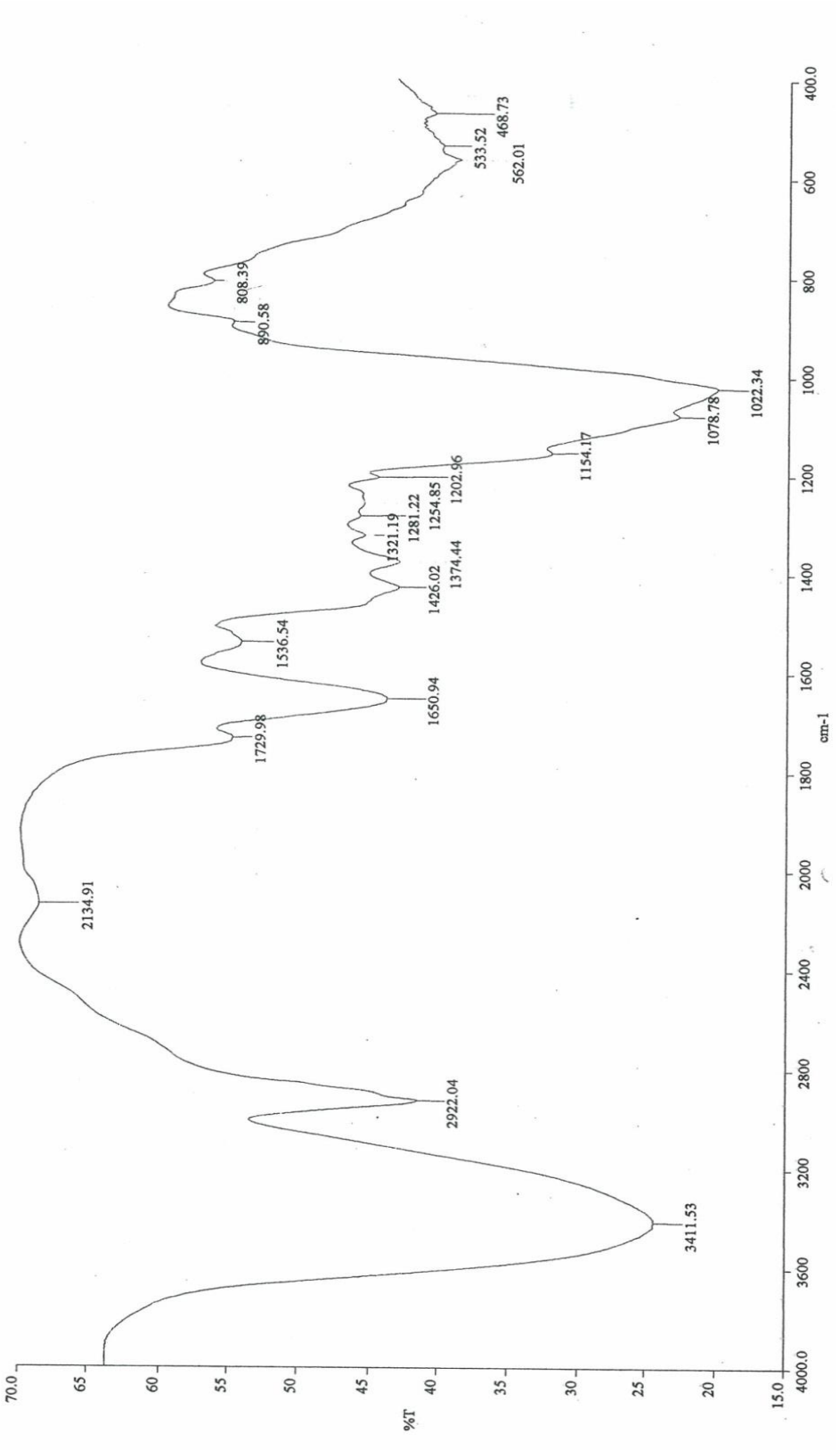
เมื่อประมวลผลจากการทดลองทั้งหมดพบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ได้มากที่สุดในอาหารสูตร PM ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แต่มีการปรับองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนคือ เปลี่ยนจากเปปโตนมาเป็นโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเติมแหล่งอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 6.5 และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ได้สูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ที่ 21.04±0.19 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่ไม่ผ่านการปรับองค์ประกอบและภาวะในการเลี้ยงถึง 5.78 เท่า

4.2 วิเคราะห์สมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

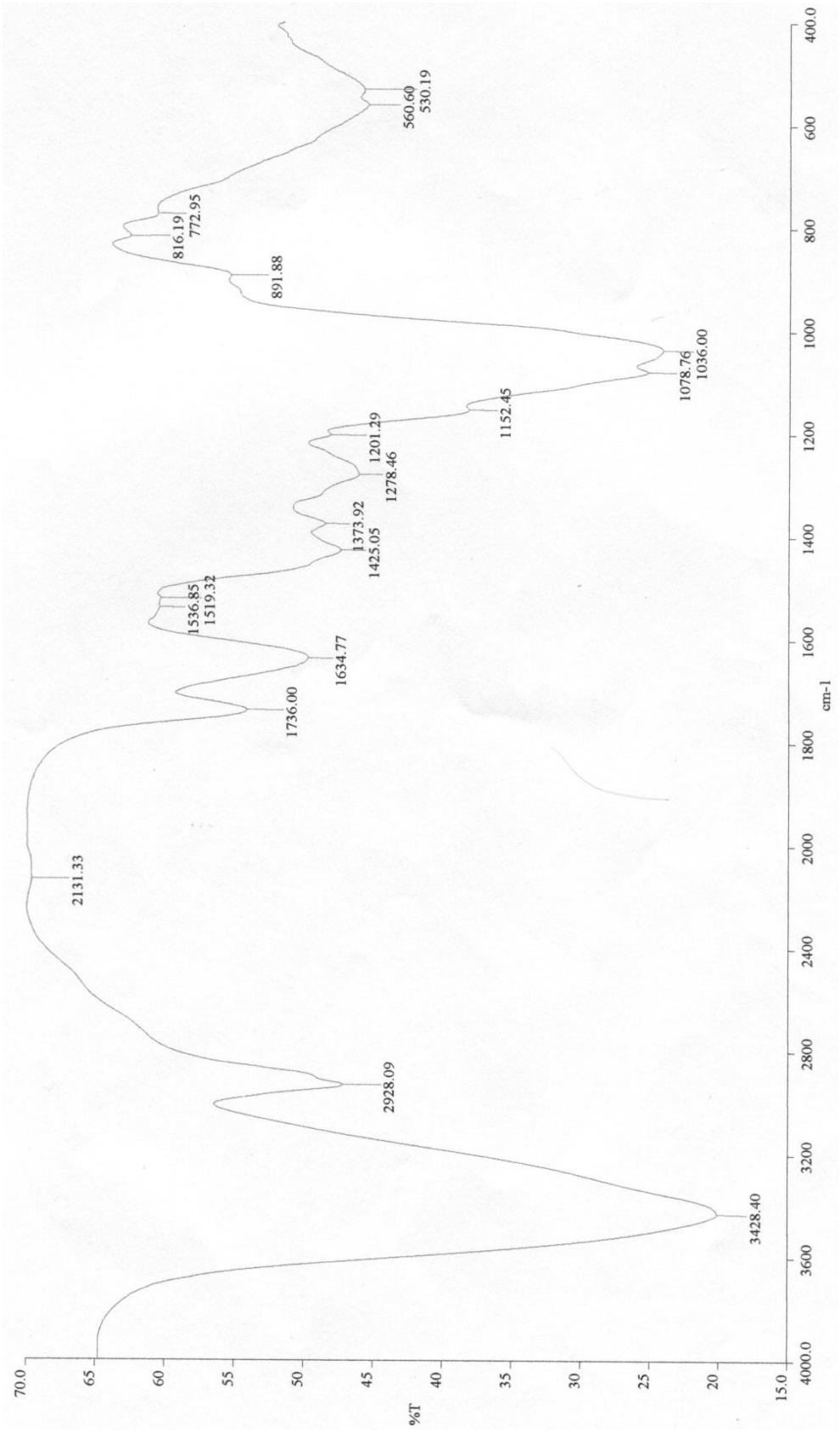
จากการวิเคราะห์โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) เปรียบเทียบกับออบาซิแดน พบว่าโครงสร้างของออบาซิแดน และเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ มีหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ที่ประกอบด้วย alkane, carbonyl, ether, hydroxyl, hydroxyl bonding in alcohol และ primary alcohol เหมือนกัน แต่ในเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 ไม่พบหมู่ฟังก์ชัน α-configuration แต่พบหมู่ฟังก์ชันที่เป็น β-configuration เช่นเดียวกันกับออบาซิแดนที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013 โดยจะมีพีกที่ตำแหน่ง 890.58 และ 891.88 cm^{-1} ตามลำดับ (ตารางที่ 8) (รูปที่ 10-12)

ตารางที่ 8 หมู่ฟังก์ชัน และตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก FTIR สเปกตราของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 เปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013

หมู่ฟังก์ชัน	ตำแหน่งพีก (wavenumber, cm^{-1})	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (NRRL 58543)	ออบาซิแดน (NRRL 58013)
-OH	3411.53	3428.40
-C-H	2922.04	2928.09
C=O	2134.91	2131.33
-C-OH	1426.02	1425.05
-OH bonding in alcohol	1374.85	1373.92
C-O	1078.78	1078.76
α-configuration	-	-
β-configuration	890.58	891.88



รูปที่ 10 FT-IR spectrum ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543



รูปที่ 12 FT-IR spectrum ของอนาซีแลนที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013

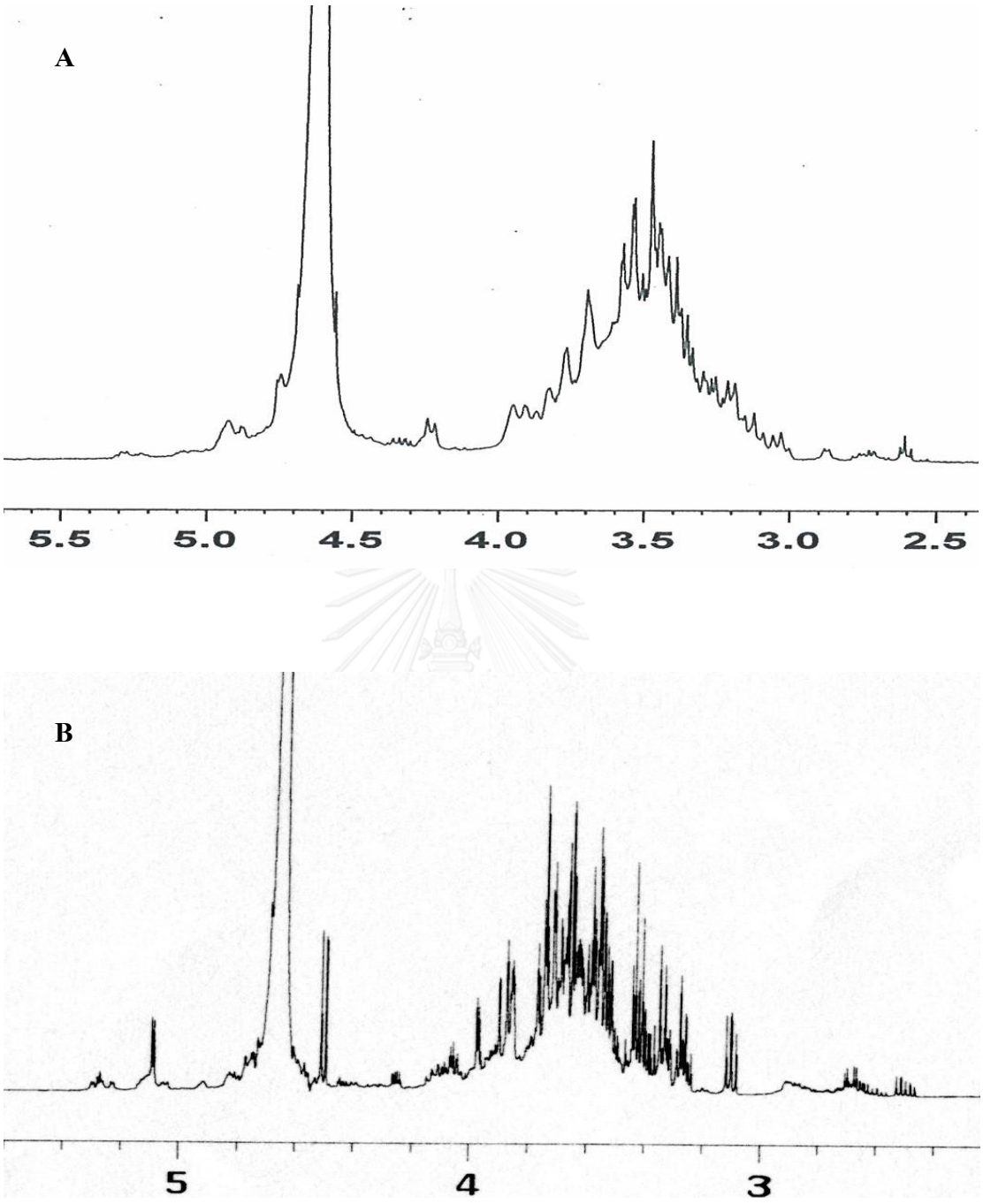
จากการวิเคราะห์โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนสเปค-โตรสโคปี (Nuclear magnetic resonance spectroscopy) ชนิด ^{13}C และ ^{1}H เปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013 พบว่าโครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 มีพีก ^{1}H-NMR ที่แสดง β-1, 3 (4.363, 4.407 และ 4.440 ppm) β-1, 6 (4.221, 4.246, 4.278 และ 4.289 ppm) α-1, 4 (5.135, 5.209, 5.119, 5.228, 5.242, 5.276 และ 5.294 ppm) และ α-1, 6 (4.930 ppm) configurations ซึ่งคล้ายกันกับโครงสร้างออบาซิแดน คือ มีพีก ^{1}H-NMR ที่แสดง β-1, 3 (4.513 และ 4.497 ppm) β-1, 6 (4.265, 4.257, 4.249 และ 4.241 ppm) α-1, 4 (5.226, 5.234, 5.262, 5.271, 5.279, 5.292 และ 5.299 ppm) และ α-1, 6 (4.918 ppm) configurations ในส่วนการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{13}C-NMR พบว่า โครงสร้างของ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ มีพีกขึ้นที่บริเวณ C-1 ของ α-1, 4 (ประมาณ 100.870 ppm) C-1 ของ α-1, 6 (ประมาณ 98.412 ppm) C-3 ของ β-1, 3 (ประมาณ 81.770 ppm) O-substituted C-6 (ประมาณ 67.305 ppm) และ C-6 (ประมาณ 62.208 และ 63.457 ppm) คล้ายกันกับออบาซิแดน แต่โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 ไม่พบพีก C-4 (ประมาณ 79.115 ppm) และ C-1 ของ β-1,6 (ประมาณ 104.200 ppm) ในขณะที่พบพีกชนิดนี้ในโครงสร้างออบาซิแดน (ตารางที่ 9,10) (รูปที่ 13, 14)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 9 ตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก ^{1}H–NMR สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

Signal	^{1}H –NMR chemical shift (ppm.)	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (NRRL 58543)	ออบาซิแดน (NRRL 58013)
α-1, 4	5.135 5.209 5.119 5.228 5.242 5.276 และ 5.294	5.226 5.234 5.262 5.271 5.279 5.292 และ 5.299
α-1, 6	4.930	4.918
β-1,3	4.363 4.407 และ 4.440	4.497 และ 4.513
β-1,6	4.221 4.246 4.278 และ 4.289	4.241 4.249 4.257 และ 4.265

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

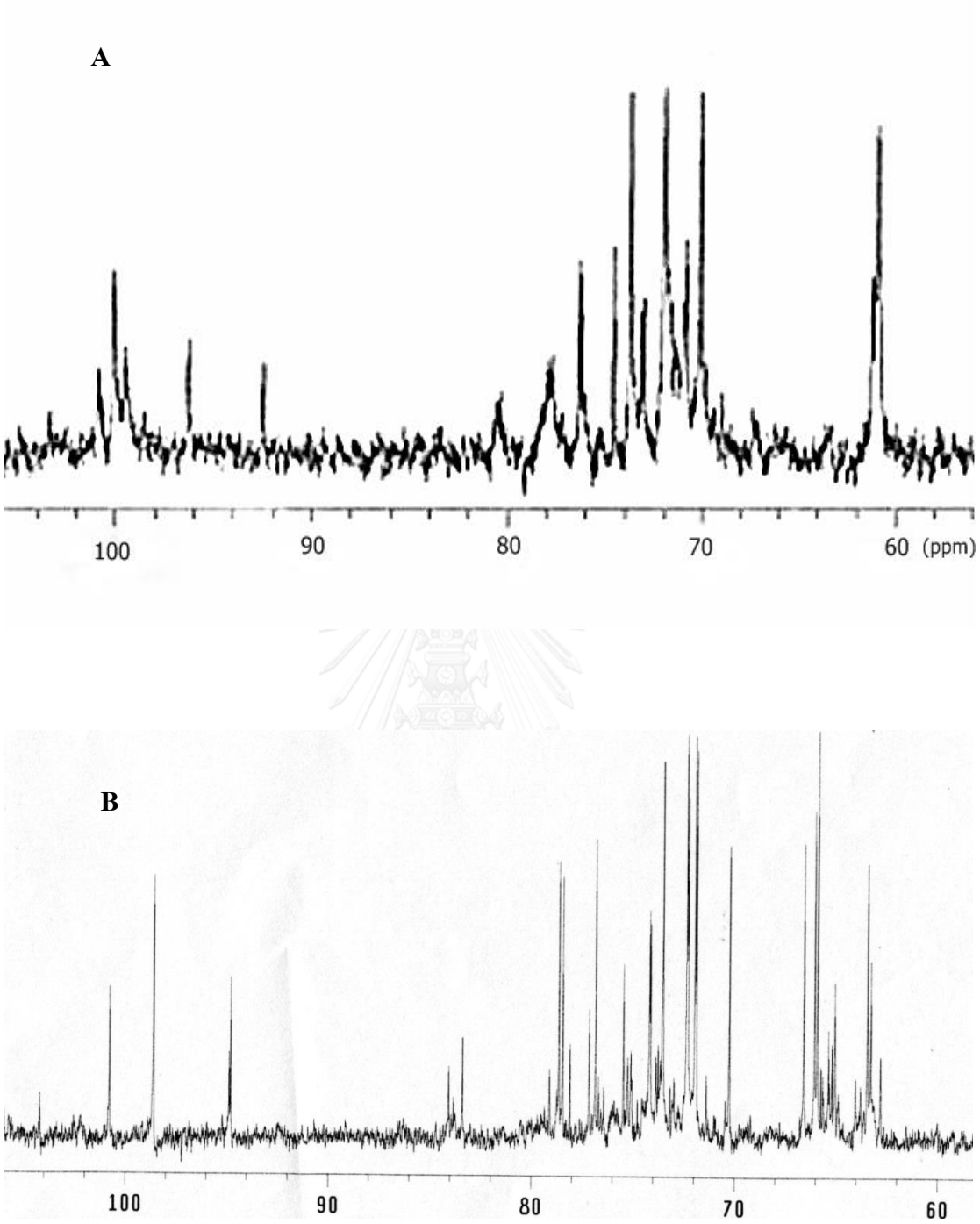


รูปที่ 13 ^{1}H-NMR spectrum ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก (A) *A. pullulans* NRRL 58543 เปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตจาก (B) *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL58013

ตารางที่ 10 ตำแหน่งพีกหลักซึ่งได้จาก ^{13}C–NMR สเปกตราที่ระบุชนิดของหมู่ฟังก์ชันของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

Signal	^{13}C-NMR chemical shift (ppm.)	
	เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (NRRL 58543)	ออบาซิแดน (NRRL 58013)
C-1 of α-1,4	100.870	100.775
C-1 of α-1,6	98.412	98.615
C-1 of β-1,6	-	104.200
C-3 of β-1, 3	81.770	83.382 83.829 และ 84.063
C-4	-	78.097 78.463 78.654 และ 79.115
O-substituted C-6	67.350	66.070 และ 66.598
C-6	62.208 และ 63.601	63.296 และ 63.457

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 14 ^{13}C-NMR spectrum ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก (A) *A. pullulans* NRRL 58543 เปรียบเทียบกับออบาซิแดนที่ผลิตจาก (B) *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL58013

4.3 การทดสอบสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

จากการทดสอบสมบัติในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543 โดยเปรียบเทียบการเติบโตระหว่าง *L. acidophilus* และ *L. casei* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ใส่เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) กับอาหารเหลว MRS ที่เติมบีตากลูแคน (food-grade) (Core-Chematis Co., Ltd., Thailand) และกลูโคส ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543 และบีตากลูแคน สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เติมกลูโคสและไม่เติมแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 11 ผลของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ต่อการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

MRS medium Supplementation (w/v)	จำนวนโคโลนีแบคทีเรีย (CFU/ml)	
	L. acidophilus	*L. casei*
control	$1.33\pm0.15\times10^{10\ c}$	$2.03\pm0.25\times10^{10\ C}$
0.5% กลูโคส	$3.36\pm0.30\times10^{10\ b}$	$3.10\pm0.25\times10^{10\ B}$
0.5% บีตากลูแคน (เกรดการค้า)	$6.73\pm0.30\times10^{11\ a}$	$7.20\pm0.30\times10^{11\ A}$
0.5% เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์	$4.63\pm0.40\times10^{11\ a}$	$4.72\pm0.35\times10^{11\ A}$

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

ตารางที่ 12 ผลของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ต่อการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

MRS medium Supplementation (w/v)	จำนวนโคโลนีแบคทีเรีย (CFU/ml)	
	L. acidophilus	*L. casei*
control	$1.52\pm0.40\times10^{10\ d}$	$2.15\pm0.26\times10^{10\ D}$
1.0% กลูโคส	$3.73\pm0.37\times10^{10\ c}$	$5.46\pm0.45\times10^{10\ C}$
1.0% บีตากลูแคน (เกรดการค้า)	$4.51\pm0.25\times10^{12\ a}$	$3.28\pm0.25\times10^{12\ A}$
1.0% เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์	$2.58\pm0.45\times10^{12\ b}$	$2.99\pm0.20\times10^{12\ B}$

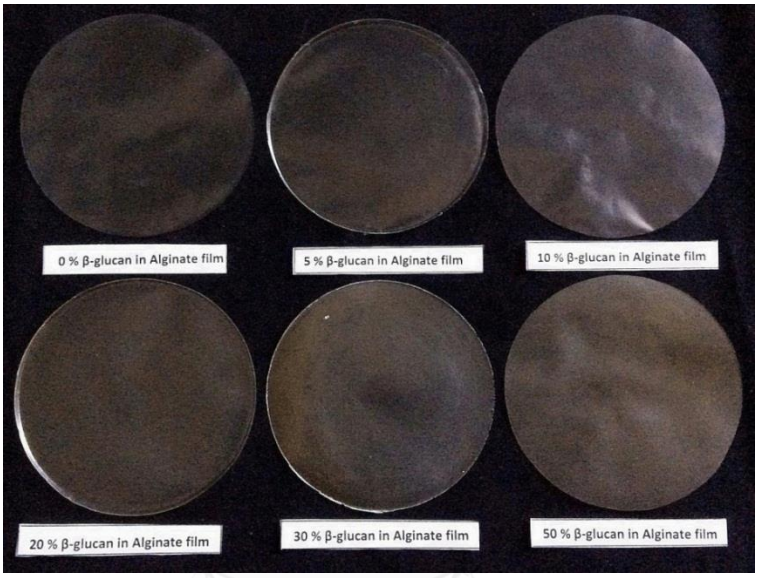
*ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.4 การขึ้นรูปฟิล์มผสมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์มและศึกษาสมบัติฟิล์ม

4.4.1 การเตรียมฟิล์ม

จากการทดลองนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 มาขึ้นรูปฟิล์มที่ปริมาณร้อยละ 0 5 10 20 30 และ 50 โดยน้ำหนักอัลจิเนตได้ฟิล์มผสมที่มีความหนาในช่วง 0.09-0.12 มิลลิเมตร ฟิล์มที่ได้มีลักษณะ เปราะ และแตกได้ง่าย จากนั้นนำฟิล์มที่ได้ไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป



รูปที่ 15 ฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.4.2 สมบัติการละลายในน้ำร้อน น้ำเย็น (solubility)

จากการศึกษาสมบัติการละลายในน้ำร้อน น้ำเย็น (solubility) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการละลายในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ละลายในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่า ฟิล์มเกิดการบวมตัวและละลายกลายเป็นเจลได้ช้าลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (ตารางที่ 13-16) และละลายได้ไม่หมด พบเป็นตะกอนเล็กๆ ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เหลืออยู่ โดยที่ความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่สูงขึ้นก็จะพบตะกอนเหลืออยู่มากขึ้น

4.4.2.1 สมบัติการละลายในน้ำเย็น

ตารางที่ 13 สมบัติการละลายน้ำของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยน้ำหนักของอัลจิเนตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ	ร้อยละเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักอัลจิเนต (w/w)	เวลาที่ใช้ในการละลาย (นาที)
25°C	50	4.2±0.68[a]
	30	4.0±0.20[a]
	20	3.4±0.57[ab]
	10	3.2±0.10[b]
	5	3.1±0.28[b]
	0	3.0±0.00[b]

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

ตารางที่ 14 สมบัติการละลายน้ำของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยน้ำหนักของอัลจิเนตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ	ร้อยละเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักอัลจิเนต (w/w)	เวลาที่ใช้ในการละลาย (นาที)
30°C	50	4.0±0.00[a]
	30	3.3±0.28[a]
	20	3.2±0.31[ab]
	10	3.1±0.55[bc]
	5	3.0±0.75[c]
	0	1.2±0.29[d]

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

4.4.2.2 สมบัติการละลายในน้ำร้อน

ตารางที่ 15 สมบัติการละลายน้ำของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยน้ำหนักของอัลจิเนตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ	ร้อยละเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักอัลจิเนต (w/w)	เวลาที่ใช้ในการละลาย (นาที)
37°C	50	3.4±0.05[a]
	30	3.0±0.05[b]
	20	2.3±0.27[c]
	10	2.0±0.06[d]
	5	1.4±0.11[d]
	0	1.3±0.15[e]

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

ตารางที่ 16 สมบัติการละลายน้ำของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยน้ำหนักอัลจิเนตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ	ร้อยละเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักอัลจิเนต (w/w)	เวลาที่ใช้ในการละลาย (นาที)
40°C	50	3.2±0.15[a]
	30	3.0±0.00[ab]
	20	2.4±0.17[b]
	10	2.2±0.15[c]
	5	1.3±0.33[d]
	0	1.0±0.15[e]

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

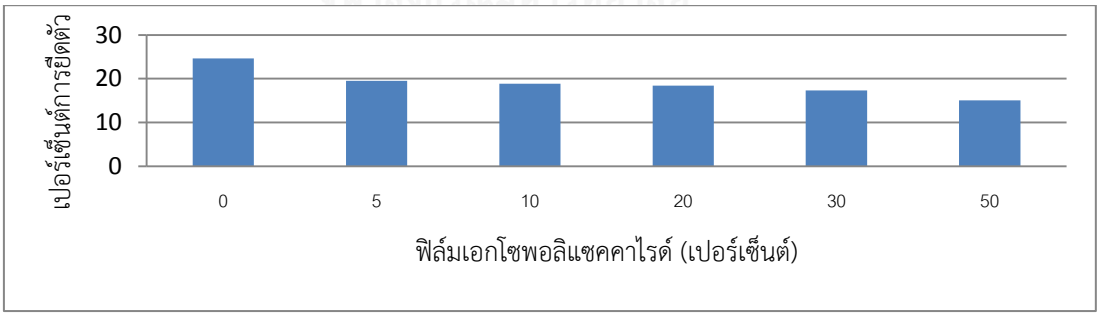
4.4.3 ความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

ศึกษาความสามารถในการยืด (elongation) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยน้ำหนักของอัลจิเนต พบว่า ค่าความทนต่อแรงดึงและเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยน้ำหนักอัลจิเนต มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในฟิล์มสูงขึ้น (ตารางที่ 17) (รูปที่ 16)

ตารางที่ 17 ค่าความเค้น (Stress) และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ร้อยละเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักอัลจิเนต (w/w)	ค่าความเค้น (Stress) (kgf/mm^2)	เปอร์เซ็นต์การยืดตัว (%)
0	41.02 ± 7.09^{a}	24.66 ± 5.19^{A}
5	39.08 ± 7.47^{b}	19.48 ± 3.38^{B}
10	35.14 ± 3.80^{ab}	18.84 ± 4.58^{AB}
20	34.53 ± 3.48^{ab}	18.44 ± 1.37^{AB}
30	26.32 ± 1.63^{b}	17.32 ± 3.95^{AB}
50	15.15 ± 2.24^{c}	15.04 ± 2.24^{B}

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



รูปที่ 16 เปอร์เซ็นต์การยืดตัวของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0 5 10 20 30 และ 50 โดยน้ำหนักอัลจิเนต

4.4.4 ทดสอบสมบัติของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

จากการทดสอบสมบัติในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543 โดยเปรียบเทียบการเติบโตระหว่าง *L. acidophilus* และ *L. casei* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ใส่ฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่บดแล้ว ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้เมื่อเปอร์เซ็นต์ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มมากขึ้น การกระตุ้นการเติบโตก็จะมากขึ้นตามด้วย (ตารางที่ 18) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

ตารางที่ 18 ผลของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *L. acidophilus* และ *L. caspei*

ร้อยละเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อน้ำหนักอัลจิเนต (w/w)	จำนวนโคโลนีแบคทีเรีย (CFU/ml)	
	L. acidophilus	*L. casei*
control	$1.12\pm0.15\times10^{10\ d}$	$1.80\pm0.15\times10^{10\ D}$
20 %	$2.71\pm0.10\times10^{11\ c}$	$3.04\pm0.15\times10^{11\ C}$
30 %	$3.61\pm0.28\times10^{11\ b}$	$5.93\pm0.20\times10^{11\ B}$
50 %	$2.57\pm0.20\times10^{12\ a}$	$2.74\pm0.25\times10^{12\ A}$

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

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

5.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543

5.1.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีความจำเป็นต่อการเติบโตของเซลล์ จึงสนใจทำการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อกิจกรรมของเซลล์ที่ใช้ในการเติบโต และการสร้างสารประกอบต่างๆ เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ให้มากขึ้น โดยจากการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน พบว่า อาหาร PM ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงที่สุด คือ 3.10±0.01 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง และกลูโคสกับโซเดียมไนเตรทผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ต่ำที่สุด คือ 1.90±0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555)ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม โดยจากการศึกษาแหล่งคาร์บอน พบว่า แหล่งคาร์บอนที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ ซูโครส 3.53±0.03 กรัมต่อลิตร และจากรายงานของ Leathers และคณะ (1988) ในการศึกษา *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 พบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดพลูลูแลน Reese และ Maguire (1971) พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากลูโคส เนื่องจาก *A. pullulans* สามารถผลิตเอนไซม์ซูเครส (invertase, EC. 3.2.1.26) ได้ และจากการศึกษา Prasongsuk และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตพลูลูแลนที่คัดแยกได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน พบว่าเมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตพลูลูแลนดีที่สุด จากการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นของ *A. pullulans* ก็พบว่าส่วนใหญ่สามารถใช้ซูโครสได้ดี เช่น จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดย *A. pullulans* สายพันธุ์ P56 ของ Schuster และคณะ (1993) พบว่า ซูโครสให้ผลผลิตสูงสุด (0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

สำหรับการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์นั้น สามารถใช้โซเดียมไนเตรทได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yurlova และคณะ (1995) พบว่า *A. pullulans* var. *aubasidani* สามารถใช้โซเดียมไนเตรทในการผลิตออบาซิแดนได้ดีที่สุด ในขณะที่

ถ้าเป็น *A. pullulans* var. *pullulans* จะสามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งในโตรเจนในการผลิตพูลลูแลนได้ดีกว่า จากการศึกษาของ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม พบว่า อาหารสูตร PM ที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ 3.53±0.03 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาของ Thirumavalavan และคณะ (2009) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตพลูลูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ MTCC 2195 พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณพลูลูแลนสูงที่สุดมี 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท และยีสต์สกัด

5.1.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม ของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม ของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน แม้ว่าการปรับชนิดของแหล่งไนโตรเจนจากเปปโตนมาเป็นโซเดียมไนเตรทจะสามารถเพิ่มผลผลิตของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ สูงขึ้นจากสูตรอาหารเดิม แต่ปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยที่อาจจะส่งผลกระทบต่อการผลิต คือ ความเข้มข้นของทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในการศึกษานี้เลือกใช้วิธี response surface methodology (RSM) ซึ่งเป็นวิธีทางสถิติที่นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาตัวแปรที่ซับซ้อน เข้ามาช่วยทำนายความเข้มข้นที่เหมาะสมและผลผลิตที่คาดว่าจะได้ โดยวางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) Ghadge และ Raheman (2006) โดยเทคนิค RSM สามารถลดจำนวนกลุ่มการทดลองและได้ผลการทดลองซึ่งเป็นที่ยอมรับทางสถิติ Jeong และคณะ (2009) ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ โซเดียมไนเตรท 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุด คือ 8.95±0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งอัตราผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น และจากการตรวจสอบสมการอธิบายการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543 โดยทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่งพบว่า สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 7.21±0.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงที่สมการทำนายได้ (6.29-9.17 กรัมต่อลิตร) ดังนั้น แสดงว่าสมการที่ได้สามารถนำมาใช้ในการอธิบายการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543 ได้อย่างแม่นยำ

5.1.3 ศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริมที่เหมาะสม

จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอก เนื่องจากในน้ำมันมะกอก มีวิตามินจัดเป็นสารอินทรีย์ซึ่งวิตามินมีหน้าที่เกี่ยวข้องในการเร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็น coenzyme หรือเป็นส่วนประกอบของ coenzyme ที่ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ที่เหมาะสม และกรดไขมันต่างๆยังช่วยให้เชื้อเจริญได้ดีมากขึ้น สารอินทรีย์หลายชนิดที่เชื้อราต้องการปริมาณน้อยแต่ความเข้มข้นมากกว่าวิตามิน ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดต่างๆ ได้แตกต่างกันคือสารที่เป็น growth factor ได้แก่ fatty acids, amino acids, succinic acid, sterols, purine, pyrimidine inositol Kikuchi และคณะ (1973) จากการศึกษาระดับความเข้มข้นของอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอก ต่อการผลิตของเชื้อ *A. pullulans* NRRL 58543 พบว่าเมื่อเติมอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอกร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ให้ผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุดคือ 17.57±0.01 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง และให้ผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำที่สุดคือ 16.21±0.18 กรัมต่อลิตร เมื่อไม่เติมอาหารเสริม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของปริศนา มังสา (2554) ได้ทำการศึกษาผลของภาวการณ์ผลิตที่มีน้ำหนักโมเลกุลของพลูลูแลนที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน โดยศึกษาทดลองเติมแหล่งอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว น้ำกะทิ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 5 และ 7 (v/v) พบว่า น้ำมันมะกอก ความเข้มข้นร้อยละ 5 (v/v) สามารถผลิตพลูลูแลนได้สูงสุด 36.01±0.12 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง และจากรายงานของ Roukas (1999) ได้ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจากโรงงานเบียร์โดยใช้ *A. pullulans* ในการทดลองศึกษาผลของการเติมแหล่งอาหารเสริม พบว่า เมื่อเติมแหล่งอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอกร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตร และ Tween 80 ร้อยละ 0.5 ปริมาตรโดยปริมาตร ให้ปริมาณพูลลูแลน 8.5±0.3 กรัมต่อลิตร ขณะที่ในอาหารสูตรปกติที่ไม่เติมแหล่งอาหารเสริมให้ปริมาณพูลลูแลน 6.0±0.3 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาการเติมแหล่งอาหารเสริม Lazaridou และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจากกากน้ำตาลบีทโดยใช้สายพันธุ์ nonpigmented จาก *A. pullulans* โดยเติมแหล่งอาหารเสริมคือน้ำมันมะกอกร้อยละ 2.5 ปริมาตรโดยปริมาตรและใส่ Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตรโดยปริมาตรให้ผลดีที่สุด

5.1.4 ศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของ pH เริ่มต้นระดับต่างๆ ของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า ที่ pH เริ่มต้นอาหาร เท่ากับ 6.5 ให้ผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 19.52±0.05 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง และให้ผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่ำสุดที่ 16.21±0.19 กรัมต่อลิตร ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ปริศนา มังสา (2554) ได้ทำการศึกษาผลของภาวการณ์ผลิตที่มีน้ำหนักโมเลกุลของพลูลูแลนที่ผลิตจาก A. pullulans สายพันธุ์เขตร้อน โดยศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมคือ 6.0 6.5 และ 7.0 พบว่า ที่ระดับ pH เริ่มต้นอาหารเท่ากับ 6.5 สามารถผลิตพลูลูแลนได้สูงสุด 35.78±0.12 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเลี้ยง จากรายงานของ West และ Reed-Hamer (1993) ได้ศึกษาถึงผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพลูลูแลนจาก A. pullulans สายพันธุ์ ATCC 42023 พบว่า ระดับ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตพลูลูแลน คือ pH เริ่มต้นที่ 6.5 และการศึกษาการผลิตพูลลูแลนจาก A. pullulans สายพันธุ์ NRM2 ที่คัดแยกได้จากเขตร้อนของ Prasongsuk และคณะ (2007) พบว่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 สามารถผลิตพูลลูแลนได้มากที่สุด อย่างไรก็ตามจากการศึกษาอื่นๆ พบว่าผลของความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมมีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ที่ใช้ผลิต เช่น การศึกษาวิจัยของ Thirumavalavan และคณะ (2009) ที่พบว่า A. pullulans สายพันธุ์ MTCC 2195 ผลิตพูลลูแลนมากที่สุดเมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.0 จากรายงานของ Youssef และคณะ (1999) ที่ศึกษาผลความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตพูลลูแลน จาก A. pullulans สายพันธุ์ P-56 พบว่า ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.5 เหมาะสมกับการผลิตพูลลูแลนมากที่สุด และจากรายงาน พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก A. pullulans สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม โดยศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารสูตร PM พบว่า ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมที่สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด เมื่อความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.5 คือ 9.28±0.04 กรัมต่อลิตร

5.1.5 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจากอุณหภูมิจะมีผลต่อระยะเวลาของการเจริญเติบโต และผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ในการศึกษาอุณหภูมิต่างๆ ที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* NRRL 58543 พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ได้สูงที่สุด คือ 21.04±0.19 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเลี้ยง และผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ต่ำที่สุด คือ 19.04±0.22 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ก็จะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม โดยศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่างๆ พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 25 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ 14.72±0.03 กรัมต่อลิตร จากรายงานของ Ueda และคณะ (1963) ที่พบว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตพูลลูแลนสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการผลิตจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และ West และ Reed-Hamer (1993) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิในการผลิตพูลลูแลนที่อุณหภูมิ 23 – 33 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 24 – 26 องศาเซลเซียส

เมื่อประมวลผลจากภาวการณ์ที่ดีที่สุดทั้งหมด พบว่า *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ได้มากที่สุดในอาหารสูตร PM ที่มีการปรับองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนคือ เปลี่ยนจากเปปโตนมาเป็นโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ร่วมกับแหล่งคาร์บอน คือ ซูโครสความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ ความเข้มข้นของอาหารเสริม คือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่ pH ของอาหารเริ่มต้นเป็น 6.5 และเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ได้สูงสุดเป็น 21.04±0.19 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่ไม่ผ่านการปรับองค์ประกอบถึง 5.78 เท่า

5.2 วิเคราะห์สมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

จากการศึกษาโครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *A. pullulans* NRRL 58543 โดยการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *A. pullulans* NRRL 58543 มีรูปแบบของ FT-IR spectra เหมือนกันกับออบาซิแดน (aubasidan) ที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013 คือ ไม่พบหมู่ฟังก์ชันของ α-configuration แต่พบหมู่ฟังก์ชันที่เป็น β-configuration โดยจากการทดลองจะพบพีกที่ตำแหน่ง 890.58 และ 891.88 cm^{-1} ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yurlova และ De Hoog (1997) ที่พบว่า *A. pullulans* var. *aubasidani* สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดออบาซิแดน ซึ่งจะพบหมู่ฟังก์ชัน β-configuration ที่บริเวณความถี่ที่ 890 cm^{-1} และรายงานของ Leal-Serrano และคณะ (1980) ที่ระบุว่า β-configuration ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* จะมีความถี่ที่ 890 cm^{-1}

จากการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนสเปคโตรสโคปีชนิด ^{13}C และ ^{1}H ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เปรียบเทียบกับออบาซิแดน ที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013 พบว่า โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 มีพีก ^{1}H-NMR ที่แสดง β-1, 3 β-1,6 α-1, 4 และα-1, 6 configurations ซึ่งคล้ายกันกับโครงสร้างออบาซิแดน Reis และคณะ (2002); Manitchotpisit และคณะ (2009) ส่วนการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{13}C-NMR พบว่า โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 มีพีกขึ้นที่บริเวณ C-1 ของα-1, 4 C-1 ของα-1, 6 C-3 ของβ-1, 3 O-substituted C-6 และ C-6 คล้ายกันกับออบาซิแดน แต่โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 ไม่พบพีก C-4 และ C-1 ของ β-1,6 ในขณะที่พบพีกชนิดนี้ในโครงสร้างออบาซิแดน เมื่อทำการประมวลผลการวิเคราะห์โครงสร้างทั้งหมดสามารถกล่าวได้ว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 คือ บีตากลูแคนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับออบาซิแดน (aubasidan-like β-glucan) ซึ่งนักวิจัยให้ความสนใจสำหรับออบาซิแดนซึ่งเป็นสารพรีไบโอติกที่เพิ่มลงไปในส่วนของอาหารและเครื่องดื่มที่บริโภค ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม น้ำผลไม้ ผลิตภัณฑ์ธัญพืช หรืออาจจะเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่พร้อมใช้บริโภคโดยตรง เช่น กาแฟ เครื่องดื่ม เป็นต้น สุญาณี พงษ์ธนานิกร (2549)

5.3 การทดสอบสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

พอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติก เช่น บีตากลูแคน สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *S. cerevisiae*, *Bipolaris spicifera* and *Sporothrix schenckii* Odabasi และคณะ (2006) รวมไปถึง *A. pullulans* ก็มีรายงานว่าสามารถผลิตบีตากลูแคนได้เช่นกัน Finkelman และ Vardanis (1987) สารอาหารที่สามารถเป็นพรีไบโอติกที่ดีได้นั้น จะต้องไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น Fooks และคณะ (1999) และสามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษได้ รวมทั้งส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ดีในลำไส้ เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* Gibson (1995) โดยในการศึกษาทดลองนี้ได้เลือกจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacilus* ซึ่งได้แก่ *L. casei* และ *L. acidophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้และนำไปใช้ในใช้ในอุตสาหกรรมผลิตนมเปรี้ยว และโยเกิร์ต Sultana และคณะ (2000) และได้ทดลองนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543 มาทดสอบความเป็นพรีไบโอติกในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. ซึ่งจากการทดลองพบว่า เมื่อเติมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้นที่มากขึ้นการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เติมกลูโคส 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ได้ถึง 7.1 6.5 6.7 และ 5.3 เท่า ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เติมบีตากลูแคนเกรดการค้า (food-grade) พบว่าสามารถกระตุ้นการเติบโตของ *Lactobacillus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกัน แต่จากชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอนจะไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ได้ ดังนั้นแสดงว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ มีศักยภาพความเป็นพรีไบโอติกได้ดีเทียบเท่ากับบีต้ากลูแคนเกรดการค้า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม โดยศึกษาการทดสอบสมบัติของ NP-EPS ในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* พบว่า NP-EPS สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เติมกลูโคสได้ถึง 6.9 และ 5.1 เท่า ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Gardiner และคณะ (2002) พบว่า บีตากลูแคนที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* มีคุณสมบัติสามารถ

เป็นพรีไบโอติกได้ สามารถกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียแลกติกแอซิด *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ได้ และแบคทีเรียเหล่านี้ยังช่วยการป้องกันปัญหาต่างๆในระบบย่อยอาหาร ของมนุษย์ เช่น โรคกระเพาะ และอาการท้องผูกได้

5.4 การขึ้นรูปฟิล์มผสมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์มและศึกษาสมบัติฟิล์ม

การขึ้นรูปฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์ม สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในการทดลองครั้งนี้เพื่ออยากจะทราบว่าปริมาณของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในแผ่นฟิล์มที่ปริมาณสูงสุดเท่าไหร่ที่จะทำให้ฟิล์มสามารถขึ้นรูปและคงตัวเป็นแผ่นฟิล์มได้โดยไม่เปาะหรือแตกง่าย และฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จะมีลักษณะข้อดีคือ ฟิล์มจะมีลักษณะคงตัวและลอกออกมาเป็นแผ่นฟิล์มได้ ซึ่งแผ่นฟิล์มนี้ยังสามารถรับประทานได้เลยเพราะสามารถละลายได้ในปาก ส่วนข้อเสียฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ คือ จะเปาะและแตกง่าย

5.4.1 สมบัติการละลายในน้ำร้อน น้ำเย็น (solubility)

จากการศึกษาการทดสอบสมบัติการละลายน้ำร้อนน้ำเย็น (solubility) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเป็นการทดสอบคุณสมบัติในการละลายในน้ำของฟิล์มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยละลายในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ละลายในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นการละลายของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ก็จะเร็วขึ้นด้วย แต่ฟิล์มมีแนวโน้มเกิดการบวมตัวและสลายกลายเป็นเจลได้ช้าลงเมื่อเติมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ ความเข้มข้นสูงขึ้น และจะไม่สามารถละลายได้หมด จะพบเป็นตะกอนเล็กๆของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เหลืออยู่ เนื่องจากเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์บางส่วนไม่ละลายน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน และขึ้นรูปฟิล์มผสมของ NP-EPS ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน พบว่า ฟิล์มผสม NP-EPS มีแนวโน้มเกิดการบวมตัวและสลายกลายเป็นเจลได้ช้าลงเมื่อเติม NP-EPS ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น และจากรายงานของ Manners และคณะ (1973) รวมถึง Novák และคณะ (2012) ที่พบว่า บีตากลูแคนที่ผลิตจากยีสต์มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ โดยจากภาพรวมของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า คุณภาพของฟิล์มจะลดลงเมื่อเติมเอกโซพอลิ

แซ็กคาไรด์ลงไป แต่การปรับปรุงคุณสมบัติของฟิล์มโดยการเติมกลีเซอรอล เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นหรือลดความเปราะของแผ่นฟิล์ม Novák และคณะ (2012)

5.4.2 ทดสอบความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

การทดสอบค่าความเค้นหรือการทนต่อแรงดึง (tensile strength) และความยืดหยุ่น (elongation) ของฟิล์ม พบว่า ค่าความทนต่อแรงดึง และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 5 10 20 30 และ 50 โดยน้ำหนักอัลจิเนต มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในฟิล์มสูงขึ้น และเมื่อเพิ่มปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มีผลทำให้คุณสมบัติการยืดหยุ่นของฟิล์มลดน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล (2555) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม โดยศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มของ NP-EPS พบว่า ค่าความทนต่อแรงดึง และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของพูลลูแลนฟิล์มที่เติม NP-EPS ที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NP-EPS ในฟิล์มสูงขึ้น และจากการวิจัยของ Lazaridou และคณะ (2002) ได้ศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลต่อการขึ้นรูปฟิล์ม และทดสอบสมบัติความแข็งแรงต่อแรงดึง พบว่า น้ำหนักโมเลกุลมีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงต่อแรงดึง

5.4.3 ทดสอบสมบัติของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

จากการทดสอบสมบัติของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* โดยในการศึกษานี้ได้นำฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ มาทดสอบโดยใช้จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacilus* ซึ่งได้แก่ *L. casei* และ *L. acidophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้และนำไปใช้ในใช้ในอุตสาหกรรมผลิตนมเปรี้ยว และโยเกิร์ต Sultana และคณะ (2000) โดยเป็นการทดสอบความเป็นพรีไบโอติกของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543 ในการกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. จากการทดลอง พบว่าฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ที่ปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงขึ้น พบว่าการเติบโตของแบคทีเรียมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 30 และ 50 ของ

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ถึง 3.0 4.0 4.4 3.0 6.0 และ 6.6 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นแสดงว่าฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มีศักยภาพความเป็นพรีไบโอติกได้ดีเมื่ออยู่ในรูปของฟิล์ม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gardiner และคณะ (2002) ที่พบว่าบีตากลูแคนที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* มีคุณสมบัติสามารถเป็นพรีไบโอติกได้ สามารถกระตุ้นการเติบโตของแบคทีเรียแลกติกแอซิด *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ได้ และแบคทีเรียเหล่านี้ยังช่วยการป้องกันปัญหาต่างๆในระบบย่อยอาหาร ของมนุษย์ เช่น โรคกระเพาะ และอาการท้องผูกได้ ในปัจจุบันฟิล์มที่ขึ้นรูปจากสารทางชีวภาพเป็นทางเลือกใหม่ ที่นำมาใช้ประโยชน์เนื่องจากสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ กินได้โดยไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค พบในธรรมชาติหลายชนิด เช่น ไคติน Su และคณะ (1997) ไคโตซาน Howling และคณะ (2001) และ β (1-3),(1-6)-D-glucan Kofuji และคณะ (2010) จากรายงาน บีตากลูแคนที่ผนังเซลล์ของยีสต์ มีผลในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน Novak และ Vetvicka (2009) ความยืดหยุ่นของเนื้อเยื่อผิวหนัง และเพิ่มการสะสมของคอลลาเจน รักษาบาดแผล กระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจก์ Ovington (1998) ดังนั้นเพื่อให้สามารถนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543 ไปประยุกต์ใช้ได้ในทางอุตสาหกรรมทางด้านเภสัชกรรม เครื่องสำอาง ตัวอย่างทีมีการนำอัลจิเนตไปใช้ในทางเภสัชกรรมคือการเตรียมไมโครแคปซูลจากเกลือแคลเซียมอัลจิเนต ไมโครแคปซูลทีได้สามารถใช้ในการนำส่งยาโปรตีนและเปปไทด์ (เช่น อินซูลินและแคลซิโตนิน) โดยการรับประทานอัลจิเนตในรูปเกลือสามารถปกป้องยาโปรตีนจากการสลายตัว ในสภาวะกรดในกระเพาะอาหารได้ เนืองจากอัลจิเนตในรูปเกลือ ไม่ละลายในสภาวะกรด อีกทั้งยังสามารถควบคุมการปลดปล่อยยา ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ได้ George และ Abraham (2006)

นอกจากนี้อัลจิเนตยังสามารถใช้เป็นวัสดุในการรักษาแผล ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยแผ่นเจลทีได้จากอัลจิเนตสามารถ ช่วยดูดซับสารคัดหลั่งที่มาจากบาดแผล อีกทั้งยังช่วยลดการติดเชื้อ แบคทีเรียของแผลได้ มีรายงานการวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการใช้เกลือ อัลจิเนตของแคลเซียมและสังกะสีเป็นวัสดุห้ามเลือดในแผลลึก สามารถเพิมการแข็งตัวของเลือดได้มากกว่าวัสดุห้ามเลือดทีไม่มีอัลจิเนตGoh และคณะ (2012)

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

6.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* NRRL 58543 พบว่า สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้มากที่สุดในอาหารสูตร PM ที่มีการปรับองค์ประกอบต่างๆ คือ ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของซูโครสที่ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่ 0.06 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และอาหารเสริมคือน้ำมันมะกอกที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ปรับ pH ของอาหารเริ่มต้นเป็น 6.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน จะสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเป็น 21.04±0.19 กรัมต่อลิตร ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตร PM ที่ไม่ผ่านการปรับองค์ประกอบถึง 5.78 เท่า

6.2 วิเคราะห์สมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้

จากการวิเคราะห์โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเทคนิคอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) เปรียบเทียบกับออบาซิแดน พบว่าโครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 ไม่พบหมู่ฟังก์ชันของ α-configuration แต่พบหมู่ฟังก์ชันที่เป็น β-configuration เช่นเดียวกันกับออบาซิแดน (aubasidan) ที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013 โดยจะมีพีกที่ตำแหน่ง 890.58 และ 891.88 cm^{-1} ตามลำดับ

จากการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนสเปคโตรสโคปีชนิด ^{13}C และ ^{1}H ของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ เทียบกับออบาซิแดน ที่ผลิตจาก *A. pullulans* var. *aubasidani* NRRL 58013 พบว่า โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 มีพีก ^{1}H-NMR ที่แสดง β-1, 3 β -1, 6 α-1, 4 และ α-1, 6 configurations ซึ่งคล้ายกันกับโครงสร้างออบาซิแดน ส่วนการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค ^{13}C-NMR พบว่า

โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 มีพีกขึ้นที่บริเวณ C-1 ของ α-1, 4 C-1 ของ α-1,6 C-3 ของ β-1,3 O-substituted C-6 และ C-6 ซึ่งคล้ายกันกับออบาซิแดน เมื่อทำการประมวลผลการวิเคราะห์โครงสร้างทั้งหมดสามารถกล่าวได้ว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 คือ บีต้ากลูแคนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับออบาซิแดน (aubasidan-like β-glucan)

6.3 การทดสอบสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

จากการศึกษาสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมกลูโคส และชุดควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน

6.4 การขึ้นรูปฟิล์มผสมเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีอัลจิเนตเป็นสารก่อฟิล์มและศึกษาสมบัติฟิล์ม

6.4.1 การเตรียมฟิล์ม

จากการศึกษาการเตรียมฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถขึ้นเป็นแผ่นฟิล์มได้ จะเปราะและแตกง่าย และมีสีที่เข้มขึ้นที่เข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่เพิ่มขึ้น

6.4.2 สมบัติการละลายในน้ำร้อน น้ำเย็น (solubility)

จากการทดสอบสมบัติการละลายในน้ำร้อน น้ำเย็น (solubility) ของฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นการละลายของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ก็จะเร็วขึ้นด้วย และที่ปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่เพิ่มขึ้นฟิล์มจะเกิดการบวมตัวและสลายกลายเป็นเจลได้ช้าลง และจะพบตะกอนของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เหลืออยู่ในน้ำเนื่องจากเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์บางส่วนไม่ละลายน้ำ

6.4.3 ความแข็งแรงต่อแรงดึง (tensile properties) ของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

ค่าความทนต่อแรงดึง และเปอร์เซ็นต์การยืดตัวของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 5 10 20 30 และ 50 โดยน้ำหนักอัลจิเนต จะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในฟิล์มสูงขึ้น

6.4.4 ทดสอบสมบัติของฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในการกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei*

พบว่าฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 20 30 และ 50 ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* NRRL 58543 สามารถกระตุ้นการเติบโตของ *L. acidophilus* และ *L. casei* ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมฟิล์มเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษานี้พบว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้นั้นจะมีสีดำเข้ม และมีบางส่วนไม่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงควรหาวิธีที่สามารถแยกสีดำออกจากเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ รวมทั้งทำการศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการละลายเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้

สำหรับแนวทางการนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ฟิล์มที่น่าสนใจด้วยการนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์ฟิล์มพรีไบโอติกชนิดรับประทานได้ที่สะดวกและง่ายต่อการรับประทานโดยต้องมีการคำนวณปริมาณฟิล์มพรีไบโอติกให้เหมาะสมกับการรับประทานต่อครั้งจะทำให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์ฟิล์มรับประทานชนิดใหม่ที่น่าสนใจรูปแบบหนึ่ง และในการขึ้นรูปฟิล์มอาจจะนำฟิล์มไปประยุกต์ใช้ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีได้ เช่น ไมโครแคปซูลยา ผสมในเครื่องดื่มกาแฟ หรือผลิตภัณฑ์นมผงต่างๆ เป็นต้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ปริศนา มังสา. 2554. ผลของภาวะการผลิตที่มีต่อน้ำหนักโมเลกุลของพูลลูแลนที่ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อน วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล. 2547. เบต้ากลูแคนสารมหัศจรรย์จากธรรมชาติ. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 19: 47-49.

พันธกานต์ อุณหภัทรฐิติกุล. 2555. การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์เขตร้อนและการขึ้นรูปฟิล์ม วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุญาณี พงษ์ธนานิกร. 2549. พรีไบโอติกและโพรไบโอติก : อาหารสุขภาพ. ภาควิชาอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

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

Bengmark, S. 2005. Bioecologic control of the gastrointestinal tract: the role of flora and supplemented probiotics and synbiotics. *Gastroenterology Clinics of North America* 34(3): 413-436.

Brown, R. G., L. A. Hanic and M. Hsiao. 1973. Structure and chemical composition of yeast chlamydospores of *Aureobasidium pullulans*. *Canadian journal of microbiology* 19(2): 163-168.

Burkus, Z. and F. Temelli. 2000. Stabilization of emulsions and foams using barley β-glucan. *Food Research International* 33(1): 27-33.

Chi, Z., F. Wang, Z. Chi, L. Yue, G. Liu and T. Zhang. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied microbiology and biotechnology* 82(5): 793-804.

Collins, M. D. and G. R. Gibson. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition* 69(5): 1052s-1057s.

Cooke, W. B. 1959. An ecological life history of *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arnaud. *Mycopathologia et Mycologia applicata* 12(1): 1-45.

De Hoog, G. and N. Yurlova. 1994. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and Hormonema. *Antonie van Leeuwenhoek* 65(1): 41-54.

De Hoog, G., P. Zalar, C. Urzi, F. De Leo, N. Yurlova and K. Sterflinger. 1999. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8 S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology*: 31-37.

Dennis, C. and R. Buhagiar. 1973. Comparative study of *Aureobasidium pullulans*, A. prunorum sp. nov. and Trichosporon pullulans. *Transactions of the British Mycological Society* 60(3): 567-IN512.

Deshpande, M. S., V. B. Rale and J. M. Lynch. 1992. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report. *Enzyme and Microbial Technology* 14(7): 514-527.

Domsch, K., W. Gams and T. Anderson. 1993. Key to the genera, Compendium of Soil Fungi. *IHW, Eching, Germany*.

Elinov, N., N. Glazova, S. Kravchenko, T. Potekhina and N. Siluyanova. 1987. Method of producing aubasidan. *USSR Patent* 1.

Fincher, G. and B. Stone. 1986. Cell walls and their components in cereal grain technology. *Advances in cereal science and technology (USA)*.

Finkelman, M. and A. Vardanis. 1987. Glycogen metabolism in *Aureobasidium pullulans:* a glycogen synthetase with unusual activation properties. *Critical reviews in biotechnology* 5(3): 185-193.

Fooks, L. J., R. Fuller and G. R. Gibson. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International dairy journal* 9(1): 53-61.

Fuller, R. 1993. Probiotic foods. Current use and future developments. *Int. Food Ingred* 3: 23-26.

Gardiner, G. E., P. Bouchier, E. O'Sullivan, J. Kelly, J. K. Collins, G. Fitzgerald, R. P. Ross and C. Stanton. 2002. A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal* 12(9): 749-756.

George, M. and T. E. Abraham. 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *Journal of controlled release* 114(1): 1-14.

Ghadge, S. V. and H. Raheman. 2006. Process optimization for biodiesel production from mahua (Madhuca indica) oil using response surface methodology. *Bioresource technology* 97(3): 379-384.

Gibson, G. R. a. R., M. B. . 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota : introduction the concept of prebiotic. *Nutrient* 125: 1401-1402.

Goh, A. C., I. S. Gill, D. J. Lee, A. L. de Castro Abreu, A. S. Fairey, S. Leslie, A. K. Berger, S. Daneshmand, R. Sotelo and K. S. Gill. 2012. Robotic intracorporeal orthotopic ileal neobladder: replicating open surgical principles. *European urology* 62(5): 891-901.

Gupta, P., S. Rustgi, S. Sharma, R. Singh, N. Kumar and H. Balyan. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 270(4): 315-323.

Hassan-Montero, Y. and V. Herrero-Solana (2006). Improving tag-clouds as visual information retrieval interfaces. International Conference on Multidisciplinary Information Sciences and Technologies, Citeseer.

Hermanides-Nijhof, E. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. *Stud. Mycol* 15: 141-177.

Hofer, M. A. 1996. Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* 21(2): 203-217.

Howling, G. I., P. W. Dettmar, P. A. Goddard, F. C. Hampson, M. Dornish and E. J. Wood. 2001. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials* 22(22): 2959-2966.

Jeong, G.-T., H.-S. Yang and D.-H. Park. 2009. Optimization of transesterification of animal fat ester using response surface methodology. *Bioresource Technology* 100(1): 25-30.

Kachouri, F. and M. Hamdi. 2004. Enhancement of polyphenols in olive oil by contact with fermented olive mill wastewater by Lactobacillus plantarum. *Process biochemistry* 39(7): 841-845.

Kapteyn, J. C., R. C. Montijin, E. Vink, J. de la Cruz, A. Llobell, J. E. Douwes, H. Shimoi, P. N. Lipke and F. M. Klis. 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked β-1, 3-/β-l, 6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* 6(3): 337-345.

Kikuchi, Y., R. Taguchi, Y. Sakano and T. Kobayashi. 1973. Comparison of extracellular polysaccharide produced by Pullularia pullulans with polysaccharides in the cells and cell wall. *Agricultural and Biological Chemistry* 37(7): 1751-1753.

Kofuji, K., Y. Huang, K. Tsubaki, F. Kokido, K. Nishikawa, T. Isobe and Y. Murata. 2010. Preparation and evaluation of a novel wound dressing sheet comprised of β-glucan–chitosan complex. *Reactive and Functional Polymers* 70(10): 784-789.

Kontula, P., J. Jaskari, L. Nollet, I. De Smet, A. Von Wright, K. Poutanen and T. Mattila-Sandholm. 1998. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: effects on the gastrointestinal microbiota. *Applied microbiology and biotechnology* 50(2): 246-252.

Lazaridou, A., T. Roukas, C. Biliaderis and H. Vaikousi. 2002. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a

Chulalongkorn University

stirred tank reactor under varying agitation. *Enzyme and Microbial Technology* 31(1): 122-132.

Leal-Serrano, G., P. Ruperez and J. Leal. 1980. Acidic polysaccharide from *Aureobasidium pullulans*. *Transactions of the British Mycological Society* 75(1): 57-62.

Leathers, T., G. Nofsinger, C. Kurtzman and R. Bothast. 1988. Pullulan production by color variant strains of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of industrial microbiology* 3(4): 231-239.

Leathers, T. D. 2002. Pullulan. *Biopolymers* 6: 1-35.

Li, N. a., A. Batzer, R. Daly, V. Yajnik, E. Skolnik, P. Chardin, D. Bar-Sagi, B. Margolis and J. Schlessinger. 1993. Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 363(6424): 85-88.

Lin, T. and P. Kolattukudy. 1978. Induction of a biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in Fusarium solani f. sp. pisi. *Journal of bacteriology* 133(2): 942-951.

Lotrakul, P., P. Deenarn, S. Prasongsuk and H. Punnapayak. 2009. Isolation of *Aureobasidium pullulans* from bathroom surfaces and their antifungal activity against some Aspergilli. *African Journal of Microbiology Research* 3(5): 253-257.

Lotrakul, P., P. Unhapattaratitikul, T. Seelanan, S. Prasongsuk and H. Punnapayak. 2013. An aubasidan-like β-glucan produced by *Aureobasidium pullulans* in Thailand. *SCIENCEASIA* 39(4): 363-368.

Manitchotpisit, P., T. D. Leathers, S. W. Peterson, C. P. Kurtzman, X.-L. Li, D. E. Eveleigh, P. Lotrakul, S. Prasongsuk, C. A. Dunlap and K. E. Vermillion. 2009. Multilocus phylogenetic analyses, pullulan production and xylanase activity of tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *mycological research* 113(10): 1107-1120.

Chulalongkorn University

Manners, D. J., A. J. Masson and J. C. Patterson. 1973. The structure of a beta-(1-> 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem. J* 135: 19-30.

Mitsou, E. K., N. Panopoulou, K. Turunen, V. Spiliotis and A. Kyriacou. 2010. Prebiotic potential of barley derived β-glucan at low intake levels: a randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study. *Food research international* 43(4): 1086-1092.

Novák, M., A. Synytsya, O. Gedeon, P. Slepička, V. Procházka, A. Synytsya, J. Blahovec, A. Hejlová and J. Čopíková. 2012. Yeast β (1-3),(1-6)-d-glucan films: Preparation and characterization of some structural and physical properties. *Carbohydrate Polymers* 87(4): 2496-2504.

Novak, M. and V. Vetvicka. 2009. Glucans as biological response modifiers. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)* 9(1): 67-75.

Odabasi, Z., V. L. Paetznick, J. R. Rodriguez, E. Chen, M. R. McGinnis and L. Ostrosky-Zeichner. 2006. Differences in beta-glucan levels in culture supernatants of a variety of fungi. *Medical Mycology* 44(3): 267-272.

Ovington, L. 1998. Macrophage manipulation for improved wound healing. *Wound Care newsletter* 93.

Penner, R., R. N. Fedorak and K. L. Madsen. 2005. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. *Current opinion in pharmacology* 5(6): 596-603.

Prasongsuk, S., M. A. Berhow, C. A. Dunlap, D. Weisleder, T. D. Leathers, D. E. Eveleigh and H. Punnapayak. 2007. Pullulan production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans. Journal of industrial microbiology & biotechnology* 34(1): 55-61.

Prasongsuk, S., R. Sullivan, M. Kuhirun, D. Eveleigh and H. Punnapayak. 2005. Thailand habitats as sources of pullulan-producing strains of *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21(4): 393-398.

Ptitchkina, N., L. Novokreschonova and A. Ishin (1993). Rheological Properties of Aqueous Solutions of *Aubasidan*. Food Hydrocolloids, Springer**:** 193-196.

Punnapayak, H., M. Sudhadham, S. Prasongsuk and S. Pichayangkura (2003). Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.

Ramos, S. and I. G. Acha. 1975. A vegetative cycle of Pullularia pullulans. *Transactions of the British Mycological Society* 64(1): 129-IN129.

Reese, E. T. and A. Maguire. 1971. *Aureobasidium pullulans* as a source of sucrase. *Canadian journal of microbiology* 17(3): 329-332.

Reis, R. A., C. A. Tischer, P. A. Gorin and M. Iacomini. 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): 1-5.

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

Ruiz-Herrera, J. 1991. Biosynthesis of β-glucans in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* 60(2): 73-81.

Rycroft, C., M. Jones, G. Gibson and R. Rastall. 2001. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* 91(5): 878-887.

Schuster, R., E. Wenzig and A. Mersmann. 1993. Production of the fungal exopolysaccharide pullulan by batch-wise and continuous fermentation. *Applied microbiology and biotechnology* 39(2): 155-158.

Shin, H., S. Baig, S. Lee, D. Suh, S. Kwon, Y. Lim and J. Lee. 2004. Production of fructo-oligosaccharides from molasses by *Aureobasidium pullulans* cells. *Bioresource technology* 93(1): 59-62.

Shingel, K. I. 2004. Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. *Carbohydrate Research* 339(3): 447-460.

Silva, J. and A. Smith. 2008. Capturing pluripotency. *Cell* 132(4): 532-536.

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

Snart, J., R. Bibiloni, T. Grayson, C. Lay, H. Zhang, G. E. Allison, J. K. Laverdiere, F. Temelli, T. Vasanthan and R. Bell. 2006. Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum. *Applied and environmental microbiology* 72(3): 1925-1931.

Standard, A. 1991. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. *American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, Ed*: 194-202.

Su, C.-H., C.-S. Sun, S.-W. Juan, C.-H. Hu, W.-T. Ke and M.-T. Sheu. 1997. Fungal mycelia as the source of chitin and polysaccharides and their applications as skin substitutes. *Biomaterials* 18(17): 1169-1174.

Sultana, K., G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris and K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International journal of food microbiology* 62(1): 47-55.

Tada, R., A. Tanioka, H. Iwasawa, K. Hatashima, Y. Shoji, K.-i. Ishibashi, Y. Adachi, M. Yamazaki, K. Tsubaki and N. Ohno. 2008. Structural characterisation and biological activities of a unique type β-D-glucan obtained from *Aureobasidium pullulans. Glycoconjugate journal* 25(9): 851-861.

Takeo, K. and G. De Hoog. 1991. Karyology and hyphal characters as taxonomic criteria in ascomycetous black yeasts and related fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 60(1): 35-42.

Teramoto, N. and M. Shibata. 2006. Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. *Carbohydrate polymers* 63(4): 476-481.

Thambugala, K. M., H. A. Ariyawansa, Y.-M. Li, S. Boonmee, S. Hongsanan, Q. Tian, C. Singtripop, D. J. Bhat, E. Camporesi and R. Jayawardena. 2014. Dothideales. *Fungal Diversity* 68(1): 105-158.

Thirumavalavan, K., T. Manikkadan and R. Dhanasekar. 2009. Pullulan production from coconut by-products by *Aureobasidium pullulans. African journal of biotechnology* 8(2).

Ueda, S., K. Fujita, K. Komatsu and Z.-i. Nakashima. 1963. Polysaccharide produced by the genus Pullularia I. Production of polysaccharide by growing cells. *Applied microbiology* 11(3): 211-215.

Volman, J. J., J. D. Ramakers and J. Plat. 2008. Dietary modulation of immune function by β-glucans. *Physiology & behavior* 94(2): 276-284.

West, T. P. and B. Reed-Hamer. 1993. Polysaccharide production by a reduced pigmentation mutant of the fungus *Aureobasidium pullulans*. *FEMS microbiology letters* 113(3): 345-349.

Wickerham, L. and C. Kurtzman. 1975. Synergistic color variants of *Aureobasidium pullulans. Mycologia*: 342-361.

Williams, D. L., A. Mueller and W. Browder. 1996. Glucan-based macrophage stimulators. *Clinical Immunotherapeutics* 5(5): 392-399.

Youssef, F., T. Roukas and C. Biliaderis. 1999. Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobasidium pullulans* using batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry* 34(4): 355-366.

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

Yurlova, N., G. De Hoog and A. Van den Ende. 1999. Taxonomy of *Aureobasidizum* and allied genera. *Studies in Mycology*: 63-69.

Yurlova, N., I. Mokrousov and G. De Hoog. 1995. Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans. Antonie van leeuwenhoek* 68(1): 57-63.

Zalar, P., C. Gostinčar, G. De Hoog, V. Uršič, M. Sudhadham and N. Gunde-Cimerman. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology* 61: 21-38.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. สูตรอาหาร Yeast Malt Agar (YMA)

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
วุ้น	15	กรัม

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามอัตราส่วนยกเว้นวุ้นในน้ำกลั่น แล้วตามด้วยการเติมวุ้น แล้วนำไปอุ่นให้ร้อนจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. สูตรอาหาร Yeast malt broth (YMB)

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

Yeast extract	5	กรัม
Malt extract	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามอัตราส่วนในน้ำกลั่น เช่นเดียวกับการเตรียมอาหารสูตร YMA แต่ไม่ต้องเติมวุ้น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

3. Production medium

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

ซูโครส	5	กรัม
เปปโตน	0.06	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	กรัม
NaCl	0.2	กรัม
ยีสต์สกัด	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามอัตราส่วน ในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 95 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

4. MRS broth/ agar

องค์ประกอบของสูตรอาหาร

เปปโตน	10	กรัม
บีฟสกัด	10	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
K_2HPO_4	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Tri-ammonium citrate	2	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.02	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดตามอัตราส่วนในน้ำกลั่น หากต้องการเตรียม MRS agar ให้เติม agar น้ำหนัก 15 g แล้วนำไปอุ่นให้ร้อนจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

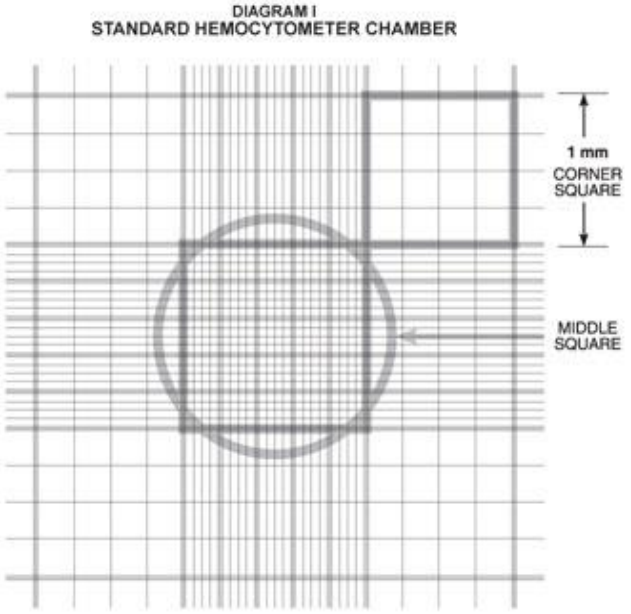
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

1.การนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี Direct Microscopic โดยใช้ Heamacytometer

Haemacytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับนับเม็ดเลือด แต่ปัจจุบันนำมาประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนเซลล์จุลินทรีย์หรือนับสปอร์ของราซึ่ง Haemacytometer เป็นสไลด์ที่มีการแบ่งช่องไว้เป็นตาราง เมื่อปิดทับด้วย cover glass ใช้เฉพาะสำหรับอุปกรณ์จะทำให้มีความลึกระหว่างตัวสไลด์กับ cover glass ทำให้บรรจุของเหลวตัวอย่างที่ต้องการนับจำนวนไว้ได้ดี ขีดจะแบ่งออกเป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัส 25 ช่องใหญ่ แต่ละช่องมีขนาด 0.2 x 0.2 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งภายในแต่ละช่องจะแบ่งย่อยออกเป็น 16 ช่องเล็ก แต่ละช่องจะมีขนาด 0.05 x 0.05 ตารางมิลลิเมตร

ภาพแสดง Haemacytometer เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภายใน ○ ประกอบด้วย 25 ช่องใหญ่ และภายในช่องใหญ่แต่ละช่องจะประกอบไปด้วย 16 ช่องเล็ก (ที่มา: http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html

วิธีการคำนวณ

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก) = 0.1 mm^3

สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องใหญ่ = A เซลล์

สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ใน 1 ช่องเล็ก = B เซลล์

นั่นคือ A = 16B เซลล์

เพราะฉะนั้น

ใน 0.1 mm^3 มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด Ax25 หรือ Bx16x25 เซลล์

ใน 1.0 mm^3 มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด Ax25x10 หรือ Bx16x25x10 เซลล์

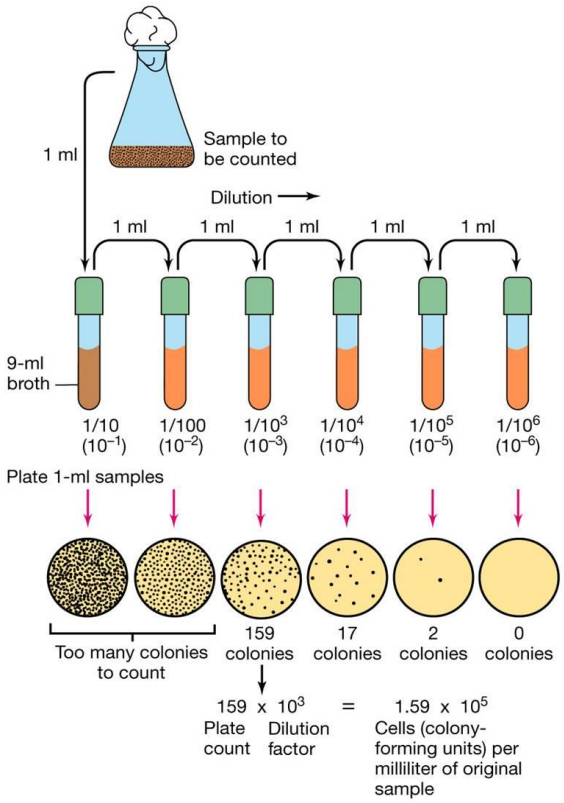
ใน 1.0 cm^3 มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด Ax25x10x1000 หรือ Bx16x25x10x1000 เซลล์

= $25A \times 10^4$ หรือ $4Bx10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะบนจานอาหาร colony forming unit (CFU)

ทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นโดยทำเป็นลำดับ ลำดับละ 10 เท่า (serial dilution) แล้วหยดเชื้อจุลินทรีย์ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแข็งตัวแล้ว (solidified agar medium) บ่มเชื้อทิ้งไว้ในสภาวะไร้ออกซิเจน 2 วันแล้วทำการนับเซลล์เพื่อคำนวณให้เป็นหน่วย CFU โดยนำค่าเฉลี่ยของโคโลนีที่นับได้มาคูณกับ dilution



รูปที่ 17 วิธีการเจือจางเชื้อเริ่มต้น (serial dilution)

(ที่มา : http://www.agro.kmutnb.ac.th/e-learning/521302/1.php)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ปุณชรัชต์ ปิลอง เกิดเมื่อวันที่ 26 สิงหาคม พ.ศ. 2531 ที่จังหวัดนครพนม สำเร็จปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2554 จากนั้นได้ศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2557

ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขณะศึกษาผลงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากโครงการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2557 สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (WCU-038-EN-57)

การเสนอผลงาน

Pilong, P., Prasongsuk, S., Siraleartmukul, K., Lotrakul P. and Punnapayak, H. 2014. First Report of Production of exopolysaccharide from Aureobasidium pullulans NRRL 58543 for its prebiotic film property. The Joint Bilateral Seminar: Institut Teknologi sepuluh Nopember Surabaya, Indonesia. June 24-26, 2014.

Pilong, P., Prasongsuk, S., Siraleartmukul, K., Lotrakul P. and Punnapayak, H. 2014. Production of β-glucan From Aureobasidium pullulans NRRL 58543. The 8th Korea-ASEAN Joint Symposium 2014: Biomass Utilization and Renewable Energy: Korea University Seoul, Republic of Korea. August 18-22, 2014.

Pilong, P., Prasongsuk, S., Siraleartmukul, K., Lotrakul P. and Punnapayak, H. 2014. Optimaization for β-glucan Production from Aureobasidium pullulans NRRL 58543. The 26 TH Annual Meeting of The Thai Society for Biotechnology and International Conference : Mae fah Luang University Chiang Rai, Thailand. November 26 -29, 2014.