บทที่ 1
บทนำ

การเผชิญหน้ากับปัญหาสิ่งแวดล้อมในปัจจุบันเป็นปัญหาใหญ่ระดับชาติที่ต้องรับผิดชอบร่วมกันหลายฝ่าย ปัญหาสิ่งแวดล้อม และมลพิษไม่ว่าจะเกิดจากอากาศ น้ำ ปัญหาการกำจัดของเสีย หรือ ของเหลือใช้ล้วนแล้วแต่เป็นปัญหาที่สำคัญที่ต้องเร่งป้องกัน และดำเนินการแก้ไข พลาสติกที่ใช้กันอยู่ทุกวันนี้ผลิตได้จากปิโตรเลียมซึ่งเป็นทรัพยากรทางธรรมชาติที่ถือกันว่าไม่สามารถสร้างชดเชยขึ้นมาใหม่ได้เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาอันยาวนานมากจึงจะเกิดขึ้น นอกจากนั้นการกำจัดพลาสติกด้วยวิธีการเผายังเกิดปัญหามลพิษทางอากาศตามมา และส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์วิทยาเป็นอย่างมาก นอกจากพลาสติกแล้วในปัจจุบันยังมีการนำเอาโฟมมาใช้ประโยชน์กันมากขึ้นด้วย และไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยกระบวนการทางธรรมชาติ และยังมีสารพวกคลอโรฟลูโอโรคาร์บอน (chlorofluorocarbon) เป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นสาเหตุในการทำลายชั้นโอโซนในบรรยากาศให้ลดลงอย่างรวดเร็ว (จันทรา และเบญจลักษณ์, 2537 ; Yuen, 1974) ดังนั้นการนำพลาสติกมาแปรรูป และนำกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่โดยผ่านกระบวนการที่เหมาะสม (recycling) จึงเป็นแนวทางที่มีการส่งเสริมอยู่ในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามการนำพลาสติกกลับมาใช้ประโยชน์ใหม่ก็ยังไม่สามารถกำจัดพลาสติกให้หมดไปได้ จากปัญหาดังกล่าวนี้จึงทำให้มีการศึกษาเพื่อค้นหาวัสดุ เช่น พอลิเมอร์ (polymer) ที่มีคุณสมบัติเหมือน หรือ ใกล้เคียงพลาสติกแต่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติมาทดแทน โดยพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้นี้สามารถเตรียมได้จาก พอลิเมอร์ทางชีวภาพ (biopolymer) พอลิเมอร์สังเคราะห์ (synthetic polymer) หรือ การผสมระหว่างพอลิเมอร์ทางชีวภาพกับพอลิเมอร์สังเคราะห์ ซึ่งพอลิเมอร์ดังกล่าวนี้สามารถผุกร่อนตามธรรมชาติ สลายตัวด้วยแสงอาทิตย์ หรือ แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ความร้อน สารเคมี หรือ การทำปฏิกิริยากับออกซิเจน รวมถึงการย่อยสลายที่เกิดขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์ เป็นต้น (งานสารสนเทศศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, 2540 ; Seviour and Kristiansen, 1983)

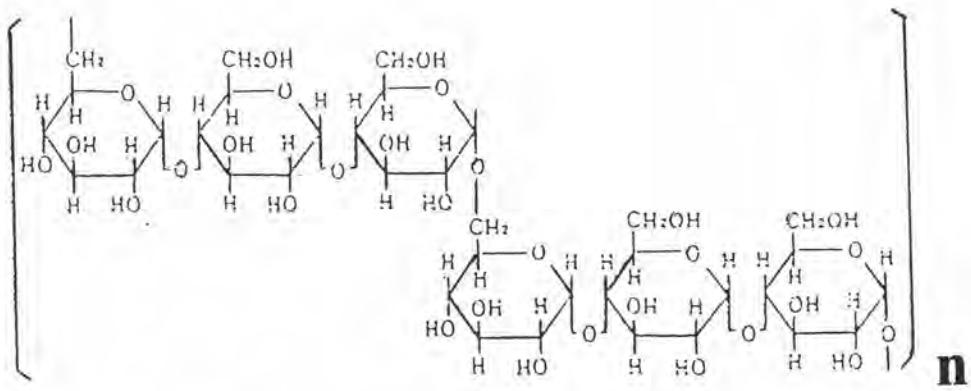
ในธรรมชาติมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น รา แบคทีเรีย และยีสต์ มีความสามารถในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ชีวภาพได้ เช่น เด็กซ์แทรน (dextran) ผลิตได้จาก *Leuconostoc mesenteroides* และ *L. dextranicum* แซนแทนกัม (xanthan gum) ผลิตได้จาก *Xanthomonas campestris* อาร์ทรอแบคเทอร์พอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *Arthrobacter viscosus* และ *Azotobacter vinelandii* ซัคซิโนกลูแคน (succinoglucan) ผลิตได้จาก *Alcaligenes faecalis* และ พูลลูแลน (pullulan) ผลิตได้จาก *Aureobasidium pullulans* (Bernier, 1958 ; Slodki and Cadmus, 1978) โดยเฉพาะพูลลูแลนนั้นมีคุณสมบัติคล้าย

พลาสติกที่สังเคราะห์ขึ้นทางเคมี สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง และที่สำคัญคือ สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติจึงเป็นที่ต้องการอย่างยิ่งต่อวงการอุตสาหกรรมต่างๆ ทั่วโลก

A. pullulans เป็นราชนิดหนึ่งที่จัดอยู่ในกลุ่ม Deuteromycetes (Lacroixt *et al.*, 1985) ชื่อเดิมคือ *Pullularia pullulans* และมีชื่อสามัญว่า ยีสต์สีดำ (black yeast) ทั้งนี้เนื่องจากการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) ในระหว่างการเจริญเติบโต อาจเป็นเม็ดสีเขียว (green pigment) (Wecker and Onken, 1991) เม็ดสีดำ (black pigment) (Wickerham and Kuetzman, 1975) และในบางครั้งอาจสร้างเม็ดสีเหลือง (yellow pigment) ก่อนที่จะเปลี่ยนไปเป็นเม็ดสีเขียวแกมดำเมื่อมีอายุเพิ่มขึ้น (Imshenetskii and Kondrat' eva and Smut'ko, 1981) การเกิดขึ้นของเม็ดสีเมลานินนี้นับว่าเป็นปัญหาอย่างหนึ่งใน อุตสาหกรรมการผลิต โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการผลิตเพื่อให้ได้พูลลูแลนที่เป็นสีขาว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการกำจัดเม็ดสีเมลานินออกจากพูลลูแลน หรือ หาสายพันธุ์ที่ปลอดเม็ดสีเมลานินมาใช้ในการผลิตพูลลูแลน (Pollock, 1992)

ลักษณะรูปร่างของเซลล์ *A. pullulans* มีได้หลายรูปร่าง (polymorphic) ประกอบด้วย บลาสโตสปอร์ (blastospore) เซลล์ที่มีรูปร่างพอง (swollen cell) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เส้นใย (hyphae) และเส้นใยเทียม (pseudohyphae) (Andrews *et al.*, 1994 ; Aure and Seviour, 1990) ซึ่งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมนับว่ามีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบต่างๆ อย่างมาก

การดำรงชีวิตของ *A. pullulans* ในธรรมชาติมีทั้งแบบที่เจริญอยู่บนพืชที่ตายแล้ว (saprophyte) และแบบที่เจริญบนผิวใบไม้ (epiphyte) (Pollock, 1992) ในขณะที่เชื้อราเจริญเติบโตจะสังเคราะห์พอลิแซคคาไรด์ และขับออกมาภายนอกเซลล์ (exopolysaccharide) (Silman, Bryan and Leathers, 1990 ; West and Hamer, 1995) Bender และคณะ (1959) ได้ตั้งชื่อว่า พูลลูแลน ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีความเป็นกลางของประจุไฟฟ้า (Bulmer, Catley and Kelly, 1987 ; Boa and LeDuy, 1987 ; Catley, 1971 a ; Seviour and Kristiansen, 1983 ; Sowa, Blackwood and Adams, 1963) ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตไตรโอส (maltotriose) หลายหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,6 จนกลายเป็นพอลิเมอร์ (Boa and Leduy, 1987 ; Catley, 1973 ; Leathers *et al.*, 1988; Lee and Yoo, 1993; LeDuy and Boa, 1983; McNeil and Kristiansen, 1990; Ono, Yasuda and Ueda, 1977; Silman *et al.*, 1990; Yamasaki *et al.*, 1993) ดังรูปที่ 1 บางครั้งอาจมีพันธะอื่นประกอบอยู่ด้วยบ้างอาทิเช่น พันธะ α-1,4 และ α-1,3 (Silman *et al.*, 1990 ; Lacroixt *et al.*, 1985 ; Boa and LeDuy, 1987 ; Boa and LeDuy, 1984) หรืออาจมีน้ำตาลมอลโตเตตระโอส (moltotetraose) เชื่อมต่ออยู่ในโครงสร้างด้วย (Aure and Seviour, 1990 ; Catley ,

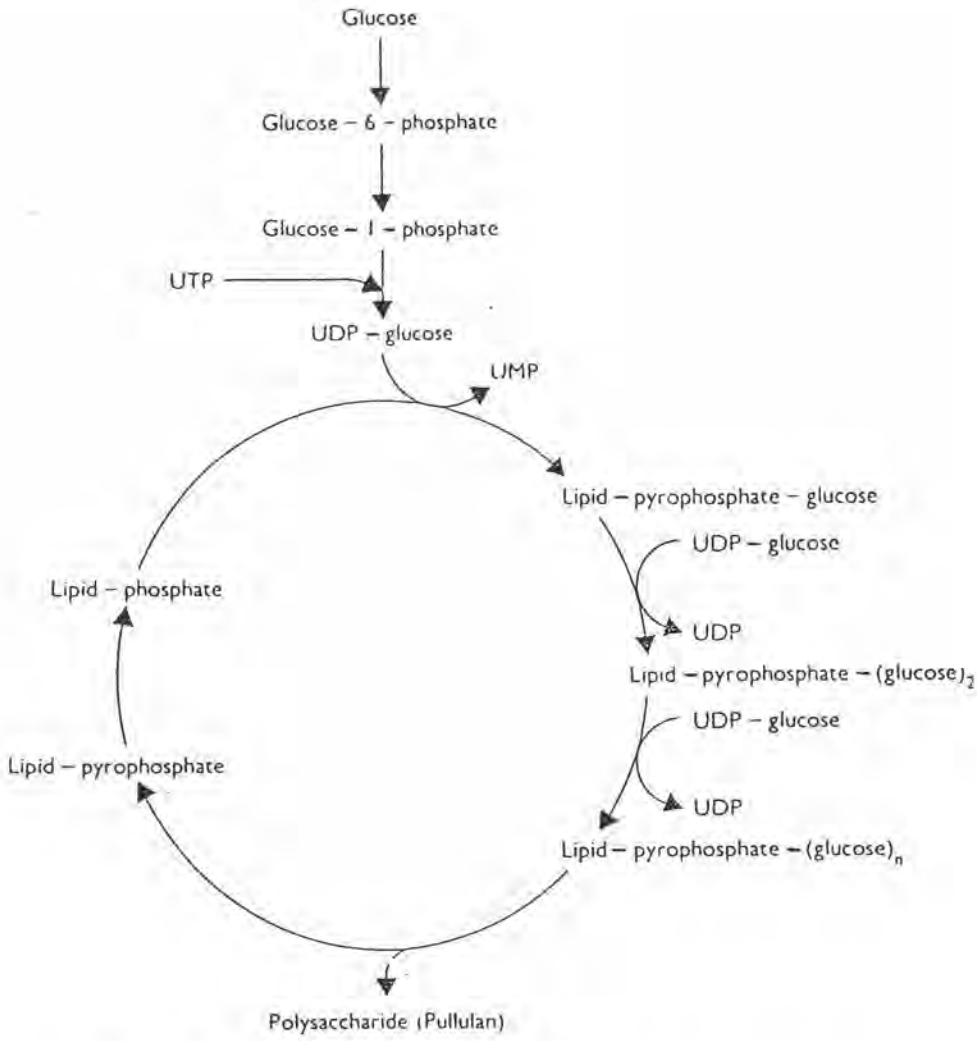


รูปที่ 1 โครงสร้างพูลลูแลน (Tsujisaka and Mitsuhashi, 1988)

1971 b ; Finkelman and Vardanis, 1982 ; Gibbs and Seveviour, 1992) ความแตกต่างกันทางโครงสร้างทางเคมีของพอลิแซคคาไรด์ และอัตราการผลิตมีมาก หรือ น้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ และแหล่งอาหารที่ใช้ในการผลิต (Boa and LeDuy, 1984 ; Lacroixt *et al.*, 1985 ; Schuster, Wenzig and Mersmann, 1993)

กลไกการสังเคราะห์พูลลูแลนในระดับเซลล์ของ *A. pullulans* เกิดขึ้นจาก UDP-glucose เป็นตัวชักนำให้เกิดพูลลูแลนโดยตรงจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชั่น (polymerization) จนนำไปสู่การเกิดพูลลูแลน จากนั้นจะส่งพอลิเมอร์ที่เกิดขึ้นผ่านผนังเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ การเคลื่อนย้าย UDP-glucose สู่โมเลกุลพาหะ (carrier molecule) จะอยู่ในรูปไฮโดรโฟบิคโมเลกุล (hydrophobic molecule) ซึ่งทำให้ง่ายต่อการเคลื่อนย้ายพูลลูแลนออกสู่ผนังเซลล์ (Berry, 1988) ดังรูปที่ 2

โมเลกุลพอลิเมอร์ของพูลลูแลนส่วนใหญ่มีขนาดอยู่ในช่วง 50,000 ถึง 3,000,000 DP (degree of polymerization) มีรายงานว่าในประเทศญี่ปุ่นมีการผลิตพูลลูแลนจากเชื้อรา *A. pullulans* ในระดับอุตสาหกรรมโดยทำการเลี้ยง *A. pullulans* ในอาหารเหลวแล้วนำเอาน้ำเลี้ยงมาฟอกสีเพื่อกำจัดเม็ดสีเมลานินที่ปนเปื้อนอยู่กับพอลิเมอร์ จากนั้นทำให้เข้มข้นขึ้น และต่อด้วยการอบแห้งตามลำดับ เกิดเป็นผลผลิตที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหาร เครื่องสำอาง และพอลิเมอร์ (Tsujisaka and Mitsuhashi, 1988) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า มีการนำเอาพูลลูแลนไปผลิตเป็นฟิล์มเพื่อใช้เคลือบวัสดุและบรรจุภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า ฟิล์ม หรือ พลาสติกที่ผลิตขึ้นด้วยกระบวนการทางปิโตรเคมีนั้นก่อปัญหาอย่างมากในการกำจัด แต่สำหรับพูลลูแลนนั้นสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ เผาไหม้ได้ และในการเผาไหม้นั้นยังปราศจากการปลดปล่อยความร้อน หรือ ก๊าซพิษที่มากเกินไป ถ้านำพูลลูแลนไปผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (esterification) และ อีทอคซีเลชั่น (ethoxylation) จะเกิดเป็นพูลลูแลนชนิดที่มีลักษณะเป็นฟิล์ม หรือ เยื่อชนิดไม่เลือกผ่าน (impermeability membrane) ที่ละลายน้ำไม่ได้ นอกจากนี้พูลลูแลนยังสามารถรวมตัวกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ (water soluble polymer) เช่น เจลาติน (gelatin) และ พอลิไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinylalcohol) ให้สารที่มีคุณสมบัติที่ดีต่อการนำไปใช้ในงานต่างๆ พูลลูแลนสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ในอาหารที่เคลือบด้วยพูลลูแลนจะเก็บรักษาได้นานกว่าอาหารที่เคลือบด้วยอะไมโลส (amylose) นอกจากนั้นพูลลูแลนยังสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิไดซ์กับน้ำมันเมื่อใช้ในการบรรจุอาหารที่มีไขมันสูง เช่น ถั่วชนิดต่างๆ อาหารจำพวกที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ เช่น ลูกกวาด ปลาซาดีนอบแห้ง เนื้อแห้ง และอื่นๆ (Bulmer *et al.*, 1987 ; Englbrecht and Schmidt, 1992 ; Seviour and Kriatiansen, 1983) การเตรียมพูลลูแลนให้เป็นฟิล์มนั้นสามารถทำได้



รูปที่ 2 กลไกการสังเคราะห์พูลลูแลนของเชื้อ *A. pullulans* (Berry, 1988)

โดยการนำเอาพูลลูแลนมาละลายในน้ำความเข้มข้น 5-10 % ทำให้แห้งโดยใช้ความร้อน หรือ ความดันแก่สารละลาย ฟิล์มที่เกิดขึ้นจะหนาประมาณ 0.01 มิลลิเมตร (Yuen, 1972)

เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับพลาสติกที่ผลิตได้จากวิธีทางปิโตรเคมีแล้ว พูลลูแลนมีลักษณะคล้ายกับสไตรีน (styrene) ที่มีความใส มันเงา และยืดหยุ่นได้ดี นอกจากนั้นพูลลูแลนยังมีคุณสมบัติคล้ายแป้ง และเซลลูโลส ไม่มีสี ไม่มีรส ไม่มีกลิ่น และไม่เป็นพิษ สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ มีความสามารถยึดติดกับกระดาษ ไม้ แก้ว หรือโลหะได้ดี ใช้ผลิตวัสดุที่มีความแข็งแกร่งคล้ายกับเทอร์โมพลาสติกพอลิเมอร์ (thermoplastic polymer) (Boa and LeDuy, 1984 ; Pollock, 1992 ; Yuen, 1972) เนื่องจากพูลลูแลนเป็นสารที่ให้แคลอรีต่ำจึงมีการนำไปใช้ทดแทนแป้งในการประกอบอาหาร พูลลูแลนเมื่อนำมาใช้ในการประกอบอาหาร พบว่า มีคุณสมบัติที่คล้ายกับแป้งทั้งในด้านลักษณะความเหนียว การรักษาความชื้น และมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานเนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดี ลักษณะที่ดีของอาหารที่ประกอบขึ้นโดยมีพูลลูแลนเป็นส่วนผสมคือ เป็นอาหาร หรือ เครื่องดื่มที่ให้แคลอรีต่ำ ปราศจากรส กลิ่น และสี คุณสมบัติที่ละลายในน้ำได้ดีนั้นเมื่อนำไปประกอบอาหารจึงช่วยให้อาหารไม่แห้งจนเกินไป (Kondrat' eva and Lobacheva, 1991 ; Yuen, 1972) นอกจากนั้นยังมีการนำเอาพูลลูแลนไปผลิตเป็นสารที่ช่วยให้เกิดการรวมตัว (flocculant) (Kondrat' eva and Lobacheva, 1991 ; West and Strohfus, 1996 b) ชิ้นส่วนอุปกรณ์งานอิเลคโทรนิค (dielectric material) น้ำเชื่อม (syrups), ครีม (West and Strohfus, 1996 b ; West and Hamer, 1995) งานเภสัชกรรม (Aure and Seviour, 1990) ทำเป็นเส้นใย (fiber) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับไนลอน (nylon) (Moscovici *et al.*, 1993) และวัสดุสิ่งทอที่กันน้ำได้ (West, 1990) ปัจจุบันพูลลูแลนจึงเป็นพอลิเมอร์ที่มีประโยชน์อย่างมหาศาลต่ออุตสาหกรรมต่างๆ ในหลายประเทศ เช่น ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และฝรั่งเศส เป็นต้น (Imshenetskii *et al.*, 1981)

แหล่งอาหารและภาวะการผลิตพูลลูแลน

ในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* นั้นแหล่งอาหาร และปัจจัยของภาวะทางกายภาพมีความสำคัญต่อคุณภาพ และปริมาณของพูลลูแลนที่สังเคราะห์ขึ้น (Reeslev, Jorgensen and Jorgensen, 1993 ; Schuster *et al.*, 1993 ; Simon, Vaugien and Bouchonneau, 1993) โดยมีข้อมูลที่ได้ทำการศึกษาไว้ดังนี้

1. แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่มีสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์พูลลูแลนของ *A. pullulans* โดยทั่วไป *A. pullulans* สามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิดในการเจริญเติบโตทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) (Catley, 1971 a) เช่น น้ำตาลไซโลส (xylose) แรมโนส (rhamnose) กาแลคโตส (galactose) กลูโคส (glucose) ฟรุคโตส (fructose) ซูโครส (sucrose) มอลโตส (maltose) เซลโลไบโอส (cellobiose) แลคโตส (lactose) แต่ที่นิยมใช้สำหรับผลิตพูลลูแลนคือ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ไซโลส มอลโตส และซูโครส (Boa and LeDuy, 1987 ; LeDuy and Boa, 1983 ; Shin *et al.*, 1987 ; Zajic and LeDuy, 1973) Ueda และคณะ (1963) ค้นพบพอลิแซคคาไรด์ที่มีลักษณะคล้ายเด็กซ์แทรนจากการเลี้ยง *Pullularia pullulans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส มอลโตส และ ฟรุคโตส เป็นส่วนประกอบ โดยน้ำตาลซูโครส และมอลโตสให้ผลผลิตพอลิแซคคาไรด์สูงสุดคือ 2.226 และ 1.720 กรัม/100 มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเลี้ยงด้วยน้ำตาลกาแลคโตส แรมโนส และเซลโลไบโอส ให้ผลผลิตพอลิแซคคาไรด์ต่ำมากคือ 0.064 0.055 และ 0.094 ก./100 มล. ตามลำดับ Sowa และ คณะ (1963) ผลิตพูลลูแลนโดยเชื้อ *P. pullulans* ในแหล่งอาหารกลูโคสได้ผลิตผลประมาณ 12 % จากแหล่งน้ำตาลตั้งต้น Catley (1971a) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *P. pullulans* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส ซูโครส มอลโตส และฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีดำด้วยเม็ดสีเมลานินแต่ไม่พบการสร้างเม็ดสีเมลานินเมื่อเลี้ยงด้วยกลีเซอรอล (glycerol) หรือ อะซิเตท (acetate) อาหารที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตสูงสุดและต่ำสุดเมื่อเลี้ยงด้วยมอลโตสคือ 14.8 และ 4.9 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ Zajic และ LeDuy (1973) พบว่า พอลิแซคคาไรด์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์โดยเชื้อ *P. pullulans* นั้นสามารถสังเคราะห์ได้จากน้ำตาลกลูโคส ซึ่งความเข้มข้นของพอลิแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้เป็น 1.03 ก./100 มล. โดยน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 100 % ถูกเปลี่ยนเป็นพอลิแซคคาไรด์เพียง 25.8 % และระดับ pH ในอาหารลดลงจาก pH 5.0 สู่ 3.0 ในระยะเวลา 12 ชั่วโมงภายหลังจากการเลี้ยง LeDuy และ Boa (1983) ใช้น้ำสกัดจากพีท (peat hydrolyzate) เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* พบอัตราการผลิตพอลิแซคคาไรด์จากการเลี้ยงด้วย peat hydrolyzate มีปริมาณมากเท่ากับการเลี้ยง *A. pullulans* ด้วยน้ำตาลกลูโคสคือ 14 และ 15 กรัม/ลิตร ตามลำดับ นอกจากนั้นเมื่อใช้น้ำสกัดจากพีทเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* 3 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ 140 B 142 และ 2552 แล้วไม่มีความจำเป็นที่จะต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนและฟอสเฟต ตามลำดับ (Boa and LeDuy, 1984) Shin และคณะ (1987) รายงานการผลิตพูลลูแลนจากน้ำตาลซูโครสด้วยเชื้อ *A. pullulans* พบว่า ระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีผลยับยั้งการเจริญ

เติบโตของเซลล์ และการผลิตพอลิแซคคาไรด์โดยอัตราการผลิตจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นสูงกว่า 5 % Shin และคณะ (1989) พบว่า การผลิตพูลลูแลนจากการเลี้ยงแบบผสมระหว่าง *A. pullulans* กับ *Kluyveromyces fragilis* โดยใช้อินนูลิน (inulin) เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ได้สูงถึง 12 ก./ล. เมื่อเทียบกับการเลี้ยงด้วย *A. pullulans* เพียงชนิดเดียวให้ผลผลิตเพียง 1 ก./ล. Silman และคณะ (1990) ศึกษาการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* 5 สายพันธุ์ เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 3 ชนิด พบว่า น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับ *A. pullulans* ทั้ง 5 สายพันธุ์ West (1990) ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอาแหล่งอาหารจากข้าวโพดประกอบด้วย corn steep liquor corn steep solids corn starch corn gluten meal white corn meal ground corn corn dextrin maltose corn dextrin และ corn syrup มาใช้ในการสังเคราะห์พูลลูแลนจาก *A. pullulans* พบว่า พูลลูแลนให้ผลผลิตที่ต่ำภายหลังจากการเจริญเติบโตในอาหารที่ประกอบด้วย corn dextrin maltose และ corn dextrin ในทางตรงกันข้ามพูลลูแลนเกิดขึ้นสูงภายหลังจากการเจริญเติบโตในอาหารที่ประกอบด้วย corn syrup นอกจากนั้นระดับของพูลลูแลนมีการผลิตสูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและต่ำสุดเมื่อใช้น้ำตาลมอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับน้ำหนักเซลล์แห้งที่เกิดขึ้น พบว่า มีความสัมพันธ์กับปริมาณคาร์บอนที่ใช้ไปแต่ปริมาณพูลลูแลนที่ผลิตขึ้นนั้นไม่เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้โดยปริมาณการผลิตจะถูกยับยั้งเมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้น (West and Hamer, 1991) Schuster และคณะ (1993) พบว่า ในการทดลองระดับขวดแก้วที่มีความแตกต่างของชนิดแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตพูลลูแลนแตกต่างกันโดยน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพูลลูแลนเมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่นๆ โดยน้ำตาลซูโครสประมาณ 54 % ถูกเปลี่ยนไปเป็นพูลลูแลน (West and Hamer, 1993 b) Yamasaki และคณะ (1993) พบว่า เมื่อลดความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเปลี่ยนแปลงไปส่งผลให้อัตราการผลิตเปลี่ยนแปลงไปเช่นกัน Moscovici (1993) รายงานว่า *A. pullulans* สายพันธุ์กลาย ICCF-68 สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ในถังหมักซึ่งบรรจุอาหารที่มีกลูโคสความเข้มข้น 80 ก./ล. เป็นแหล่งคาร์บอน อัตราการสังเคราะห์พอลิแซคคาไรด์สูงสุด และความเข้มข้นสุดท้ายของพอลิแซคคาไรด์คือ 1.05 ก./ล. ต่อ ชม. และ 50.2 ก./ล. ตามลำดับ West และ Strohfus (1996 a) พบเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ซึ่งสามารถย่อยสลายพูลลูแลนได้ในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* ที่มี corn-syrup เป็นแหล่งคาร์บอนภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 7 วัน

2. แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจนนั้นมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสังเคราะห์พูลลูแลนเช่นกัน ชนิดของไนโตรเจนที่แตกต่างกันจะส่งผลให้การเจริญเติบโต และการสังเคราะห์พูลลูแลนของ *A. pullulans* แตกต่างกัน Seviour และ Kristiansen (1983) ผลิตพอลิแซคคาไรด์จาก *A. pullulans* ในถังหมักขนาด 6 ลิตร พบว่า การผลิตพอลิแซคคาไรด์ขึ้นกับระดับของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ที่ระดับไนโตรเจนที่สูงเกินความจำเป็นจะส่งผลให้อัตราการผลิตพอลิแซคคาไรด์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด Bulmer และคณะ (1987) ศึกษาผลกระทบของ NH^+_4 (50 mM) และความเข้มข้นของโปรตอน (pH อยู่ในช่วง 4-8) ในการผลิตพูลลูแลนจากเชื้อ *A. pullulans* พบว่า NH^+_4 มีอิทธิพลต่อกลไกการสังเคราะห์พูลลูแลนโดยจะมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์โปรตีน West และ Hamer (1995) ศึกษาผลกระทบจาก น้ำมันจากผัก กรดไขมันต่างๆ และสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ในการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 กับความสัมพันธ์กับแหล่งไนโตรเจนด้วยสูตรอาหารที่มี corn syrup เป็นองค์ประกอบ พบว่า เมื่อเติมน้ำมันมะกอก (olive oil) กรดโอลิอิก (oleic acid) และสารยับยั้งการเกิดฟอง (antifoam surfactants) ในอาหารจะช่วยเพิ่มการผลิตพูลลูแลน เมื่อใช้ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณการผลิตพูลลูแลนจะเกิดขึ้น 100 % เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน 3 วัน และเมื่อเติมน้ำมันมะกอก สารยับยั้งการเกิดฟองหมายเลข 204 หรือ สารยับยั้งการเกิดฟองหมายเลข 289 ลงไป อัตราการผลิตจะเกิดขึ้นเพียง 50 % แต่ถ้าเติมด้วยกรดลิโนลีอิก (linoleic acid) หรือ กรดโอลิอิก และเมื่อใช้ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีการผลิตอยู่ที่อัตรา 80 % West และ Strohfus (1996 b) ผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ RP-1 ด้วยกากที่เหลือจากการหมักข้าวโพดเพื่อผลิตเอทธานอลเป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ corn syrup เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อใช้ 1 % ของกากที่เหลือจากการหมักข้าวโพดเพื่อผลิตเอทธานอลแทนแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับ corn syrup ที่ความเข้มข้น 7.5 % โดยไม่ใส่สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เป็นอาหารเสริมน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่เลี้ยงในแอมโมเนียมซัลเฟตจะสูงกว่าเซลล์ที่เจริญกากที่เหลือจากการหมักภายหลังจากการเลี้ยง 7 วัน ความเหนียว และปริมาณพูลลูแลนที่เกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยกากที่เหลือจากการหมักเป็นเวลานาน 7 วันจะน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเช่นกัน

3. อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์พูลลูแลนเช่นกัน Ueda และคณะ (1963) พบว่า ที่อุณหภูมิ 25°C ให้ผลผลิตพูลลูแลนสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30°C คือ 2.26 และ 0.38 ก./100 มล. ตามลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิทั้งสองระดับมีอัตราการเจริญเติบโตของ *A. pullulans* ไม่แตกต่างกัน Mcneil และ Kristiansen (1990) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่ออัตราการผลิตพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *A. pullulans* ในช่วง 20°C ถึง 36°C พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อการสังเคราะห์พูลลูแลน คืออุณหภูมิที่ 24°C จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตมากที่สุด West และ Hamer (1993 a) ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิในการผลิตพูลลูแลนโดย *A. pullulans* พบว่า การสังเคราะห์พูลลูแลนเมื่อบ่มด้วยอุณหภูมิต่างๆ จาก 23°C ถึง 33°C พบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตพูลลูแลนคือ อุณหภูมิที่ 26°C ระดับความเข้มข้นของพูลลูแลนต่ำสุดเมื่อเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 33°C และน้ำหนักเซลล์ต่ำสุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26°C น้ำหนักเซลล์แห้งจะสูงขึ้นเสมอเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นในขณะที่การผลิตพูลลูแลนจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

4. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ปัจจัยของ pH นับว่ามีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์พูลลูแลนเช่นเดียวกัน pH ที่พอเหมาะต่อการสังเคราะห์พูลลูแลนจะขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ *A. pullulans* อย่างไรก็ตามในการผลิตพูลลูแลน pH ระหว่างการผลิตจะลดลงอันเนื่องมาจากตัวพอลิเมอร์เอง กรดอินทรีย์ และอนินทรีย์บางชนิดที่เกิดขึ้นระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ Ono และคณะ (1977) รายงานว่าระดับของ pH เริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตมีความสำคัญมากต่อความสามารถของ *A. pullulans* สายพันธุ์ S-1 ในการผลิตพูลลูแลน ซึ่งไม่พบการผลิตพูลลูแลนเมื่อระดับ pH เริ่มต้นในการผลิตเป็น 2-2.5 แต่ถ้าเลี้ยงด้วยระดับ pH เริ่มต้น 6.0 จุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นผลผลิตได้ในอัตรา 50-60 % และระดับ pH เริ่มต้นจะลดลงอย่างรวดเร็วในระหว่างการเลี้ยง Imshenetskii และ Kondrat'eva (1981) ศึกษาอิทธิพลของระดับ pH เริ่มต้นในอาหารต่อการผลิตพูลลูแลนจาก *P. pullulans* พบว่า ประสิทธิภาพในการสังเคราะห์พูลลูแลนของสายพันธุ์ต่างๆ นั้นขึ้นกับระดับ pH เริ่มต้นของสารอาหารที่ใช้ ระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์พูลลูแลนคือ 8.0 Lee และ Yoo (1993) ศึกษาผลกระทบของ pH ต่อจำนวนโมเลกุลของพูลลูแลนจาก *A. pullulans* พบว่า ความเข้มข้นของพูลลูแลนสูงสุดเมื่อผลิตด้วย pH เริ่มต้นที่ 6 โดยพูลลูแลนจะมีจำนวนโมเลกุล 50,000-600,000 DP เมื่อผลิตด้วย pH เริ่มต้นที่ 3.0 ขณะที่พูลลูแลนจะมีจำนวนโมเลกุล 200,000-300,000 DP เมื่อผลิตที่ pH สูงกว่า 4.5 เมื่อ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 จะได้จำนวนโมเลกุล และ

ความเข้มข้นของผลผลิตสูงที่สุด และระดับ pH จะเปลี่ยนเป็น 3.0 เมื่อเวลาผ่านไป 2 วัน Lacroixt และคณะ (1985) ศึกษาผลกระทบจากระดับ pH เริ่มต้นในการหมักด้วย *A. pullulans* 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ 2552 และ 140 B ในการเจริญเติบโตของเซลล์ และการสังเคราะห์พอลิแซคคาไรด์ พบว่า pH ในอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วจากระดับ pH เริ่มต้นที่ 5.5 สู่ระดับ pH สุดท้ายคงที่ที่ระดับ pH 2.5 ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อทดลองใช้ pH เริ่มต้นที่ต่ำคือ pH 2 พบว่า พอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยมาก Mcneil และคณะ (1989) รายงานว่ารูปร่างเซลล์แบบยีสต์ (yeast like form) ของ *A. pullulans* เป็นรูปร่างพื้นฐานในการสังเคราะห์พูลลูแลนซึ่งเจริญอยู่ที่ pH ช่วง 3.0-6.3 อัตราการสังเคราะห์พูลลูแลนจะขึ้นอยู่กับระดับ pH เริ่มต้นที่ใช้โดยระดับ pH จะส่งผลกระทบต่อสัดส่วนของการเกิดรูปร่างเซลล์แบบยีสต์

5. ปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการผลิตพูลลูแลน

Imshenetskii และคณะ (1983) พบว่า เมื่อเติม colchicine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยเพิ่มอัตราการสังเคราะห์พูลลูแลนสูงขึ้น McNeil และ Kristiansen (1987) ศึกษาผลกระทบจากความเร็วของเครื่องกวนสาร (impeller speed) ต่อการผลิตพูลลูแลนจาก *A. pullulans* พบว่า อัตราการผลิตพูลลูแลนและมวลเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อความเร็วของเครื่องกวนสารสูงขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของพูลลูแลนที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนกับเปอร์เซนต์ของเซลล์แบบยีสต์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่าจำนวนโมเลกุลของพูลลูแลนที่ลดลงนั้นเป็นสาเหตุมาจากเอนไซม์เอนโดอะไมเลส (endoamylase) ที่ผลิตขึ้นระหว่างการผลิตพูลลูแลน Rho Luong และ LeDuy (1988) ศึกษาผลกระทบจากออกซิเจนต่อการผลิตพูลลูแลนด้วย *A. pullulans* พบว่า ออกซิเจนเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตพูลลูแลนด้วย *A. pullulans* โดยผลผลิต และอัตราการสังเคราะห์พูลลูแลนจะเป็นสัดส่วนกับปริมาณออกซิเจนที่ใช้ไป ความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเมลานินกับระดับออกซิเจนที่ให้ พบว่า อัตราการสังเคราะห์เมลานินจะเป็นสัดส่วนกับระดับของออกซิเจนที่ใช้ไปเช่นกัน Stasinopoulos และคณะ (1989) ศึกษาผลกระทบจากสารเคมีที่ใช้เป็นสารกำจัดฟองด้วยพอลิโพรไพลีนไกลคอล (polypropylene glycol) หมายเลข 2025 ต่อการผลิตพอลิแซคคาไรด์ด้วย *Epicoccum purpurascens* และ *A. pullulans* พบว่า สารเคมีที่ใช้เป็นสารกำจัดฟองดังกล่าวนั้นส่งผลให้ผลผลิตของพอลิแซคคาไรด์ลดลงในการผลิตด้วยเชื้อ *E. purpurascens* แต่ไม่ส่งกระทบกับ *A. pullulans* นอกจากนั้นสายพันธุ์กลายของเชื้อ *A. pullulans* โดยวิธีกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีสามารถลดอัตราการเกิดเม็ดสีเมลานินในระหว่างการผลิตพูลลูแลนได้ซึ่งระดับของเม็ดสีเมลานินในเซลล์ และในพอลิแซคคาไรด์เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมลดลงถึง 11 และ 18 เท่าตามลำดับ (West and Hamer, 1993 b)

เนื่องจากคุณประโยชน์อันมากมายของพูลลูแลน ปัจจุบันยังคงมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อหาภาวะในการผลิตพูลลูแลนที่เหมาะสมที่สุดในแต่ละสายพันธุ์ สำหรับประเทศไทยนั้นนับได้ว่าการผลิตพูลลูแลนนั้นเป็นงานวิจัยชิ้นใหม่ที่จำเป็นต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อที่ให้ได้ข้อมูล และเป็นแนวทางอันจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม และความก้าวหน้าทางอุตสาหกรรม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาถึงผลของระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ ผลของแหล่งอาหาร (nutrients) ต่างๆ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ต่อการผลิตพูลลูแลน รวมทั้งเปรียบเทียบการผลิตระหว่าง *A. pullulans* ต่างสายพันธุ์ และการสลายตัวของพูลลูแลนในสภาพธรรมชาติ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตไบโอพอลิเมอร์ อันได้แก่ ระดับ pH เริ่มต้นของอาหาร อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน (carbon source) แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ที่มีผลต่อการผลิต

2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อรา *A. pullulans* 2 สายพันธุ์ ในการผลิตไบโอพอลิเมอร์