

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาการเจริญเติบโต และลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.1 การเจริญเติบโต

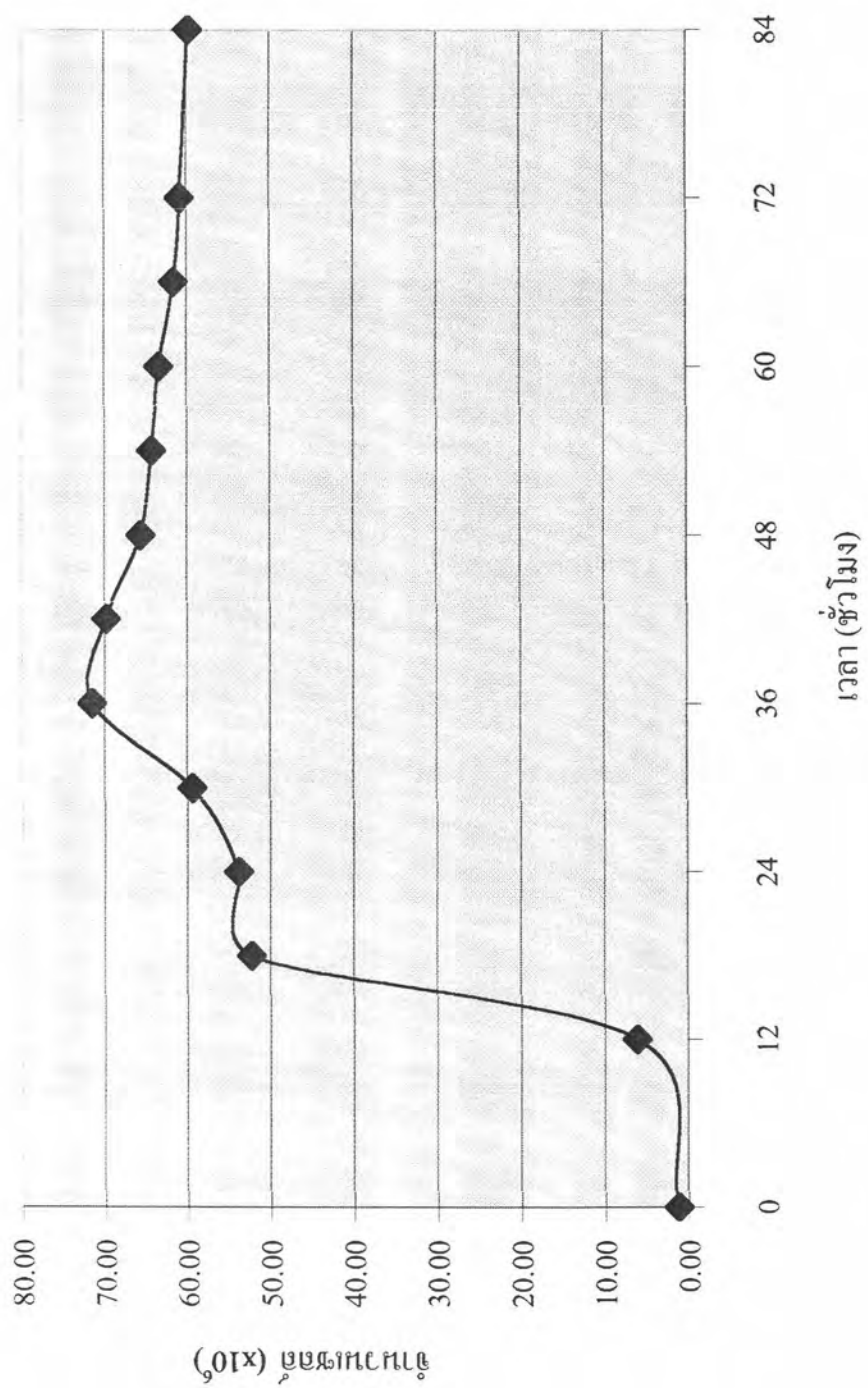
ผลของการเจริญเติบโตภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023 ในอาหารสูตร PDB พบว่า สายพันธุ์ NRRL 6992 มีการเจริญเติบโตในช่วง lag phase ใช้เวลา 30 ชั่วโมง จากนั้นจะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วเข้าสู่ช่วง log phase และให้จำนวนเซลล์สูงสุด 1.11×10^8 เซลล์ภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ผลแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 3 สำหรับสายพันธุ์ ATCC 42023 มีการเจริญเติบโตในช่วง lag phase ใช้เวลาสั้นๆ เพียง 18 ชั่วโมง จากนั้นจะมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วเข้าสู่ช่วง log phase และให้จำนวนเซลล์สูงสุด 7.15×10^7 เซลล์ภายใน 36 ชั่วโมง หลังจากนั้น พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตคงที่ และจำนวนเซลล์เริ่มลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงนานขึ้นเช่นกัน ดังตารางที่ 1 และ รูปที่ 4

1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

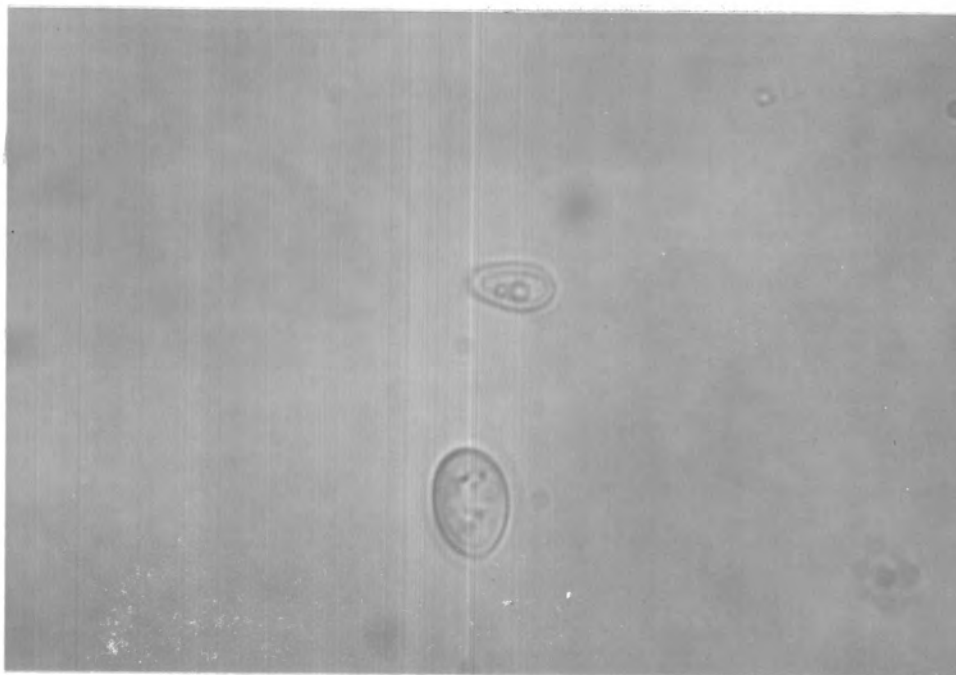
ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023 ในอาหารสูตร PDB เป็นเวลานาน 5 วัน พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้ง 2 สายพันธุ์คล้ายกันคือ เซลล์มีการเจริญเติบโตโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นแบบแตกหน่อ (budding) ดังรูปที่ 7 และ 11 ลักษณะของเซลล์ที่เกิดขึ้นมีทั้งแบบลาสโตสปอร์ ดังรูปที่ 5 และ 10 คลาโมโดสปอร์ ดังรูปที่ 6 และ 12 ลักษณะแบบเส้นใยดังรูปที่ 9 และ 14 นอกจากนั้นในระหว่างการเลี้ยงยังพบเซลล์แบบเซลล์ฟองดังรูปที่ 8 และ 13 และการหลุดของพอลิเมอร์ออกจากนอกเซลล์ทั้ง 2 สายพันธุ์ด้วยเซลล์แบบเซลล์ฟองดังรูปที่ 8 แต่ลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่าง 2 สายพันธุ์ คือ การสร้างเม็ดสีเมลานินระหว่างการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ ATCC 42023 ดังรูปที่ 12 และ 13 แต่ไม่พบการสร้างเม็ดสีเมลานินนี้กับสายพันธุ์ NRRL 6992

ตารางที่ 1 ผลของจำนวนเซลล์ *A. pullulans* 2 สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตในอาหารสูตร PDB

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$)	
	สายพันธุ์ NRRL 6992	สายพันธุ์ ATCC 42023
0	1.11	1.20
6	1.15	2.00
12	1.18	6.13
18	1.30	52.30
24	5.03	53.80
30	62.30	59.40
36	102.50	71.50
42	108.50	69.80
48	111.10	65.60
54	106.80	64.30
60	101.30	63.40
66	89.90	61.60
72	89.00	60.80

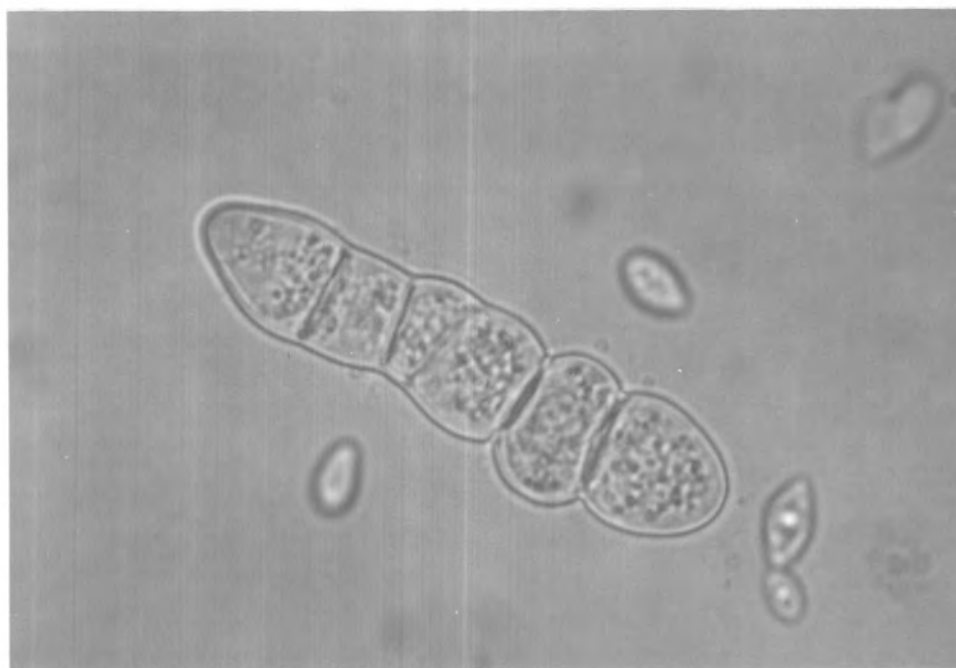


รูปที่ 4 กราฟมาตรฐานแสดงการเจริญของเชื้อ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023



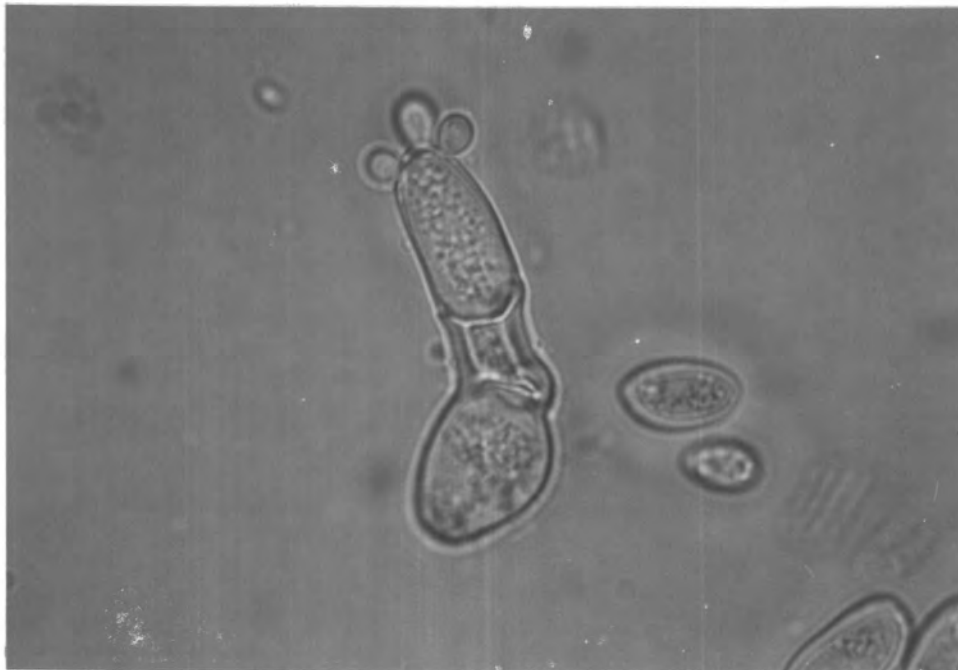
รูปที่ 5 ลักษณะเซลล์แบบบลาสโตสปอร์ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 (1000 X)

_____ 10 μ



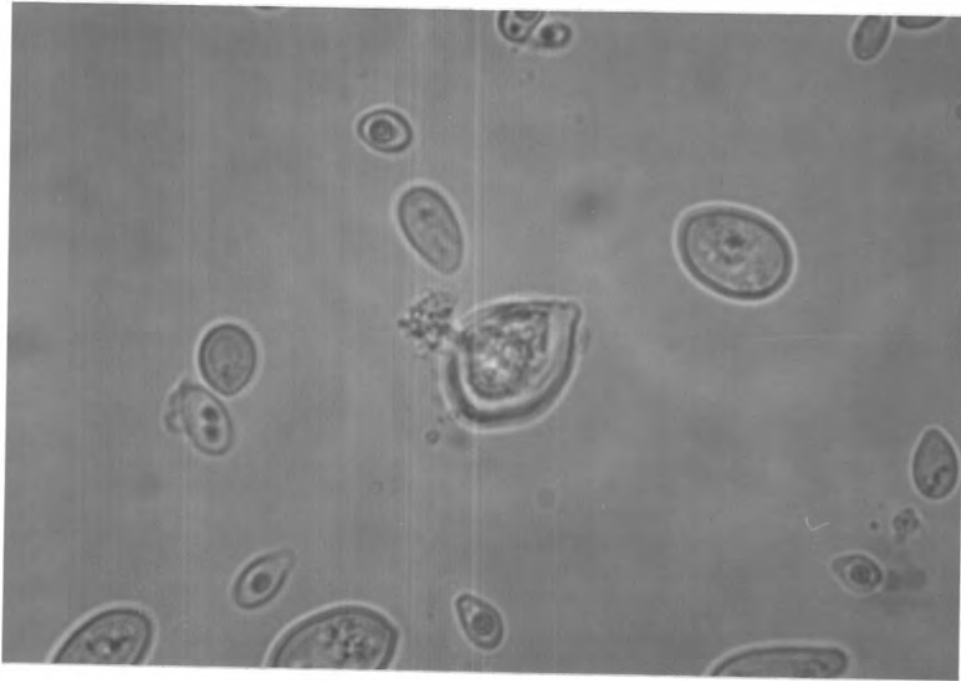
รูปที่ 6 ลักษณะเซลล์แบบคลาไมโดสปอร์ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 (1000 X)

_____ 10 μ

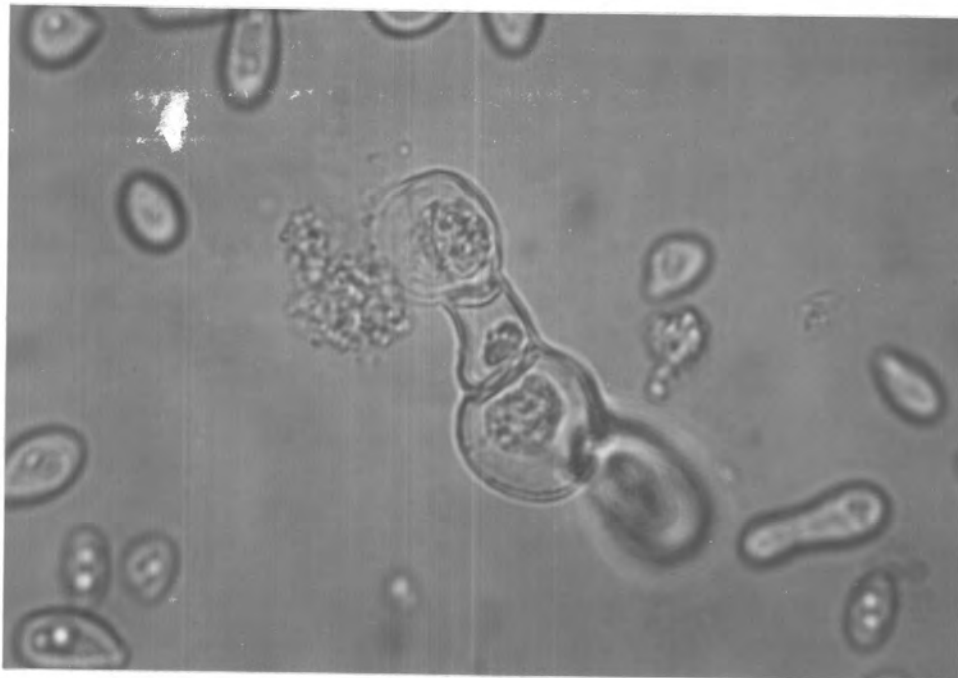


รูปที่ 7 การสืบพันธุ์แบบแตกหน่อของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 (1000 X)

_____ 10 μ



ก

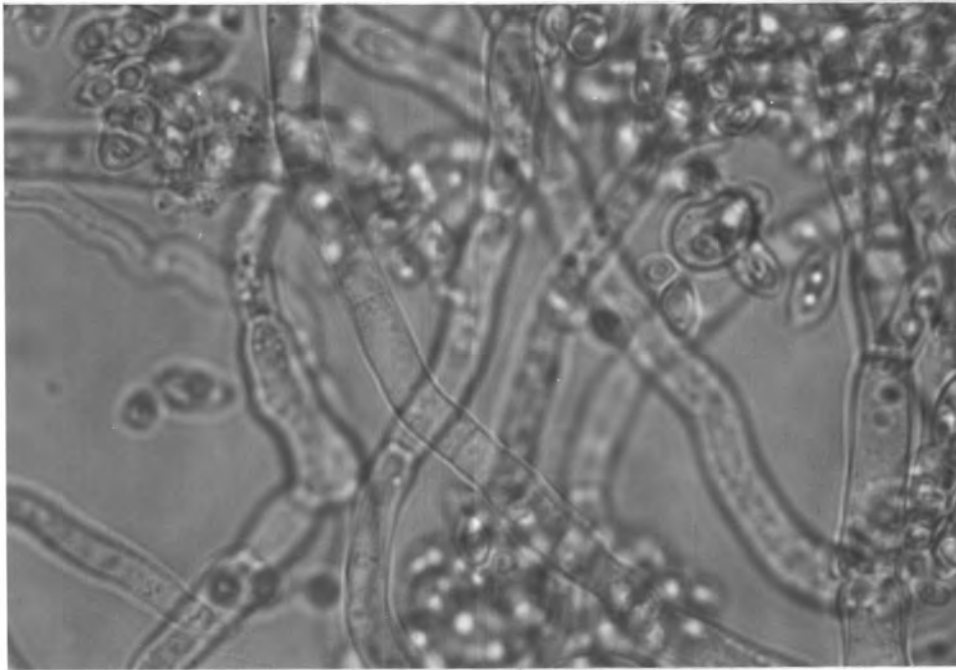


ข

รูปที่ 8 ลักษณะเซลล์แบบเซลล์ฟองของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 (1000 X)

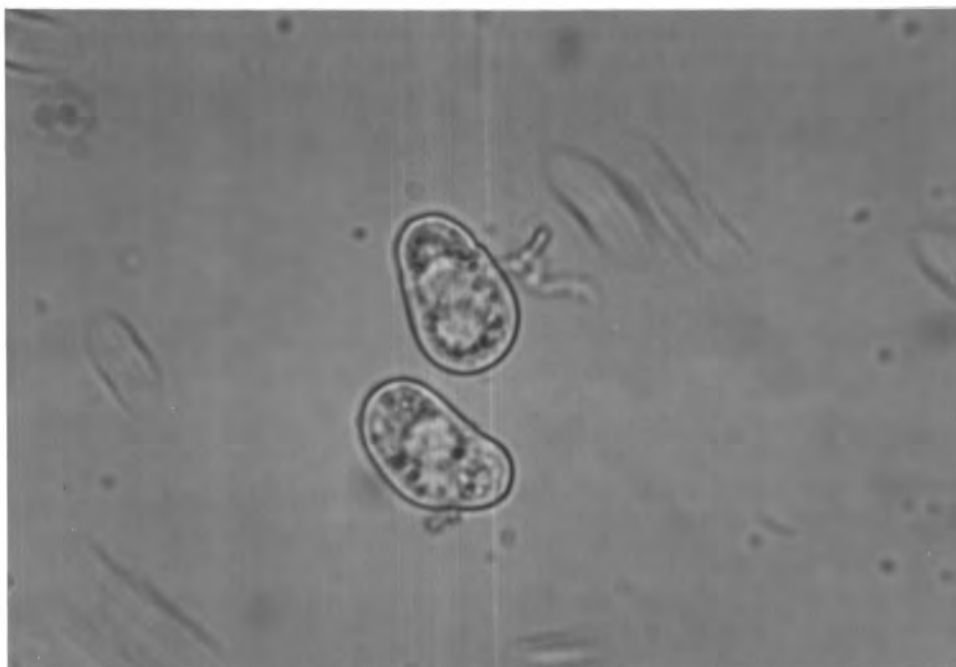
ก. และ ข. การหลั่งพอลิกลูแลนออกภายนอกเซลล์

_____ 10 μ



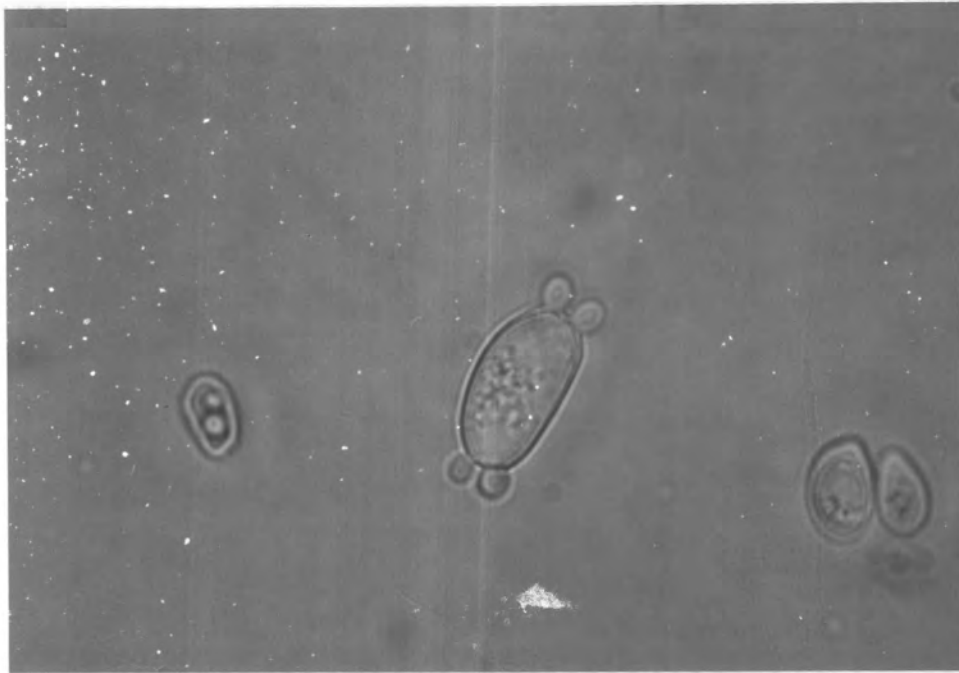
รูปที่ 9 ลักษณะเซลล์แบบเส้นใยของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 (1000 X)

_____ 10 μ



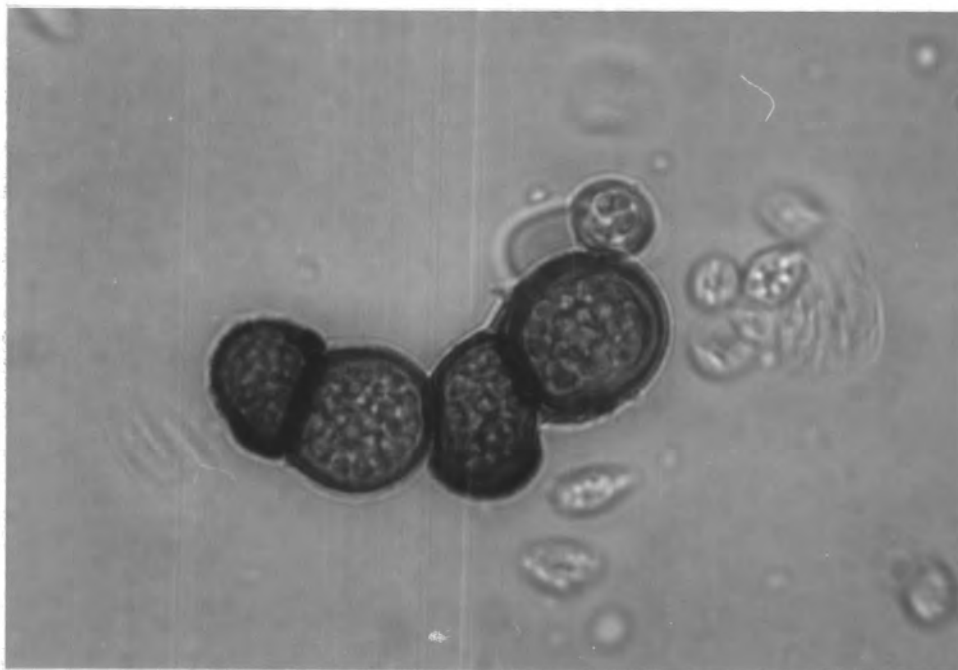
รูปที่ 10 ลักษณะเซลล์แบบบลาสโตสปอร์ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 (1000 X)

_____ 10 μ



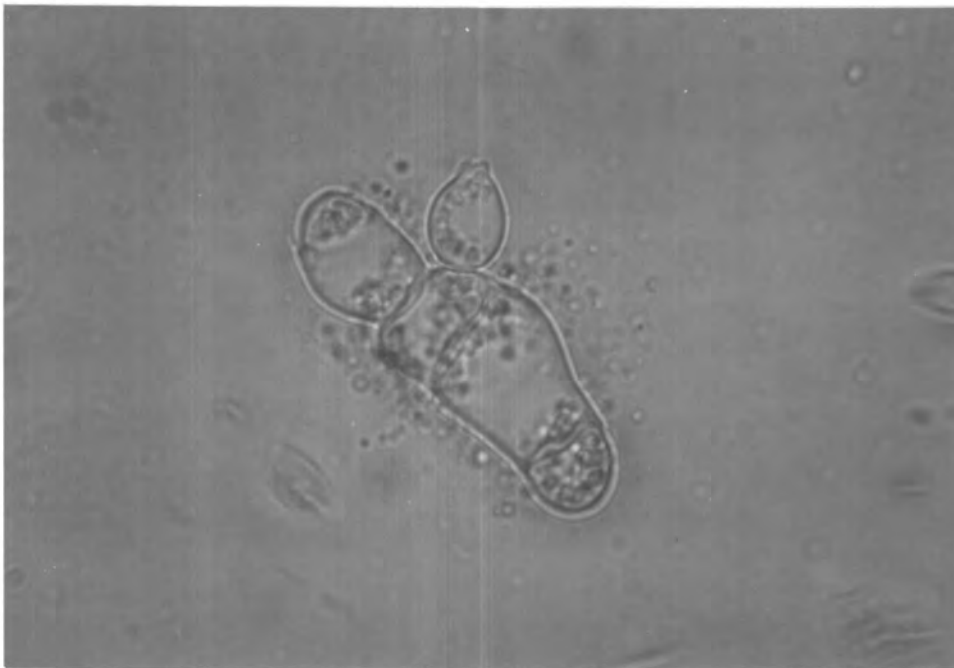
รูปที่ 11 การสีบพันธุ์แบบแตกหน่อของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 (1000 X)

_____ 10 μ

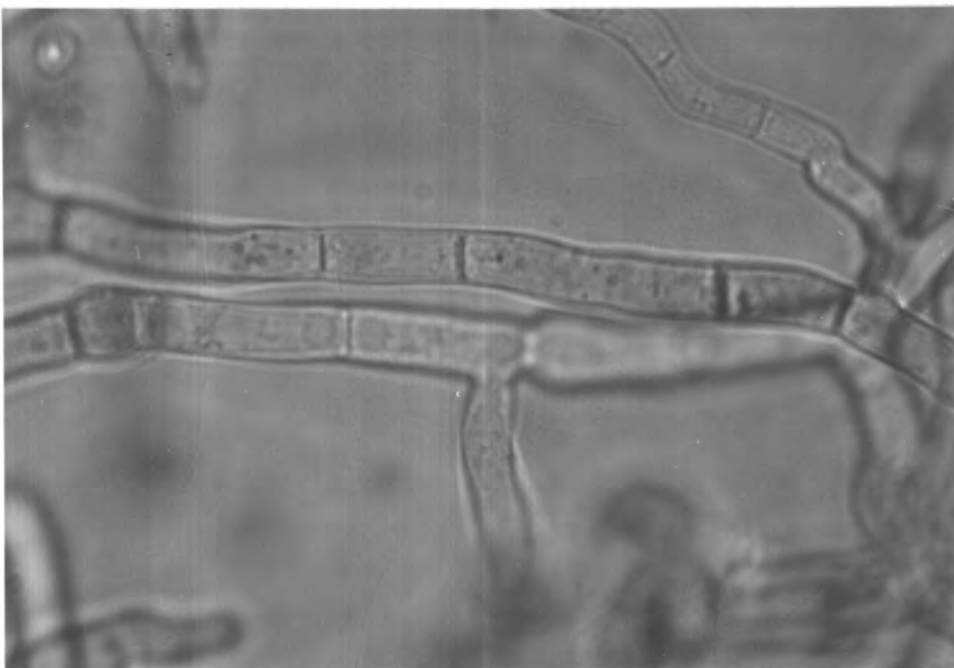


รูปที่ 12 ลักษณะเซลล์แบบคลาไมโดสปอร์ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 (1000 X)

_____ 10 μ



รูปที่ 13 ลักษณะเซลล์แบบเซลล์พองของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 (1000 X)
_____ 10 μ



รูปที่ 14 ลักษณะเซลล์แบบเส้นใยของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 (1000 X)
_____ 10 μ

2. ผลการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพุลูลแลน

2.1 ผลการศึกษาระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร production ปรับระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ มีค่าเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 6.5 และ 7.0 บ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่า สายพันธุ์ของเชื้อ *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการตอบสนองต่อระดับ pH ต่างๆ ในการเจริญเติบโต และการผลิตพุลูลแลนอย่างมีนัยสำคัญ โดยในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ สายพันธุ์ NRRL 6992 เมื่อได้รับ pH เริ่มต้นระดับต่างๆ จะให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 6.441 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และผลผลิตเฉลี่ยสูงสุด 0.098 กรัม/กรัมของแหล่งคาร์บอน ในขณะที่สายพันธุ์ ATCC 42023 ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 3.667 มก./มล. และผลผลิตเฉลี่ยสูงสุด 0.257 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ระดับของ pH ทั้ง 5 ระดับมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตพุลูลแลนของทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ โดยในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH เริ่มต้น 4.0 ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 6.263 มก./มล. และต่ำสุดที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.0 เฉลี่ย 4.330 มก./มล. และที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 ให้ผลผลิตสูงสุดเฉลี่ย 0.341 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดที่ระดับ pH เริ่มต้น 4.0 เฉลี่ย 0.081 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังตารางที่ 2 และ 3

เชื้อราสายพันธุ์ NRRL 6992 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH เริ่มต้น 4.0 ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย 7.770 มก./มล. และต่ำสุดในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH 6.0 เฉลี่ย 5.515 มก./มล. และให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 เฉลี่ย 0.229 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดที่ระดับ pH เริ่มต้น 4.0 เฉลี่ย 0.033 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 15 และ 17 เชื้อราสายพันธุ์ ATCC 42023 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH เริ่มต้น 4.0 ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย 4.755 มก./มล. และต่ำสุดที่ระดับ pH 6.0 ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย 3.190 มก./มล. และให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับ pH เริ่มต้น 6.5 เฉลี่ย 0.471 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดที่ระดับ pH เริ่มต้น 4.0 เฉลี่ย 0.137 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 16 และ 18 ส่วนการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ในระหว่างการบ่มเชื้อ พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH เริ่มต้นแต่ละระดับมีค่าลดลงจากระดับ pH เริ่มต้นเมื่อเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงของระดับ pH ของสายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023 ในวันที่ 7 อยู่ในช่วง 2.5 ถึง 3.2 และ 2.6 ถึง 4.2 ตามลำดับ ดังรูปที่ 19 และ 20

ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 7 วันด้วยภาวะ pH เริ่มต้นของอาหารที่ 4.0 5.0 6.0 6.5 และ 7.0 พบว่า สายพันธุ์ NRRL 6992 มีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 9.00 12.00 17.63 14.63 และ 11.63 มก./100 มล. ตามลำดับ และ 10.50 12.00 12.00 13.88 และ 17.25 มก./100 มล. ตามลำดับใน สายพันธุ์ ATCC 42023 ดังตารางที่ 4

อิทธิพลของ pH ทั้ง 5 ระดับต่อการเจริญเติบโตของทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงด้วยภาพถ่าย พบว่า สีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้นทั้ง 5 ระดับให้สีของอาหารแตกต่างกันโดยสีของอาหารจะมีสีเหลืองเข้มขึ้นเมื่อระดับของ pH สูงขึ้น ดังรูปที่ 21 column 1 ก-จ และ รูปที่ 22 column 1 ก-จ สายพันธุ์ NRRL 6992 เมื่อเจริญเติบโตด้วยระดับ pH เริ่มต้นทั้ง 5 ระดับ ไม่พบการสร้างเม็ดสีเมลานิน ดังรูปที่ 21 column 2 ก-จ ในทางตรงกันข้าม สายพันธุ์ ATCC 42023 พบว่า มีการสร้างเม็ดสีเมลานินซึ่งมีสีเหลืองปะปนในอาหารระหว่างการเจริญเติบโต โดยการเกิดเม็ดสีเหลืองนี้เชื่อจะสร้างขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหารที่มี pH เริ่มต้นทั้ง 5 ระดับ ดังรูปที่ 22 column 2 ก-จ

ตารางที่ 2 ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023

Treatment		อายุ (วัน)								
		0	1	1.5	2	3	4	5	6	7
Part 1	สายพันธุ์ NRRL 6992	0.035	0.854 b	2.112 b	3.485 a	4.826 a	5.598 a	5.924 a	6.247 a	6.441 a
	ATCC 42023	0.035	2.901 a	2.287 a	2.394 b	2.904 b	3.037 b	3.062 b	3.242 b	3.667 b
Part 2	ระดับ pH									
	4.0	0.305	1.663 a	2.205 bc	3.010 b	3.773 c	4.345 b	5.233 a	5.530 a	6.263 a
	5.0	0.035	1.635 a	2.485 a	2.793 c	4.165 b	4.743 a	4.928 b	4.965 b	5.035 b
	6.0	0.035	1.483 b	1.910 d	3.663 a	4.333 a	4.058 c	4.703 c	4.158 e	4.330 d
	6.5	0.035	1.238 d	2.100 c	2.745 c	3.648 d	4.053 c	4.208 d	4.303 d	4.653 c
	7.0	0.035	1.345 c	2.298 b	2.488 d	3.408 e	4.390 b	4.025 e	4.768 c	4.990 b
CV (%)		1.32	3.71	6.83	6.35	3.15	3.27	4.21	2.93	3.08
Part 1		NS	**	**	**	**	**	**	**	**
Part 2		NS	**	**	**	**	**	**	**	**

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

CV (Coefficient of Variation) คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน

* = แตกต่างกันทางสถิติความเชื่อมั่น 95%

Part 1 เปรียบเทียบผลผลิตของ 2 สายพันธุ์โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจากระดับ pH เริ่มต้นทั้ง 5 ระดับ

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

Part 2 เปรียบเทียบผลผลิตของระดับ pH เริ่มต้น 5 ระดับโดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจาก 2 สายพันธุ์

ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 3 ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพอลิแลน (ก./ก. ของแห้งคาร์บอน) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023

Treatment	อายุ (วัน)							
	1	1.5	2	3	4	5	6	7
สายพันธุ์								
Part 1								
NRRL 6992	0.019 b	0.026 b	0.060 b	0.089 b	0.101 b	0.102 b	0.099 b	0.098 b
ATCC 42023	0.031 a	0.091 a	0.118 a	0.160 a	0.190 a	0.222 a	0.245 a	0.257 a
ระดับ pH								
4.0	0.020 e	0.048 d	0.057 e	0.067 e	0.074 e	0.074 e	0.076 e	0.081 e
5.0	0.023 d	0.055 c	0.072 d	0.079 d	0.096 d	0.094 d	0.105 d	0.110 d
6.0	0.028 b	0.057 c	0.090 c	0.108 c	0.109 c	0.124 c	0.144 c	0.142 c
6.5	0.029 a	0.070 a	0.132 a	0.213 a	0.270 a	0.330 a	0.330 a	0.341 a
7.0	0.025 c	0.066 b	0.097 b	0.157 b	0.180 b	0.191 b	0.206 b	0.214 b
CV (%)	5.40	4.91	4.91	4.48	4.22	2.58	2.02	3.23
Part 1	**	**	**	*	**	**	**	**
Part 2	**	*	**	**	**	**	**	**

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

* = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ

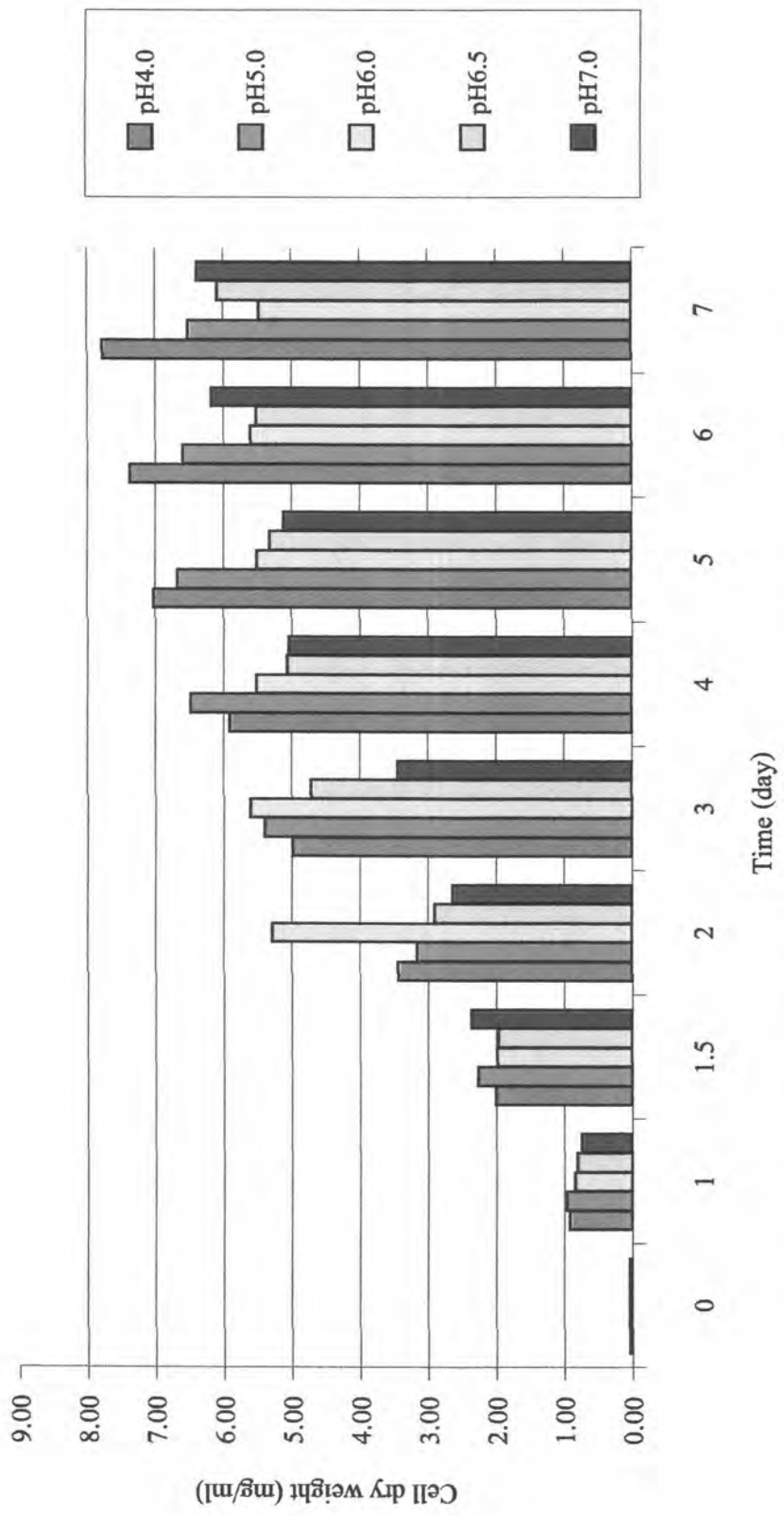
CV (Coefficient of Variation) คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรผัน

Part 1 เปรียบเทียบผลผลิตของ 2 สายพันธุ์ โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจากระดับ pH เริ่มต้นทั้ง 5 ระดับ

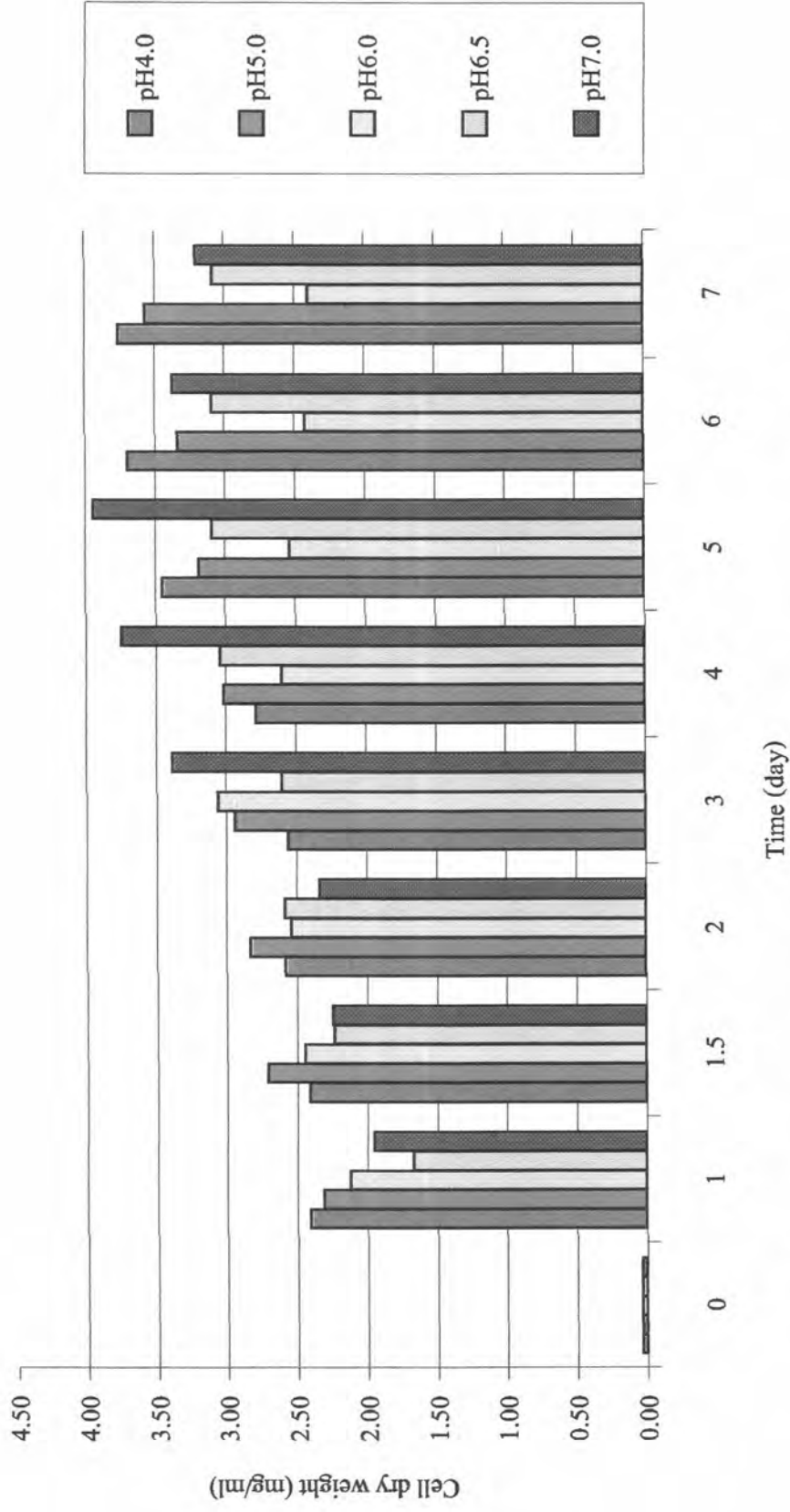
Part 2 เปรียบเทียบผลผลิตของระดับ pH เริ่มต้น 5 ระดับ โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจาก 2 สายพันธุ์

ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก./100 มล.) ในวันที่ 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* ด้วยระดับ pH เริ่มต้นต่างๆ

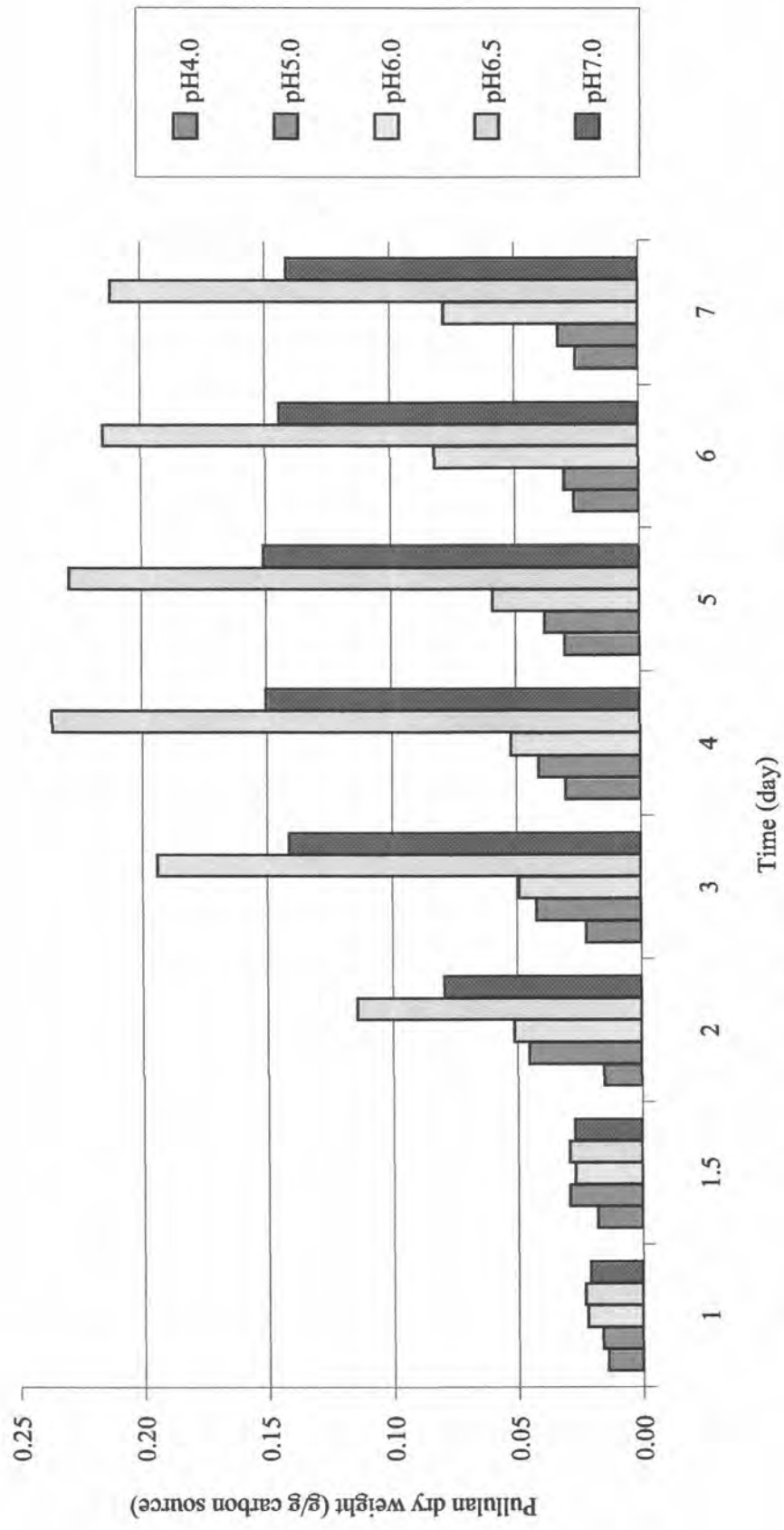
pH	ปริมาณน้ำตาล (มก./100 มล.)	
	สายพันธุ์ NRRL 6992	สายพันธุ์ ATCC 42023
4.0	9.00	10.50
5.0	12.00	12.00
6.0	17.63	12.00
6.5	14.63	13.88
7.0	11.63	17.25



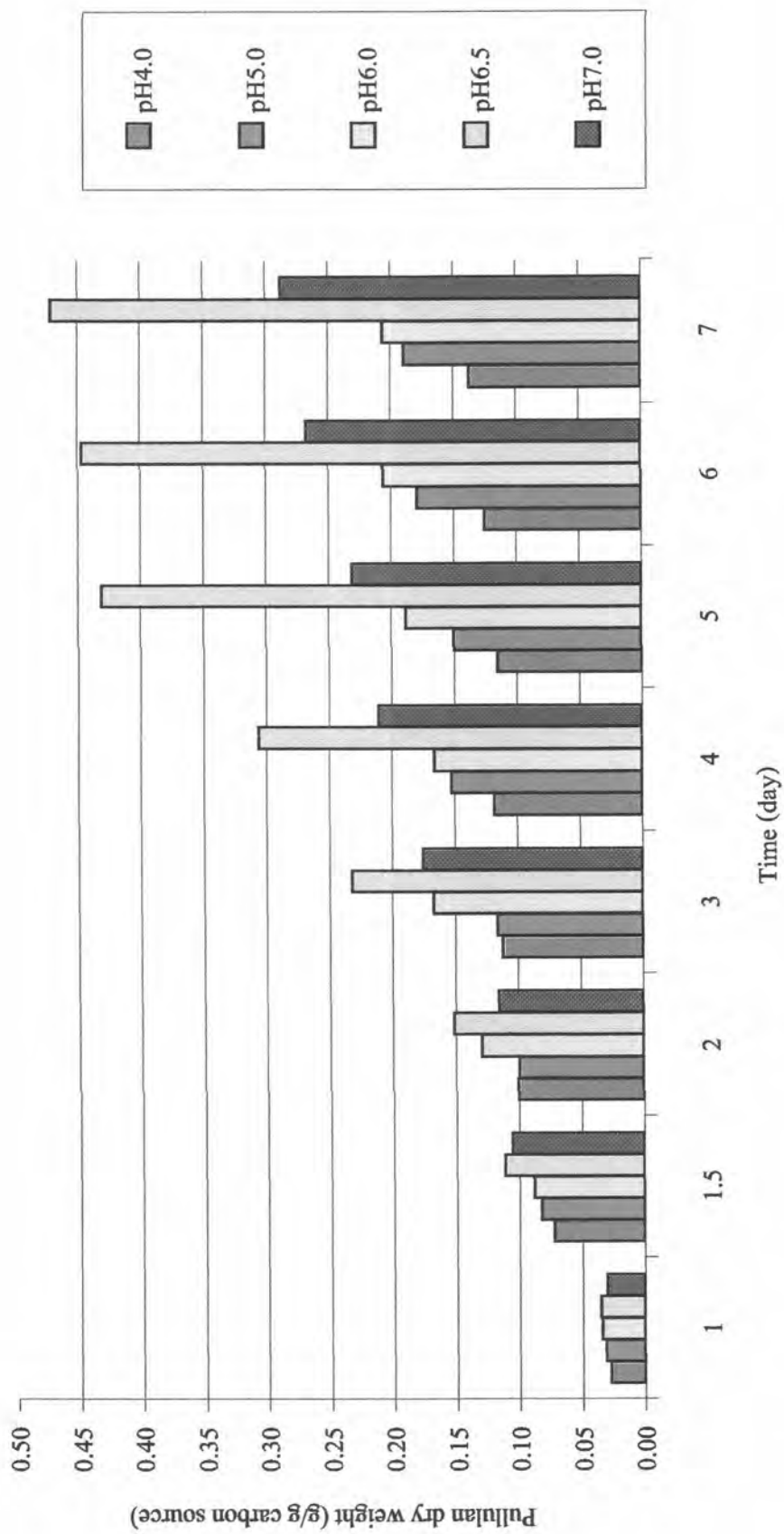
รูปที่ 15 ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992



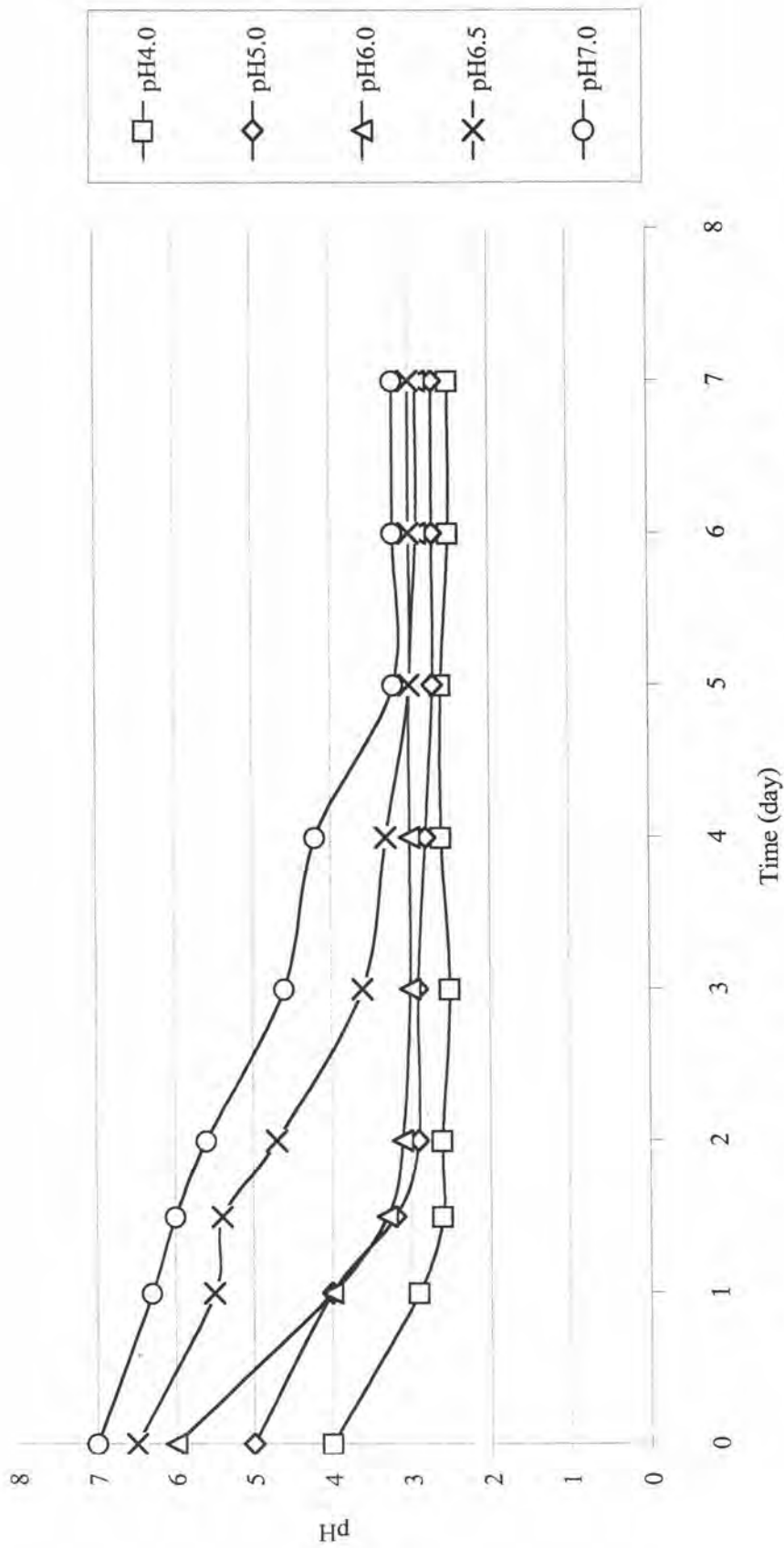
รูปที่ 16 ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023



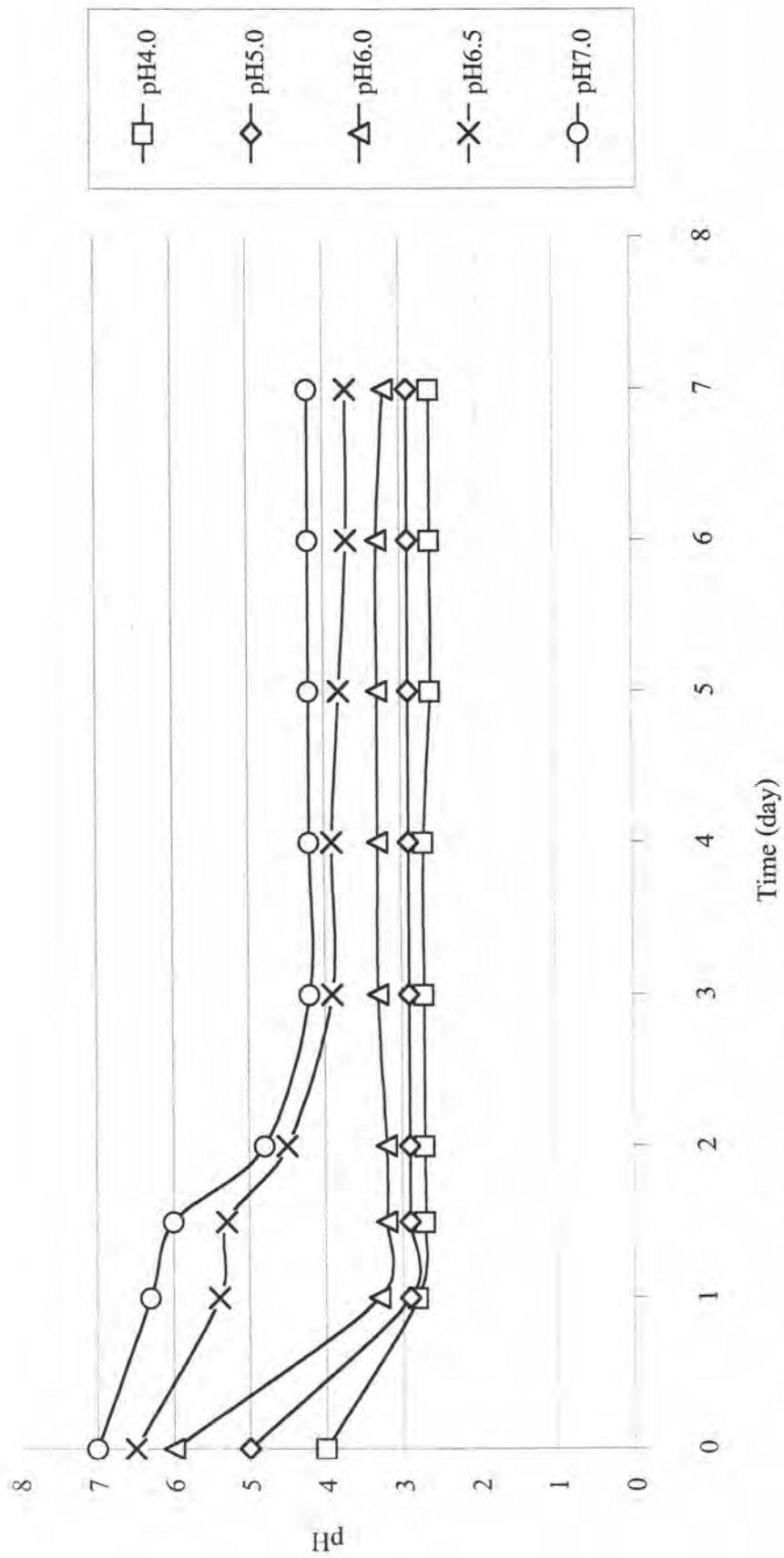
รูปที่ 17 ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพุลูลานของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992



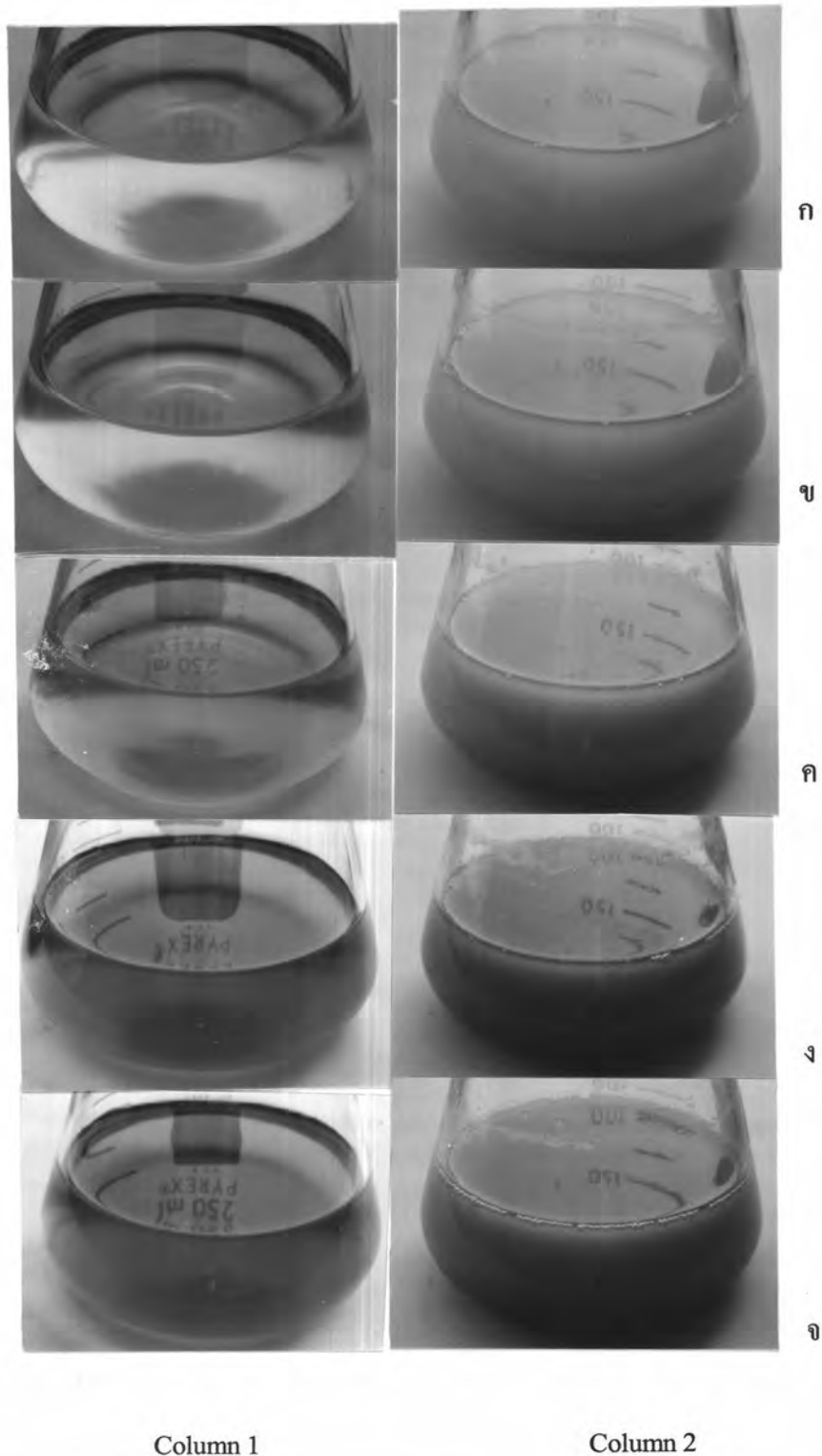
รูปที่ 18 ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพุลูลานของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023



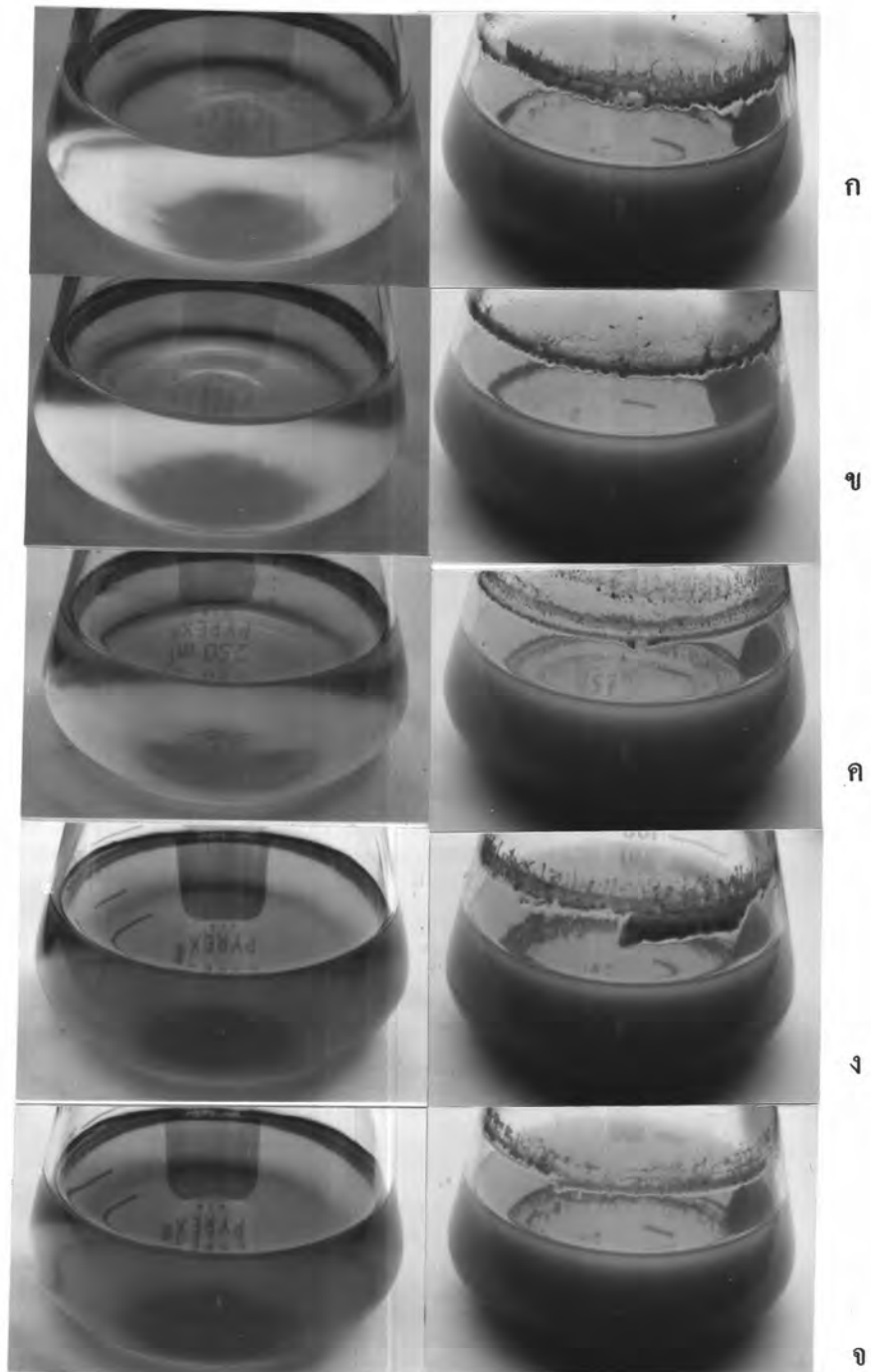
รูปที่ 19 ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุดเลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 ด้วยระดับ pH เริ่มต้นต่าง ๆ



รูปที่ 20 ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุดดูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 ด้วยระดับ pH เริ่มต้นต่าง ๆ



รูปที่ 21 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุดดูเลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 ที่ pH เริ่มต้นระดับต่าง ๆ
 ก. pH 4.0 ข. pH 5.0 ค. pH 6.0 ง. pH 6.5 จ. pH 7.0
 Column 1. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 0 วัน Column 2. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน



Column 1

Column 2

รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุดดูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์

ATCC 42023 ที่ pH เริ่มต้นระดับต่าง ๆ

ก. pH 4.0 ข. pH 5.0 ค. pH 6.0 ง. pH 6.5 จ. pH 7.0

Column 1. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 0 วัน Column 2. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน

2.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ

จากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 1 ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีระดับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 แล้วบ่มเชื้อในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยศึกษาอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ 3 ระดับ คือ 25 30 และ 35°C เป็นเวลานาน 7 วัน พบว่า สายพันธุ์ของ *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการตอบสนองต่อระดับอุณหภูมิต่างๆ ในการเจริญเติบโต และการผลิตพอลิแลนอย่างมีนัยสำคัญ โดยในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ NRRL 6992 เมื่อได้รับอุณหภูมิต่างๆ จะให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 4.105 มก./มล. และผลผลิตในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยสูงสุด 0.145 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ในขณะที่สายพันธุ์ ATCC 42023 จะให้น้ำหนักเซลล์ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยสูงสุด 3.382 มก./มล. และผลผลิตเฉลี่ยสูงสุด 0.314 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ระดับของอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตพอลิแลนของทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ โดยในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ ที่ระดับอุณหภูมิที่ 25°C ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 4.860 มก./มล. และต่ำสุดที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เฉลี่ย 1.718 มก./มล. และที่ระดับอุณหภูมิ 30°C ให้ผลผลิตสูงสุดเฉลี่ย 0.341 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดที่ระดับอุณหภูมิเริ่มต้น 35°C เฉลี่ย 0.043 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังตารางที่ 5 และ 6

เชื้อราสายพันธุ์ NRRL 6992 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 30°C ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย 6.080 มก./มล. และต่ำสุดในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เฉลี่ย 0.026 มก./มล. และให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 30°C เฉลี่ย 0.236 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดที่ระดับอุณหภูมิที่ 35°C เฉลี่ย 0.047 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 23 และ 25 เชื้อราสายพันธุ์ ATCC 42023 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย 3.730 มก./มล. และต่ำสุดที่ระดับอุณหภูมิเริ่มต้น 35°C ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย 3.190 มก./มล. และให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อที่ระดับอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 30°C เฉลี่ย 0.471 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เฉลี่ย 0.040 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 24 และ 26 สำหรับการเปลี่ยนแปลงของระดับ pH ในระหว่างการบ่มเชื้อ พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับอุณหภูมิเริ่มต้นแต่ละระดับมีระดับ pH ลดลงจากเริ่มต้นเมื่อเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงของ pH ของสายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023 ใน วันที่ 7 อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 5.8 และ 3.5 ถึง 5.9 ตามลำดับ ดังรูปที่ 27 และ 28

ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 7 วันด้วยระดับอุณหภูมิของอาหารที่ 25 30 และ 35°C พบว่า สายพันธุ์ NRRL 6992 มีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 18.00 14.62 และ 1312.50 มก./100 มล. ตามลำดับและ 23.63 13.98 และ 1237.50 มก./100 มล. ตามลำดับ ในสายพันธุ์ ATCC 42023 ดังตาราง ที่ 7

อิทธิพลของระดับอุณหภูมิของอาหารทั้ง 3 ระดับต่อการเจริญเติบโตของทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงด้วยภาพถ่าย โดยสายพันธุ์ NRRL 6992 เมื่อเจริญเติบโตในระดับอุณหภูมิต่างๆ แล้วไม่พบการสร้างเม็ดสีเมลานินปะปนในอาหาร ดังรูปที่ 29 column 2 ก-ค แต่เชื่อมีการเจริญเติบโตน้อยมากเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C ดังรูปที่ 29 column 2 ค ในทางตรงกันข้ามสายพันธุ์ ATCC 42023 พบว่า มีการสร้างเม็ดสีเมลานินซึ่งมีสีเหลืองปะปนในอาหารระหว่างการเจริญเติบโต โดยการเกิดเม็ดสีเหลืองนี้เชื่อจะสร้างขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ในอาหารที่บ่มด้วยอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ ดังรูปที่ 30 column 2 ก-ค

ตารางที่ 5 ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023

Treatment	อายุ (วัน)								
	0	1	1.5	2	3	4	5	6	7
สายพันธุ์ Part 1 NRRL 6992	0.035	0.690 b	1.648	2.421 a	3.352 b	3.523 b	3.697 b	3.818 b	4.105 b
	0.035	1.352 a	1.623	1.830 b	2.058 a	2.660 a	3.017 a	3.172 Aa	3.382 a
อุณหภูมิ Part 2 25°C	0.035	1.495 a	2.480 a	3.293 a	3.895 a	4.068 a	4.425 a	4.705 a	4.860 a
	0.035	1.240 b	2.100 b	2.745 b	3.648 b	4.053 a	4.218 b	4.303 b	4.653 b
	0.035	0.328 c	0.326 c	0.339 c	0.573 c	1.155 b	1.428 c	1.478 c	1.718 c
CV (%)	1.55	3.70	4.61	5.74	2.86	2.00	2.77	3.29	3.48
Part 1	NS	**	NS	**	**	**	**	**	**
Part 2	NS	**	**	**	**	**	**	**	**

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

* = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ

CV (Coefficient of Variation) คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรผัน

Part 1 เปรียบเทียบผลผลิตของ 2 สายพันธุ์ โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจากระดับอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ

Part 2 เปรียบเทียบผลผลิตของระดับอุณหภูมิ 3 ระดับ โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจาก 2 สายพันธุ์

ตารางที่ 6 ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการผลิตพอลิแลคเตน (ก./ก. ของแห้งคาร์บอน) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023

Treatment	อายุ (วัน)							
	1	1.5	2	3	4	5	6	7
สายพันธุ์								
Part 1								
NRRL 6992	0.020 b	0.026 b	0.069 b	0.118 b	0.139 b	0.145 b	0.138 b	0.135 b
ATCC 42023	0.031 a	0.066 a	0.093 a	0.160 a	0.207 a	0.275 a	0.302 a	0.314 a
อุณหภูมิ								
Part 2								
25°C	0.029 a	0.070 a	0.132 a	0.213 a	0.270 a	0.330 a	0.330 a	0.341 a
30°C	0.027 b	0.047 b	0.091 b	0.162 b	0.213 b	0.262 b	0.288 b	0.288 b
35°C	0.020 c	0.021 c	0.020 c	0.023 c	0.036 c	0.040 c	0.042 c	0.043 c
CV (%)	5.19	5.17	5.50	2.99	4.70	5.44	2.20	1.62
Part 1	**	**	**	**	**	**	**	**
Part 2	**	**	**	**	**	**	**	**

** = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

* = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ตัวเลขต่างกันในแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติ

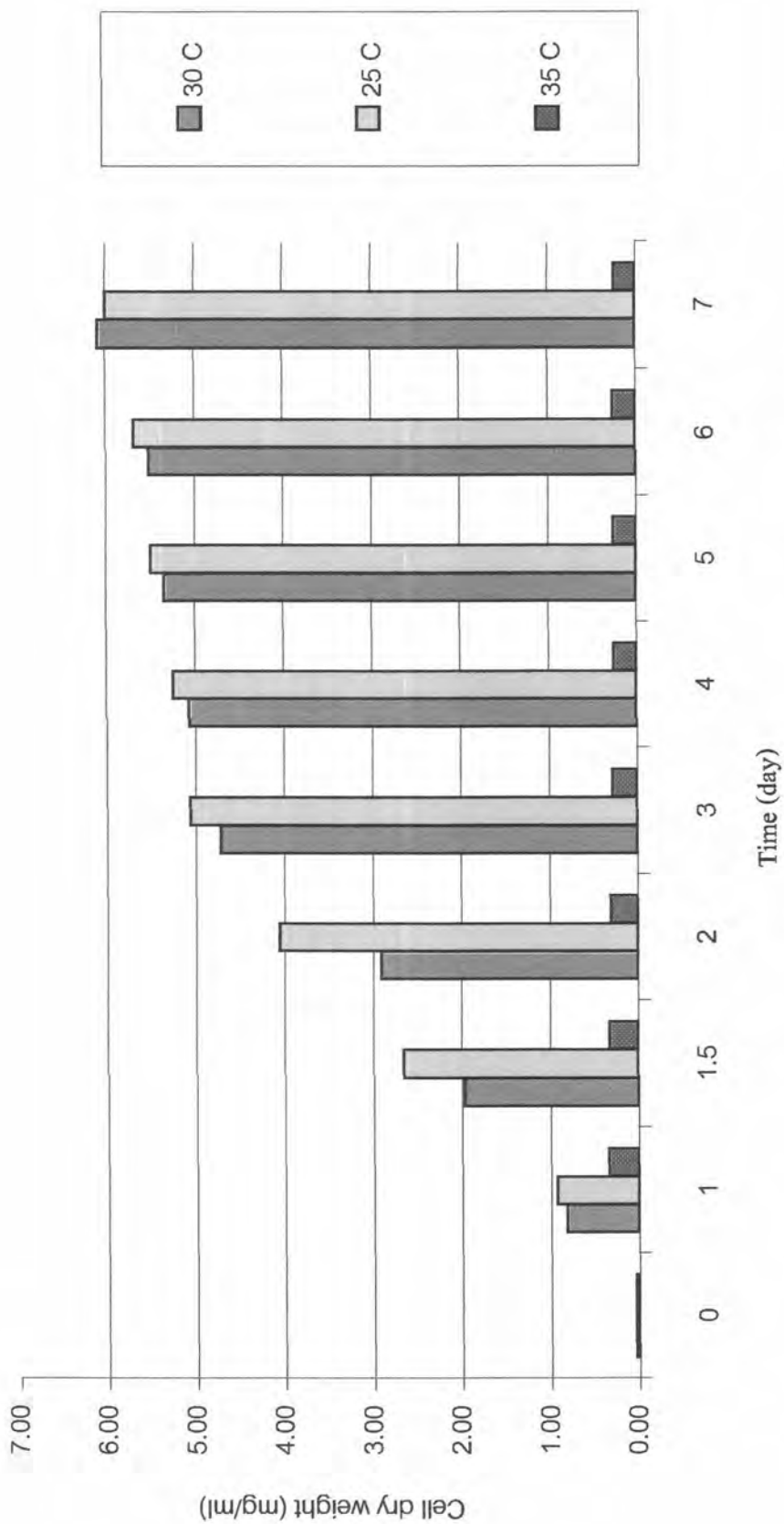
CV (Coefficient of Variation) คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน

Part 1 เปรียบเทียบผลผลิตของ 2 สายพันธุ์ โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจากระดับอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ

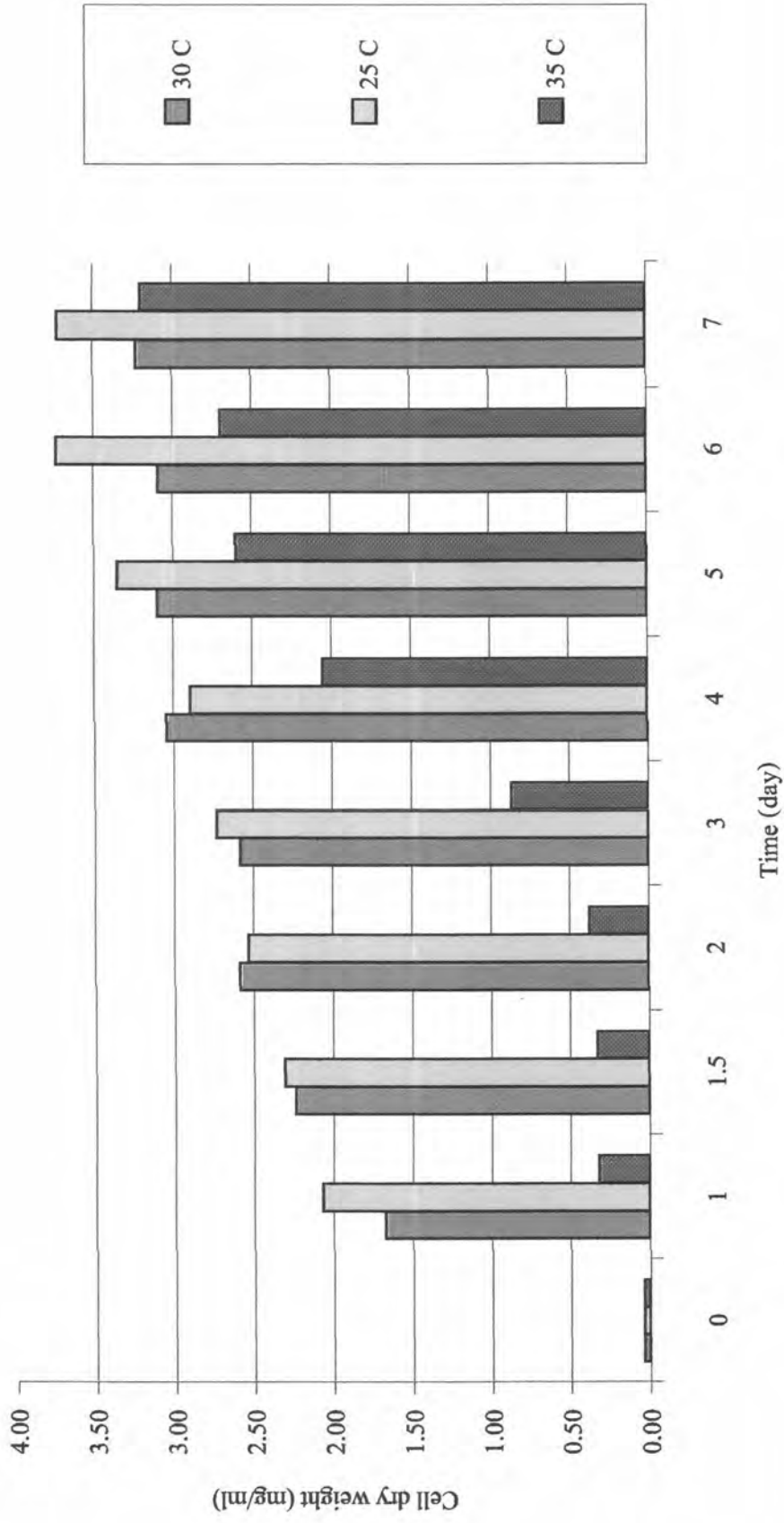
Part 2 เปรียบเทียบผลผลิตของระดับอุณหภูมิ 3 ระดับ โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจาก 2 สายพันธุ์

ตารางที่ 7 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก./100 มล.) ในวันที่ 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* ด้วยอุณหภูมิในการบ่มระดับต่างๆ

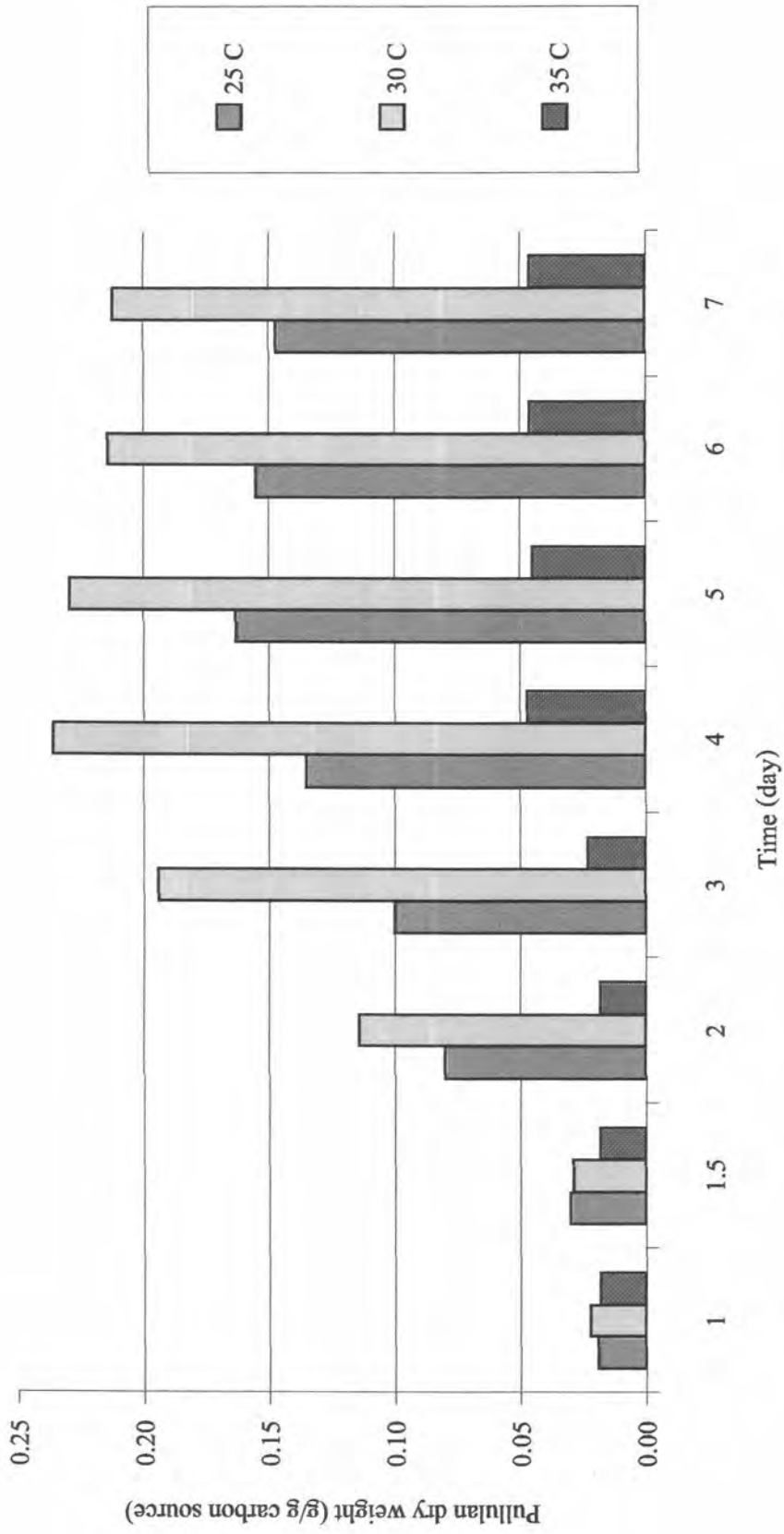
อุณหภูมิ	ปริมาณน้ำตาล (มก./100 มล.)	
	สายพันธุ์ NRRL 6992	สายพันธุ์ ATCC 42023
25°C	18.00	23.63
30°C	14.63	13.88
35°C	132.50	1237.50



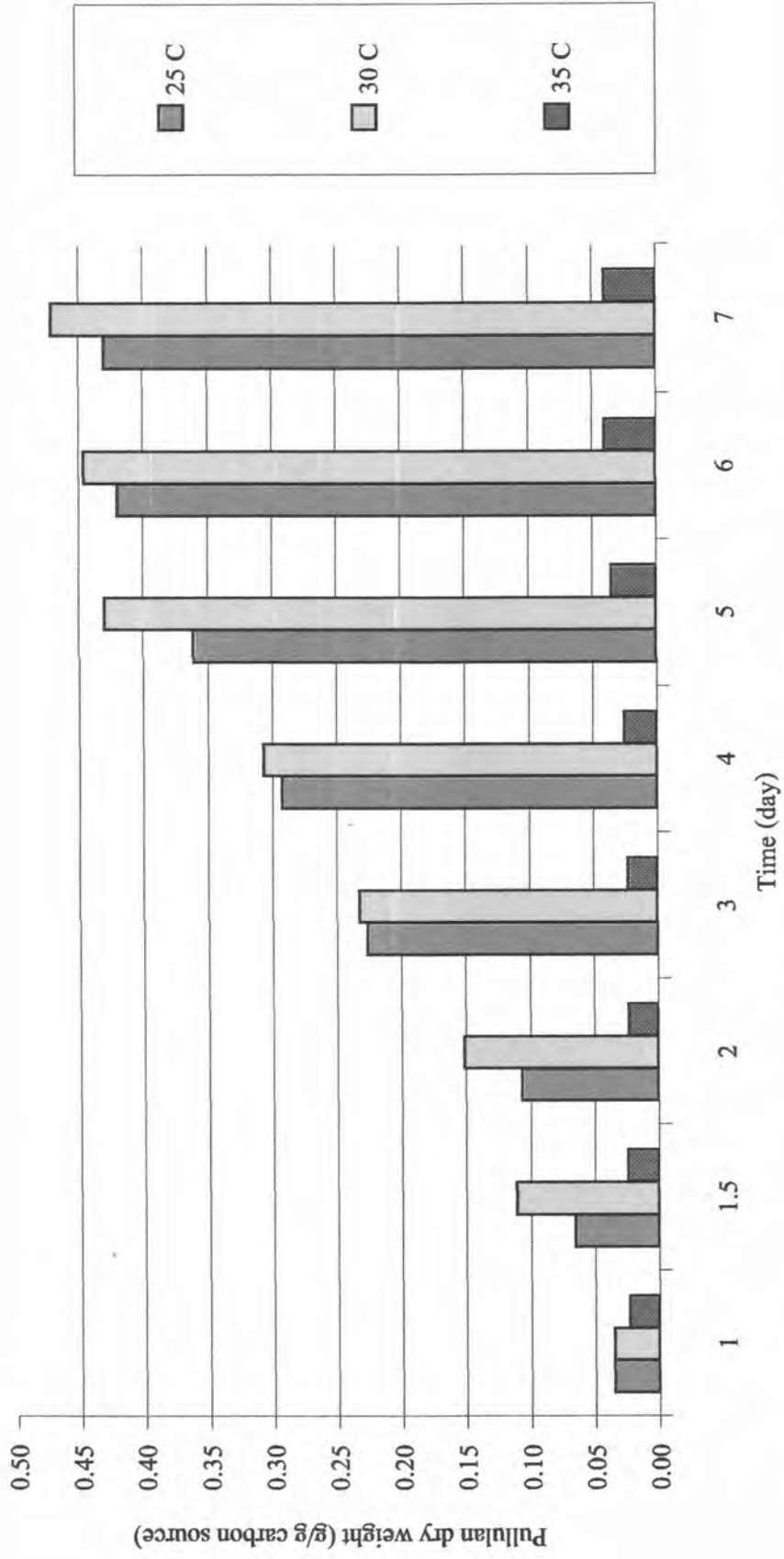
รูปที่ 23 ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. pululans* สายพันธุ์ NRRL 6992



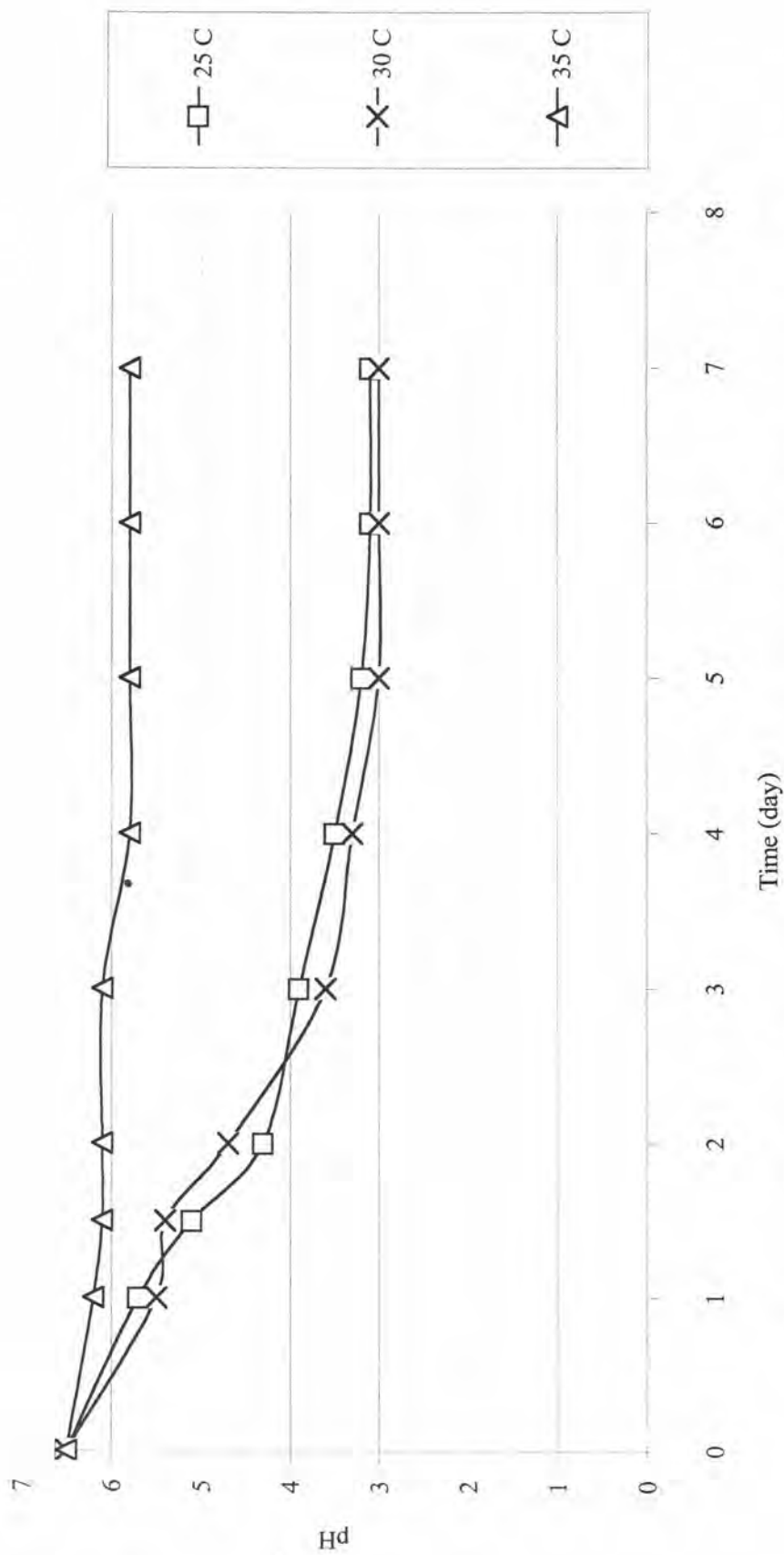
รูปที่ 24 ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเพื่อต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023



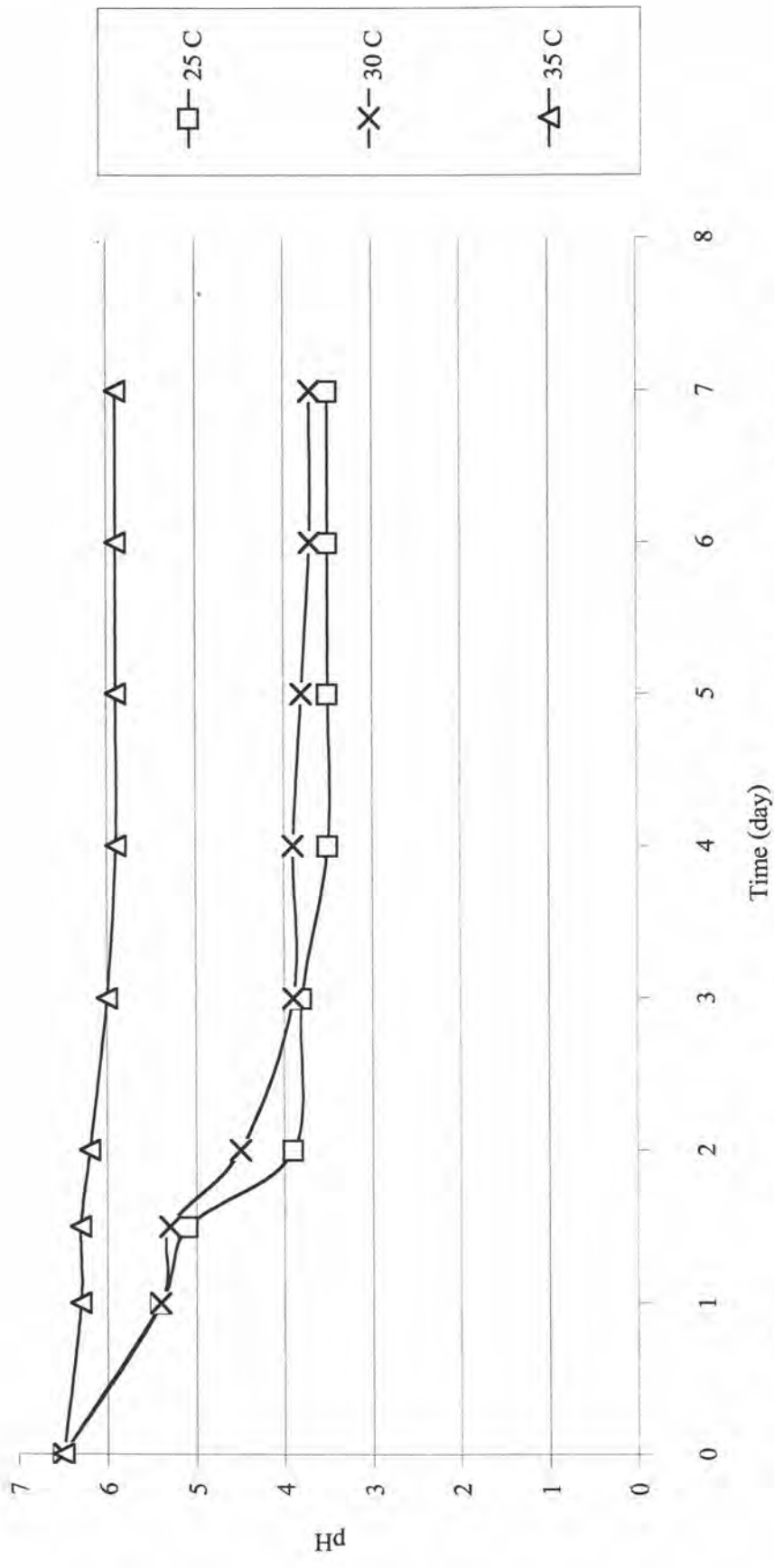
รูปที่ 25 ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการผลิตพุลูลานของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992



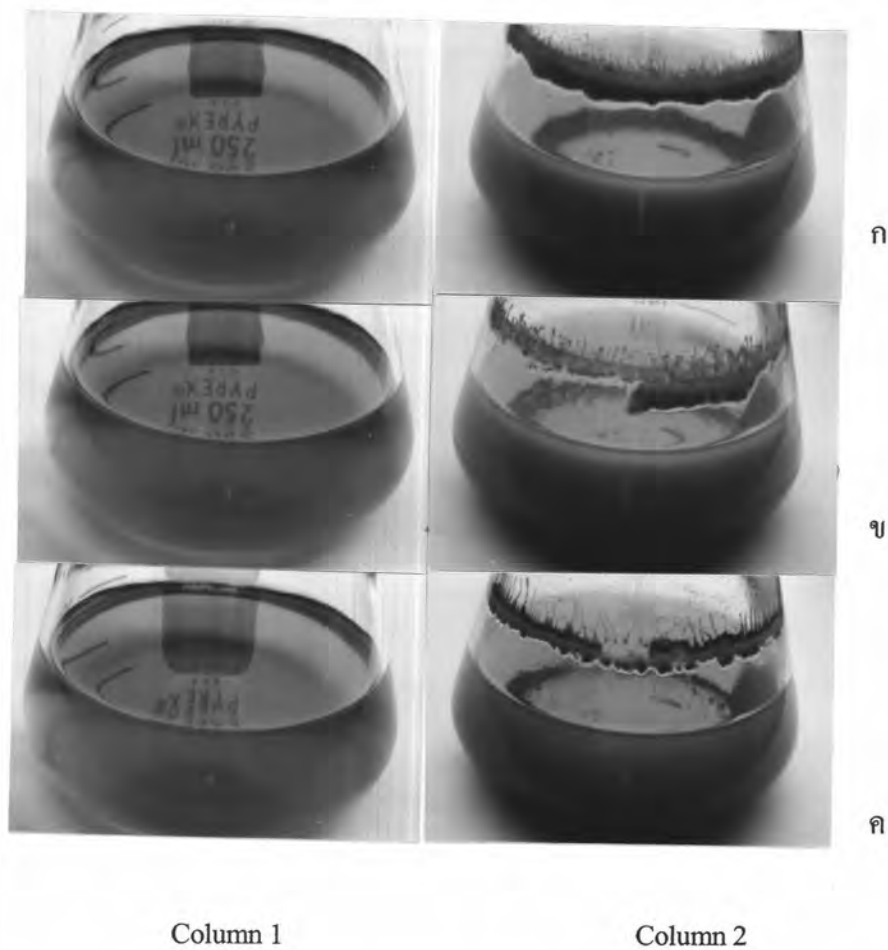
รูปที่ 26 ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการผลิตพุลลูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023



รูปที่ 27 ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุลูลานของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 ในอุณหภูมิระดับต่าง ๆ



รูปที่ 28 ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุดดูเลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 ในอุณหภูมิระดับต่าง ๆ



รูปที่ 30 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุดดูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์

ATCC 42023 ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

ก. 25°C

ข. 30°C

ค. 35°C

Column 1. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 0 วัน

Column 2. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน

2.3 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 2 แต่เปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งคาร์บอน โดยศึกษาแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส และ มอลโตส พบว่า สายพันธุ์ของ *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการตอบสนองต่อชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ในการเจริญเติบโต และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญ โดยในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ สายพันธุ์ NRRL 6992 เมื่อได้รับแหล่งคาร์บอนต่างๆ จะให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 5.810 มก./มล. และผลผลิตในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยสูงสุด 0.213 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ในขณะที่สายพันธุ์ ATCC 42023 จะให้น้ำหนักเซลล์ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยสูงสุด 4.807 มก./มล. และผลผลิตเฉลี่ยสูงสุด 0.465 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ โดยในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อด้วยซูโครส ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 6.108 มก./มล. และต่ำสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยมอลโตสเฉลี่ย 5.165 มก./มล. และเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยซูโครสให้ผลผลิตในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยสูงสุด 0.408 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงด้วย มอลโตสให้ผลผลิตเฉลี่ย 0.245 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังตารางที่ 8 และ 9

เชื้อราสายพันธุ์ NRRL 6992 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อด้วยกลูโคสให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย 6.080 มก./มล. และต่ำสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยมอลโตสเฉลี่ย 5.435 มก./มล. และให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 5 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยซูโครสเฉลี่ย 0.310 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยมอลโตสเฉลี่ย 0.109 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 31 และ 33 เชื้อราสายพันธุ์ ATCC 42023 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยมอลโตสให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย 4.895 มก./มล. และต่ำสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยกลูโคสเฉลี่ย 3.225 มก./มล. และให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยซูโครสเฉลี่ย 0.525 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดในวันที่ 6 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยมอลโตสเฉลี่ย 0.402 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 32 และ 34 ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH ในระหว่างการบ่มเชื้อด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดมีระดับของ pH ลดลงจากเริ่มต้นเมื่อเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงของ pH ของสายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023 ในวันที่ 7 อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 3.2 และ 3.5 ถึง 3.9 ตามลำดับ ดังรูปที่ 35 และ 36

ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 7 วันด้วยแหล่งคาร์บอน 3 ชนิดคือ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และ มอลโตส พบว่าสายพันธุ์ NRRL 6992 มีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 14.63 210.00 และ 130.00 มก./100 มล. ตามลำดับ และ 13.88 70.00 และ 80.00 มก./100 มล. ตามลำดับ ในสายพันธุ์ ATCC 42023 ดังตารางที่ 10

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน ทั้ง 3 ชนิดต่อการเจริญเติบโตของทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงด้วยภาพถ่าย สายพันธุ์ NRRL 6992 เมื่อเจริญเติบโตในแหล่งคาร์บอนต่างๆ แล้วไม่พบการสร้างเม็ดสีเมลานินปะปน ในอาหารดั่งรูปที่ 37 column 2 ก-ค ในทางตรงกันข้ามสายพันธุ์ ATCC 42023 พบว่า มีการสร้างเม็ดสี เมลานินซึ่งมีสีเหลืองปะปนในอาหารระหว่างการเจริญเติบโต โดยการเกิดเม็ดสีเหลืองนี้เชื่อจะสร้างขึ้น พร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ในแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด ดั่งรูปที่ 38 column 2 ก-ค

ตารางที่ 8 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023

Treatment	อายุ (วัน)								
	0	1	1.5	2	3	4	5	6	7
สายพันธุ์									
Part 1	0.035	0.767 b	1.892 b	2.898 b	3.957 a	4.655 a	4.958 a	5.082 a	5.810 a
	0035	1.850 a	2.478 a	3.128 a	3.842 b	3.948 b	4.277 b	4.568 b	4.807 b
แหล่งคาร์บอน									
Part 2	0.035	1.240 b	2.100 b	2.745 b	3.648 b	4.053 b	4.218 c	4.303 c	4.653 c
	0.035	1.393 a	2.735 a	4.100 a	4.445 a	4.675 a	5.203 a	5.215 a	6.108 a
	0.035	1.293 b	1.720 c	2.195 c	3.605 b	4.178 b	4.433 b	4.958 b	5.165 b
CV (%)	1.44	5.90	6.76	5.29	5.85	4.44	3.20	3.73	3.87
Part 1	NS	**	**	**	**	**	**	**	**
Part 2	NS	**	**	**	**	**	**	**	**

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% CV (Coefficient of Variation) คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน

* = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% Part 1 เปรียบเทียบผลผลิตของ 2 สายพันธุ์โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจากแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ Part 2 เปรียบเทียบผลผลิตของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดโดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจาก 2 สายพันธุ์

ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 9 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพอลิฟอสเฟต (ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023

Treatment	อายุ (วัน)							
	1	1.5	2	3	4	5	6	7
สายพันธุ์								
Part 1								
NRRL 6992	0.020 b	0.024 b	0.110 b	0.155 b	0.205 b	1.064 b	1.046 b	0.986 b
ATCC 42023	0.032 a	0.094 a	0.115 a	0.236 a	0.316 a	2.058 a	2.259 a	2.327 a
แหล่งคาร์บอน								
Part 2								
Glucose	0.029 a	0.070 a	0.132 b	0.213 b	0.270 b	0.330 b	0.330 b	0.341 b
Sucrose	0.028 a	0.050 b	0.168 a	0.268 a	0.358 a	0.390 a	0.408 a	0.398 a
Maltose	0.021 b	0.048 c	0.038 c	0.106 c	0.154 c	0.216 c	0.252 c	0.252 c
CV (%)	5.48	4.05	4.39	4.24	2.94	2.39	1.50	1.26
Part 1	**	**	**	*	**	**	**	**
Part 2	**	**	**	**	**	**	**	**

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% CV (Coefficient of Variation) คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน

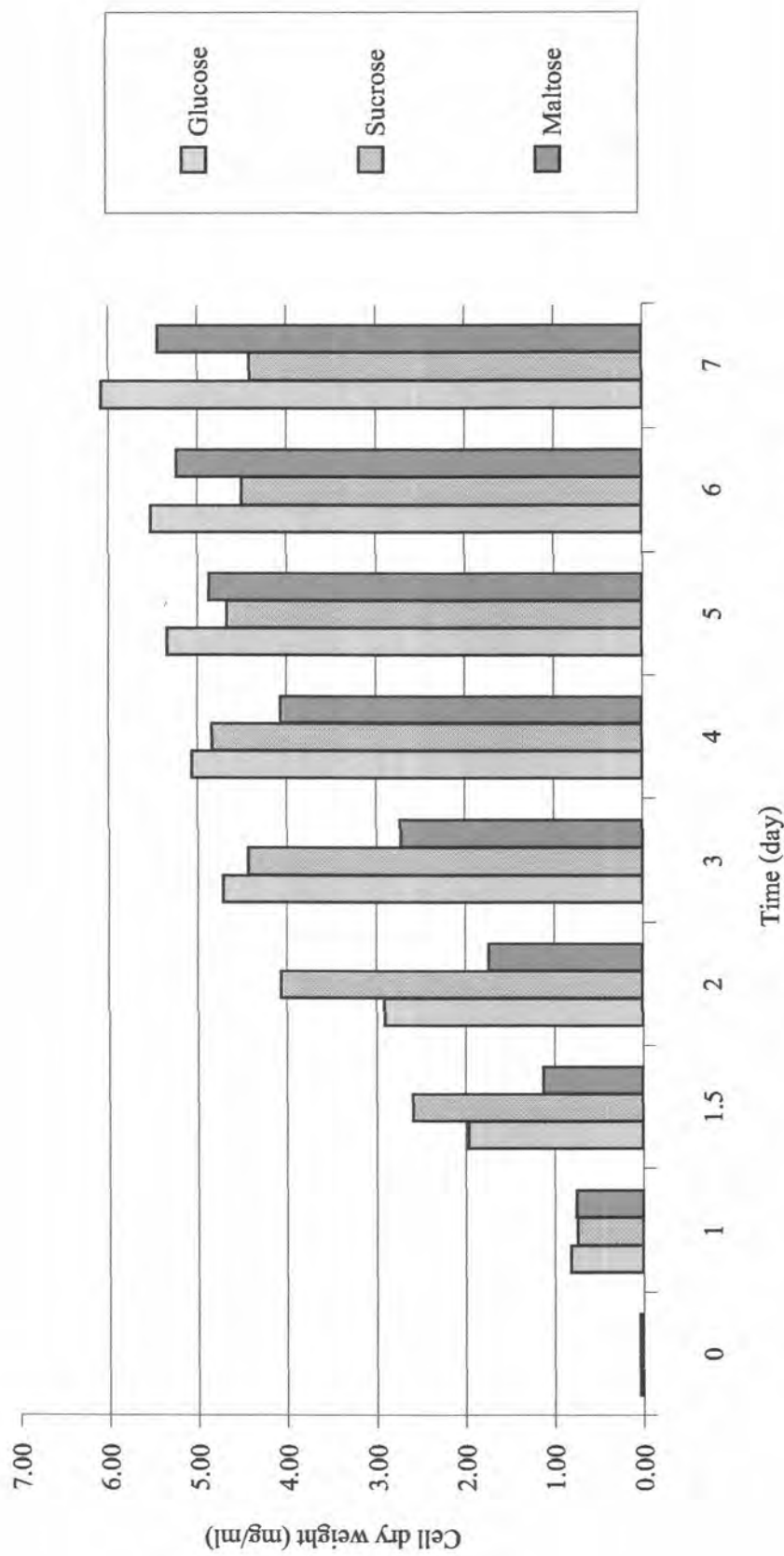
* = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% Part 1 เปรียบเทียบผลผลิตของ 2 สายพันธุ์ โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจากแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ Part 2 เปรียบเทียบผลผลิตของแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจาก 2 สายพันธุ์

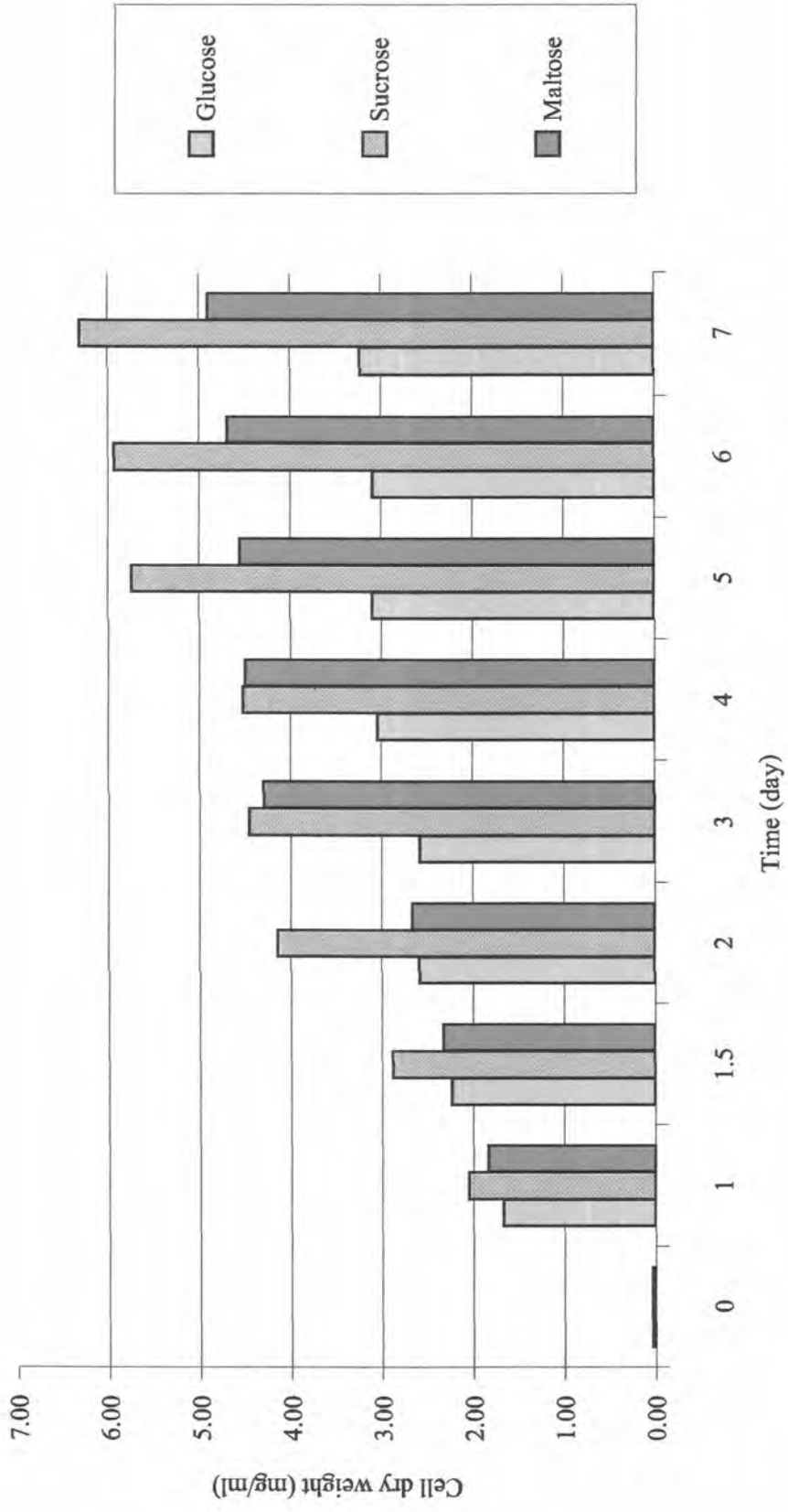
ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 10 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก./100 มล.) ในวันที่ 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* ด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

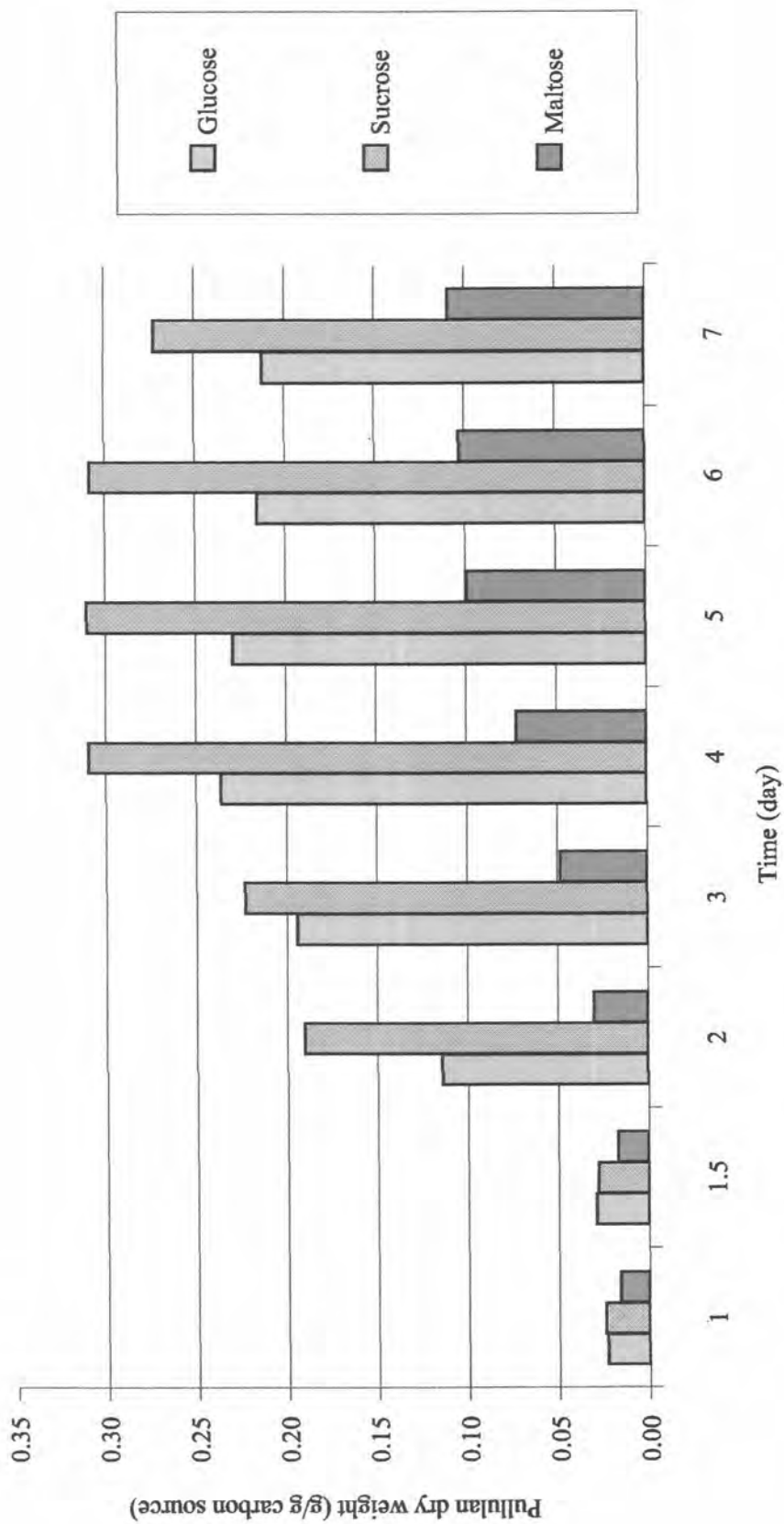
แหล่งคาร์บอน	ปริมาณน้ำตาล (มก./100 มล.)	
	สายพันธุ์ NRRL 6992	สายพันธุ์ ATCC 42023
glucose	14.63	13.88
sucrose	210.00	70.00
maltose	130.00	50.00



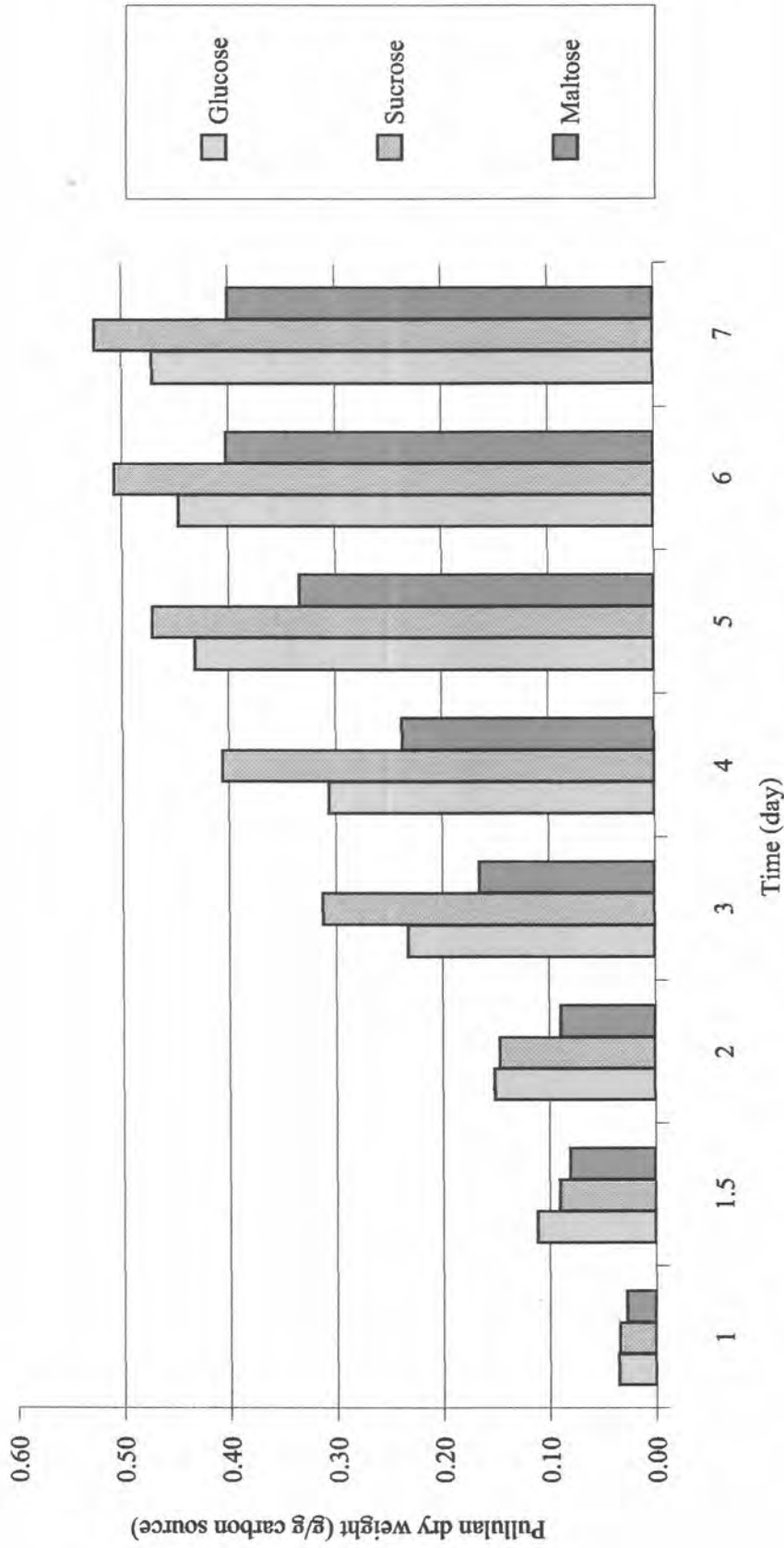
รูปที่ 31 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992



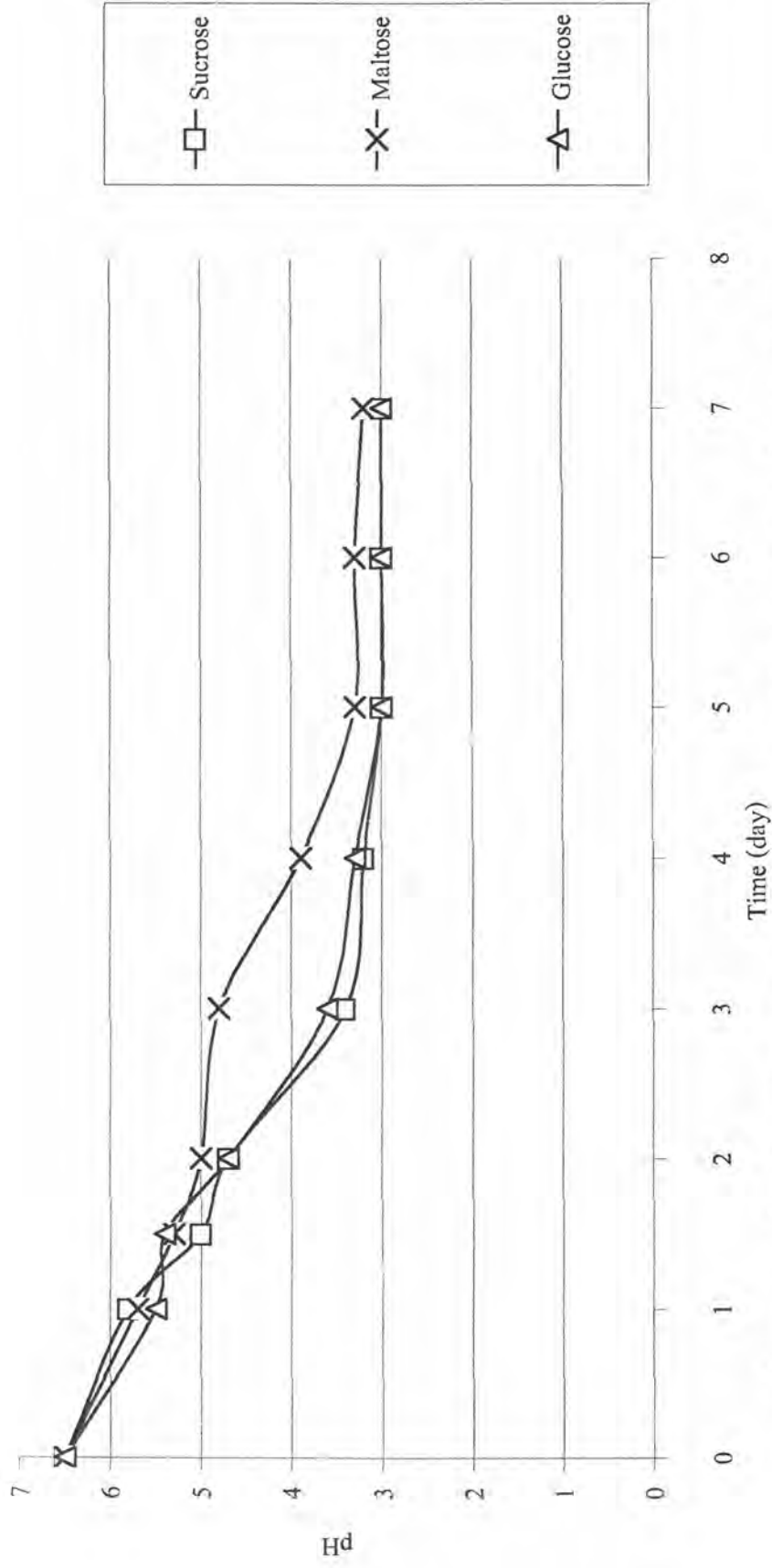
รูปที่ 32 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023



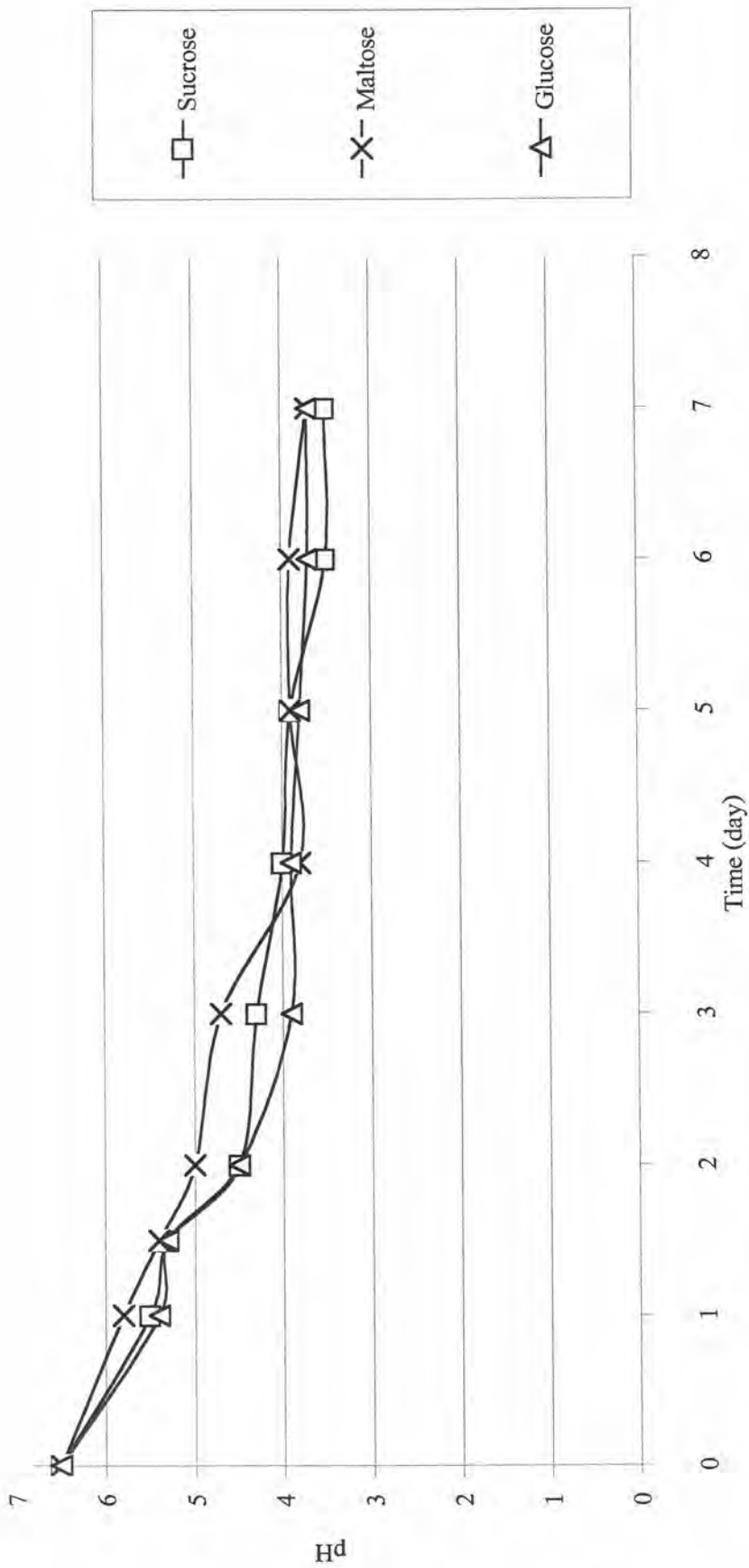
รูปที่ 33 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพุลลูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992



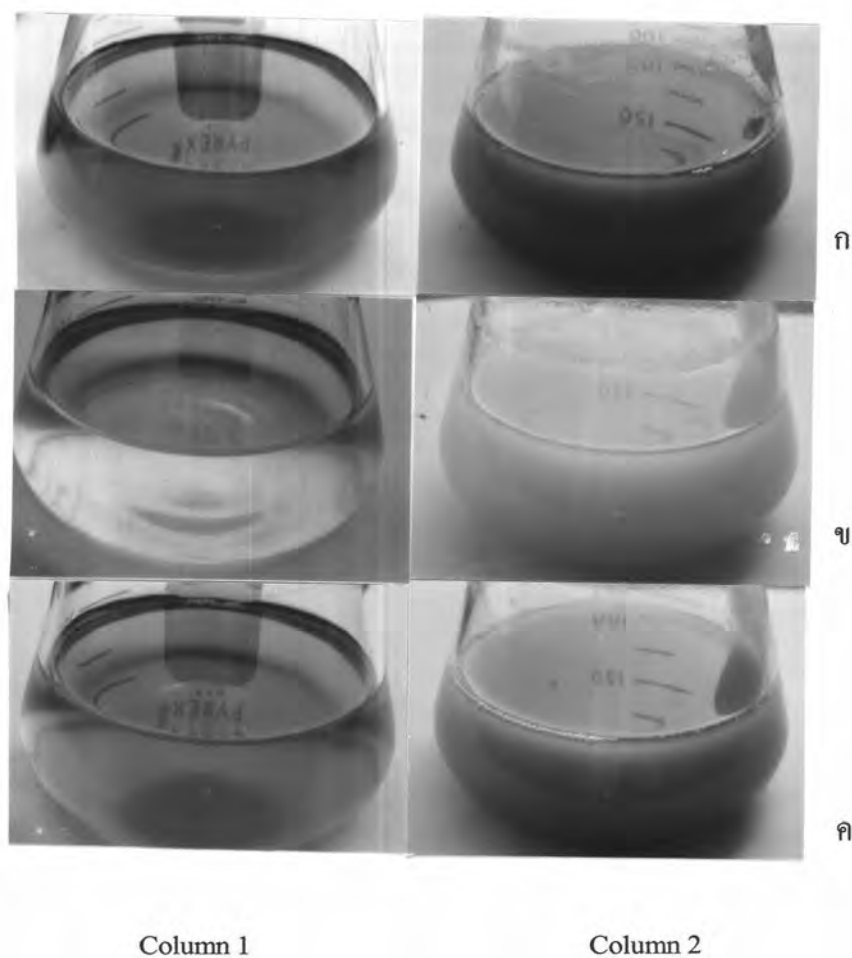
รูปที่ 34 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพุลลูลานของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023



รูปที่ 35 ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพอลิกลูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ



รูปที่ 36 ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตมูลของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC-42023 ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 37 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุดดูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 ด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

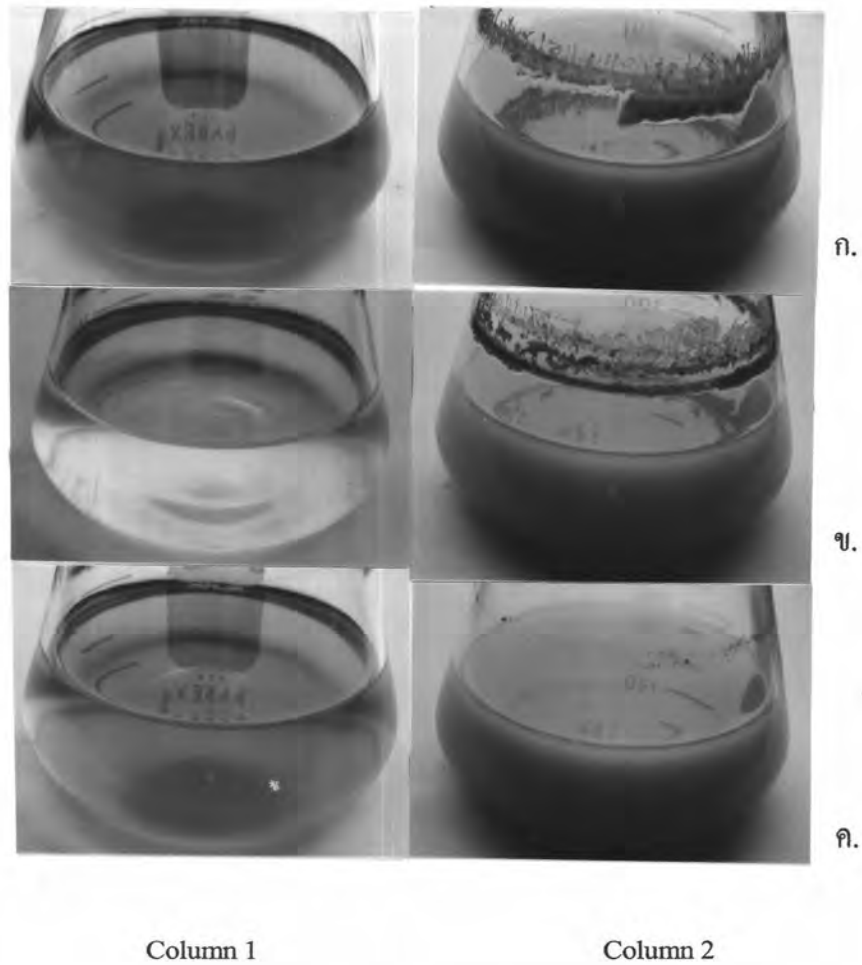
ก. glucose

ข. sucrose

ค. maltose

Column 1. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 0 วัน

Column 2. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน



รูปที่ 38 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุดเดนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 ด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

ก. glucose

ข. sucrose

ค. maltose

Column 1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ 0 วัน

Column 2. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน

2.4 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหาร และภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 3 แต่เปลี่ยนแปลงชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยศึกษาแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และเปปโตน พบว่า สายพันธุ์ของเชื้อ *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการตอบสนองต่อชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ในการเจริญเติบโต และการผลิตพอลิแลนอย่างมีนัยสำคัญ โดยในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ NRRL 6992 เมื่อได้รับแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 6.422 มก./มล. และผลผลิตในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยสูงสุด 0.246 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ในขณะที่สายพันธุ์ ATCC 42023 ให้น้ำหนักเซลล์ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยสูงสุด 6.647 มก./มล. และผลผลิตเฉลี่ยสูงสุด 0.346 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตพอลิแลนของทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ โดยในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมไนเตรท ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ยสูงสุด 6.985 มก./มล. และต่ำสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเฉลี่ย 6.108 มก./มล. และเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลผลิตในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อเฉลี่ยสูงสุด 0.408 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงด้วยเปปโตนให้ผลผลิตเฉลี่ย 0.208 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังตารางที่ 11 และ 12

เชื้อราสายพันธุ์ NRRL 6992 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมไนเตรท ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย 6.840 มก./มล. และต่ำสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเฉลี่ย 5.915 มก./มล. และให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 5 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเฉลี่ย 0.310 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดในวันที่ 5 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยเปปโตนเฉลี่ย 0.223 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 39 และ 41 เชื้อราสายพันธุ์ ATCC 42023 มีการเจริญเติบโตสูงสุดในวันที่ 6 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมไนเตรท ให้น้ำหนักเซลล์เฉลี่ย 7.165 มก./มล. และต่ำสุดในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเฉลี่ย 6.300 มก./มล. และให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 7 เมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเฉลี่ย 0.525 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน และต่ำสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยเปปโตนเฉลี่ย 0.205 ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน ดังรูปที่ 40 และ 42 ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH ในระหว่างการบ่มเชื้อด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดมีระดับ pH ลดลงจากเริ่มต้นเมื่อเวลาในการเลี้ยงนานขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงของ pH ของสายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023 ในวันที่ 7 อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 3.1 และ 3.5 ถึง 4.0 ตามลำดับ ดังรูปที่ 43 และ 44

ปริมาณน้ำตาลที่เหลือหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 7 วันด้วยแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิดคือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท และเปปโตน พบว่า สายพันธุ์ NRRL 6992 มีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 130.00 180.00 และ 60.00 มก./100 มล. ตามลำดับ และ 50.00 80.00 และ 100.00 มก./100 มล. ตามลำดับ ในสายพันธุ์ ATCC 42023 ดังตารางที่ 13

อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดต่อการเจริญเติบโตของทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงด้วยภาพถ่าย โดยสายพันธุ์ NRRL 6992 เมื่อเจริญเติบโตในแหล่งไนโตรเจนต่างๆ แล้วไม่พบการสร้างเม็ดสีเมลานินปะปนในอาหาร ดังรูปที่ 45 column 2 ก-ค ในทางตรงกันข้ามสายพันธุ์ ATCC 42023 พบว่า มีการสร้างเม็ดสีเมลานินซึ่งมีสีเหลืองหรือดำปะปนในอาหารระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ การเกิดเม็ดสีเหลือง หรือ สีดำนี้เชื้อจะสร้างขึ้นพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ดังรูปที่ 46 column 2 ก-ค ชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการให้เม็ดสีจากเชื้อต่างกัน เม็ดสีเมลานินจะสร้างเป็นสีเหลืองปะปนในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ ดังรูปที่ 46 column 2 ก และ ข ในขณะที่จะสร้างเม็ดสีดำในอาหารที่มีเปปโตนเป็นองค์ประกอบ ดังรูปที่ 46 column 2 ค

ตารางที่ 11 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023

Treatment	อายุ (วัน)								
	0	1	1.5	2	3	4	5	6	7
สายพันธุ์									
Part 1									
NRRL 6992	0.035	0.733 b	2.407 b	4.072 a	5.540 a	6.057 a	5.912 b	5.962 b	6.422 b
ATCC 42023	0.035	1.905 a	2.545 a	4.028 b	4.995 b	5.332 b	6.288 a	6.593 a	6.647 a
Part 2									
แหล่งไนโตรเจน									
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.035	1.393 a	2.735 a	4.100	4.445 c	4.675 c	5.203 c	5.215 c	6.108 c
NH ₄ NO ₃	0.035	1.335 a	2.373 b	3.965	5.418 b	5.828 b	6.758 a	6.933 a	6.985 a
peptone	0.035	1.230 b	2.320 b	4.085	5.940 a	6.580 a	6.340 b	6.685 b	6.510 b
CV (%)	1.48	4.82	4.26	5.65	4.66	3.76	4.36	2.53	2.98
Part 1	NS	**	**	**	**	**	**	**	*
Part 2	NS	**	**	NS	**	**	**	**	**

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% CV (Coefficient of Variation) คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรผัน

* = แตกต่างกันทางสถิติความเชื่อมั่น 95% Part 1 เปรียบเทียบผลผลิตของ 2 สายพันธุ์โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ Part 2 เปรียบเทียบผลผลิตของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดโดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจาก 2 สายพันธุ์

ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 12 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตพอลิแลน (ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน) ของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023

Treatment	อายุ (วัน)							
	1	1.5	2	3	4	5	6	7
สายพันธุ์								
Part 1								
NRRL 6992	0.021 b	0.027 b	0.118 b	0.195 b	0.246 b	0.244 b	0.244 b	0.230 b
ATCC 42023	0.028 a	0.092 a	0.150 a	0.216 a	0.285 a	0.335 a	0.335 a	0.346 a
แหล่งไนโตรเจน								
Part 2								
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.028 a	0.059 b	0.168 a	0.228 a	0.358 a	0.390 a	0.408 a	0.398 a
NH ₄ NO ₃	0.024 b	0.062 a	0.126 b	0.164 c	0.240 b	0.265 b	0.258 b	0.258 b
peptone	0.022 c	0.059 b	0.108 c	0.184 b	0.197 c	0.200 c	0.202 c	0.208 c
CV (%)	5.02	2.84	3.03	5.21	3.24	1.46	1.69	1.48
Part 1	**	**	**	*	**	**	**	**
Part 2	**	*	**	**	**	**	**	**

** = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% CV (Coefficient of Variation) คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรผัน

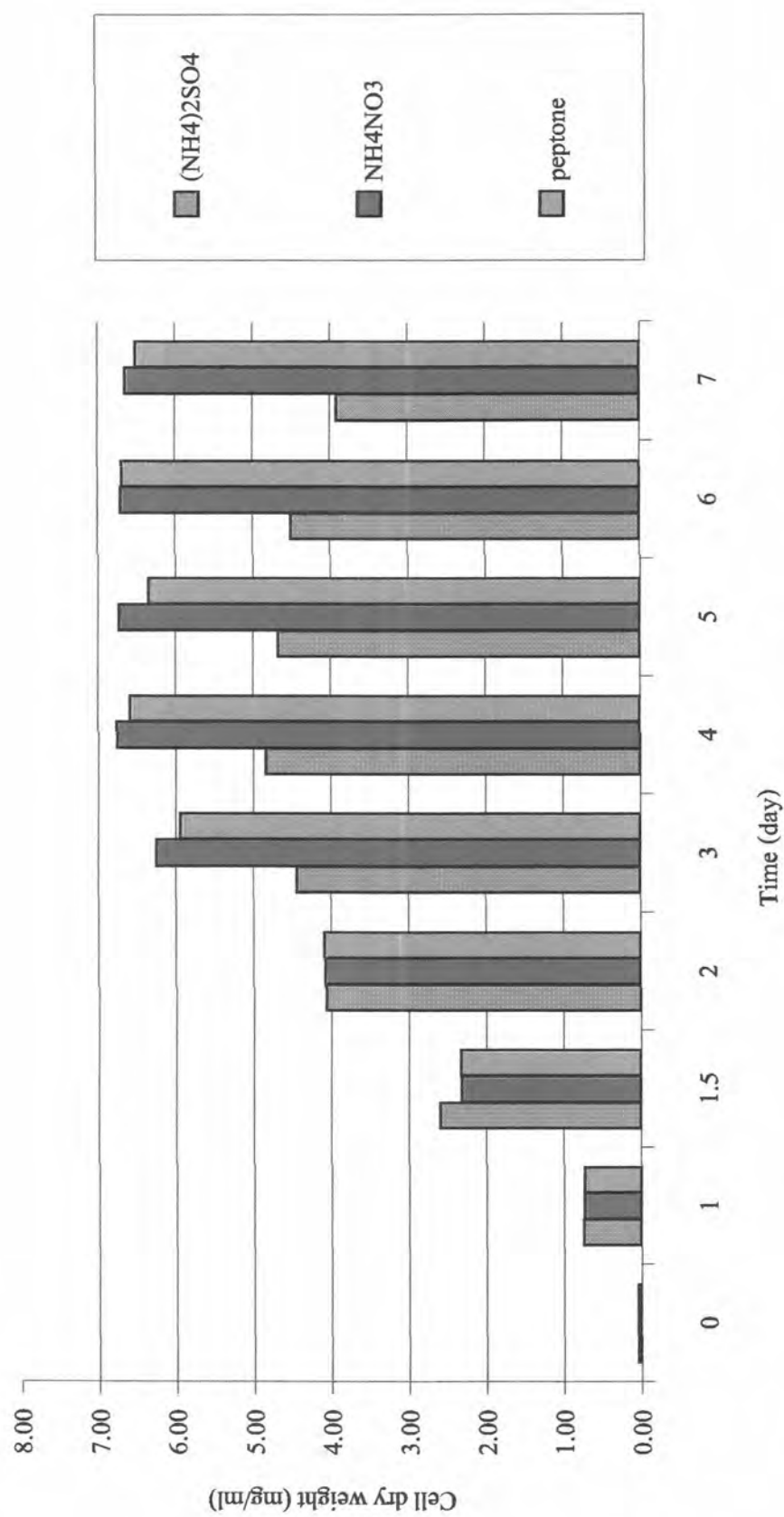
* = แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% Part 1 เปรียบเทียบผลผลิตของ 2 สายพันธุ์โดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด

NS = ไม่แตกต่างกันทางสถิติ Part 2 เปรียบเทียบผลผลิตของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดโดยแต่ละค่าเป็นค่าผลผลิตเฉลี่ยจาก 2 สายพันธุ์

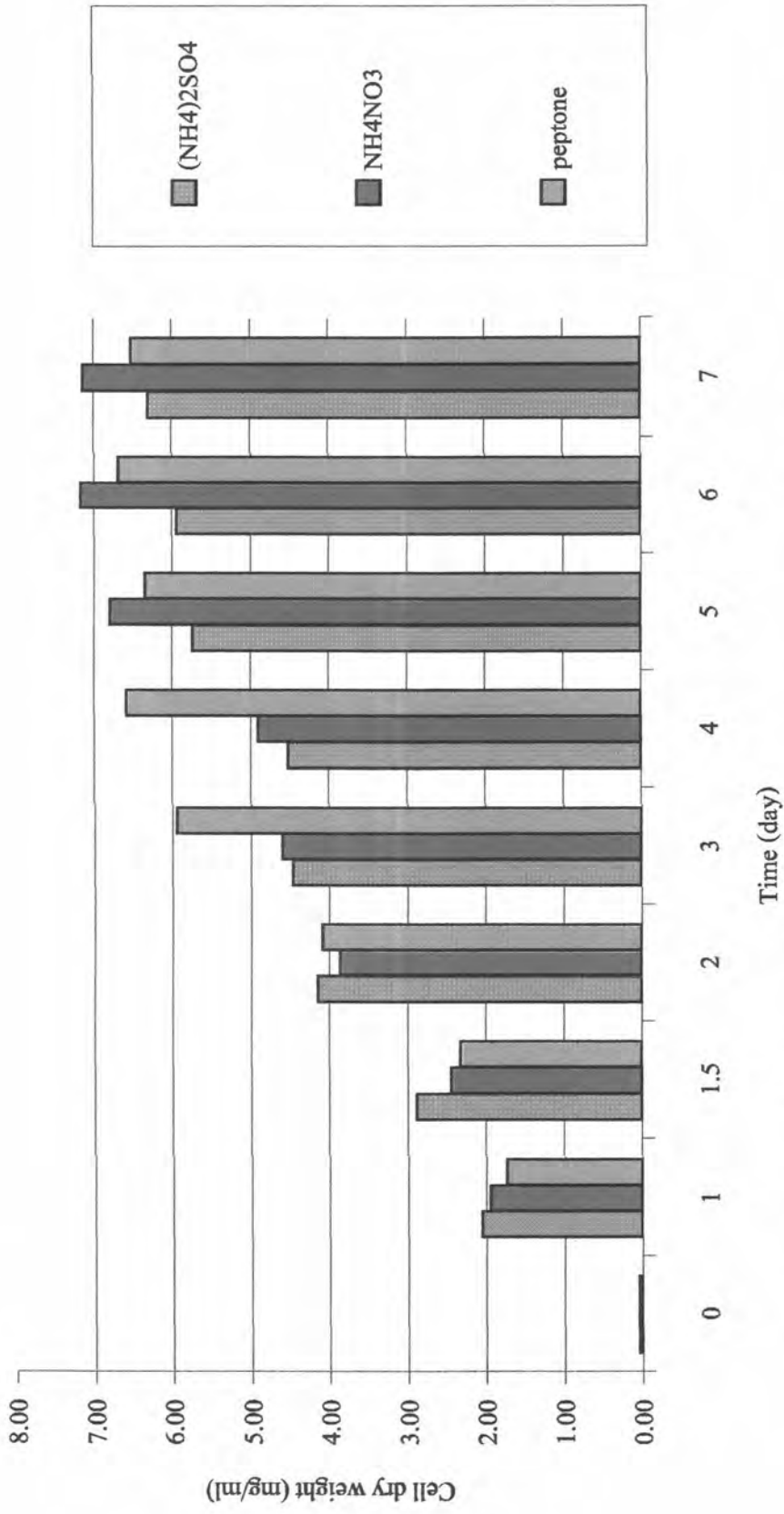
ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 13 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก./100 มล.) ในวันที่ 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อ *A. pullulans* ด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

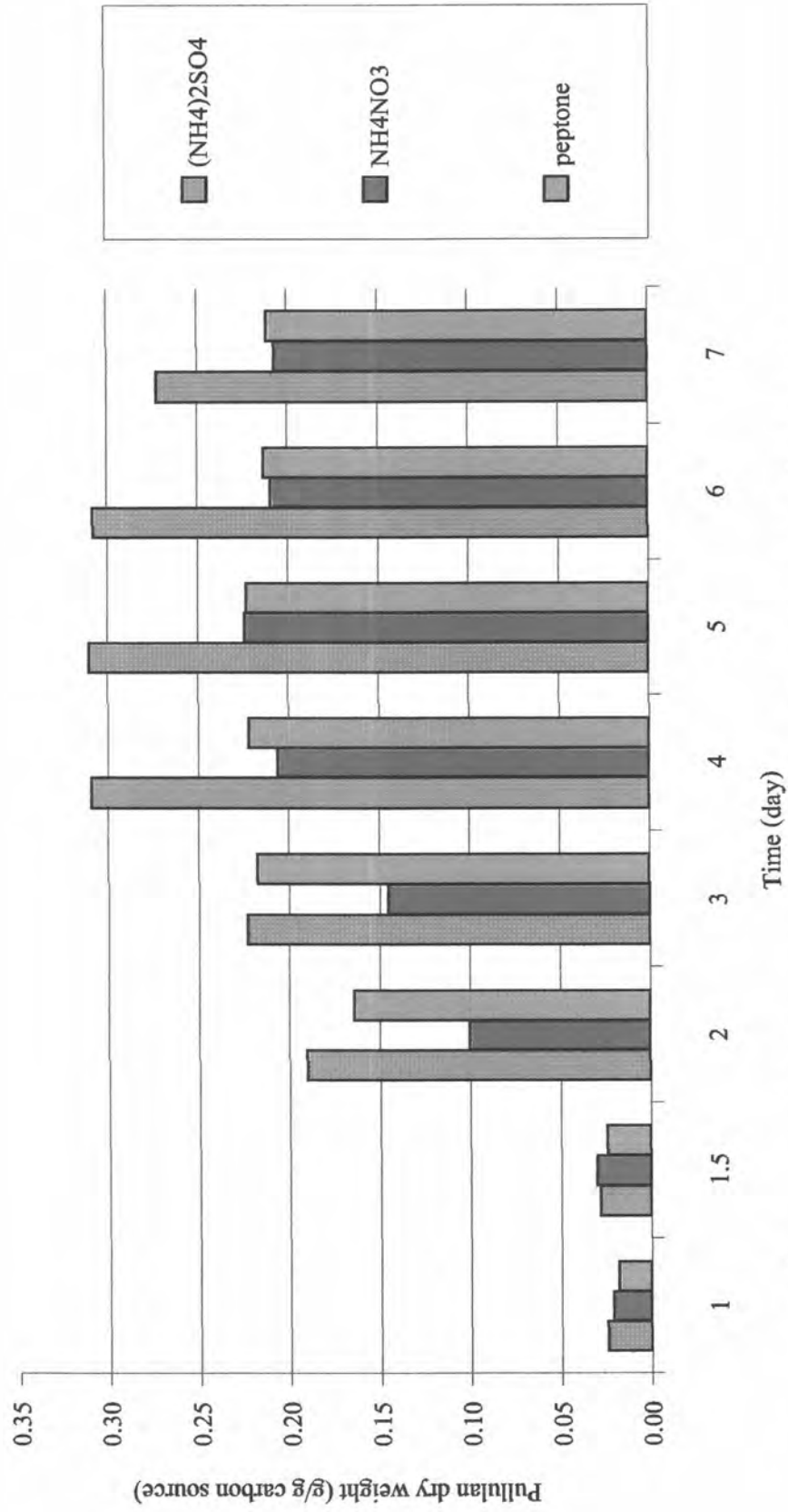
แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณน้ำตาล (มก./100 มล.)	
	สายพันธุ์ NRRL 6992	สายพันธุ์ ATCC 42023
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	130.00	50.00
NH_4NO_3	180.00	80.00
peptone	60.00	100.00



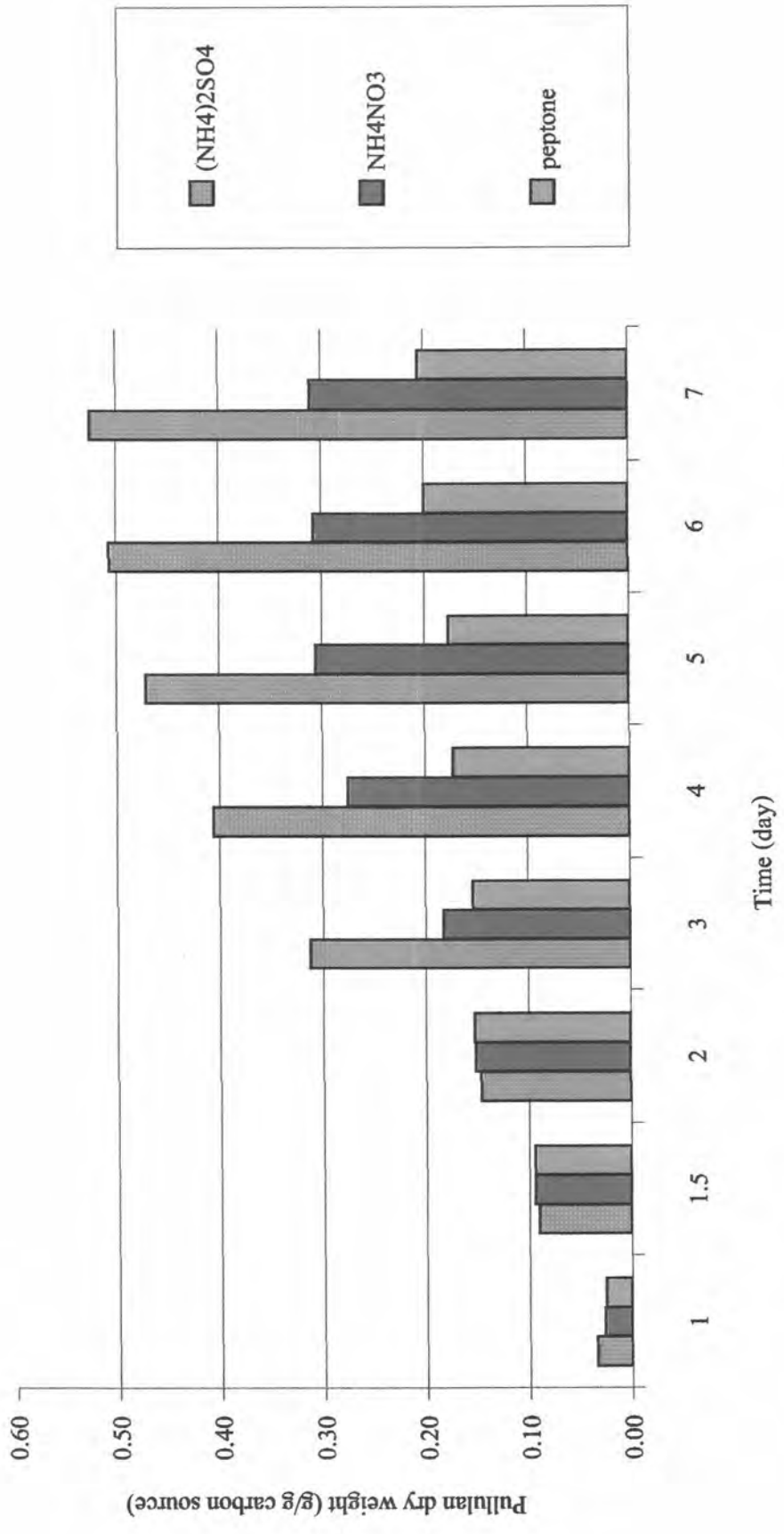
รูปที่ 39 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992



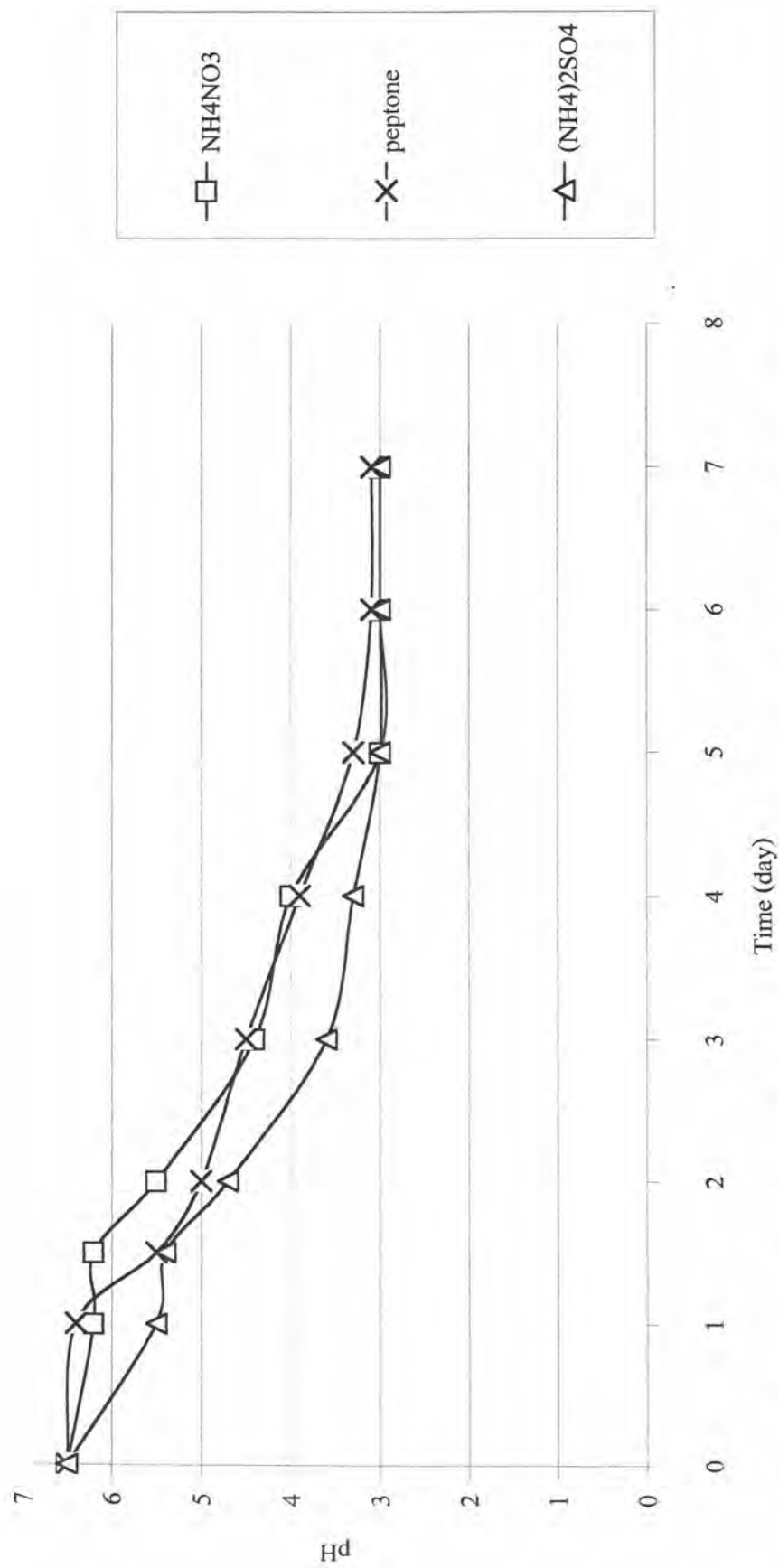
รูปที่ 40 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023



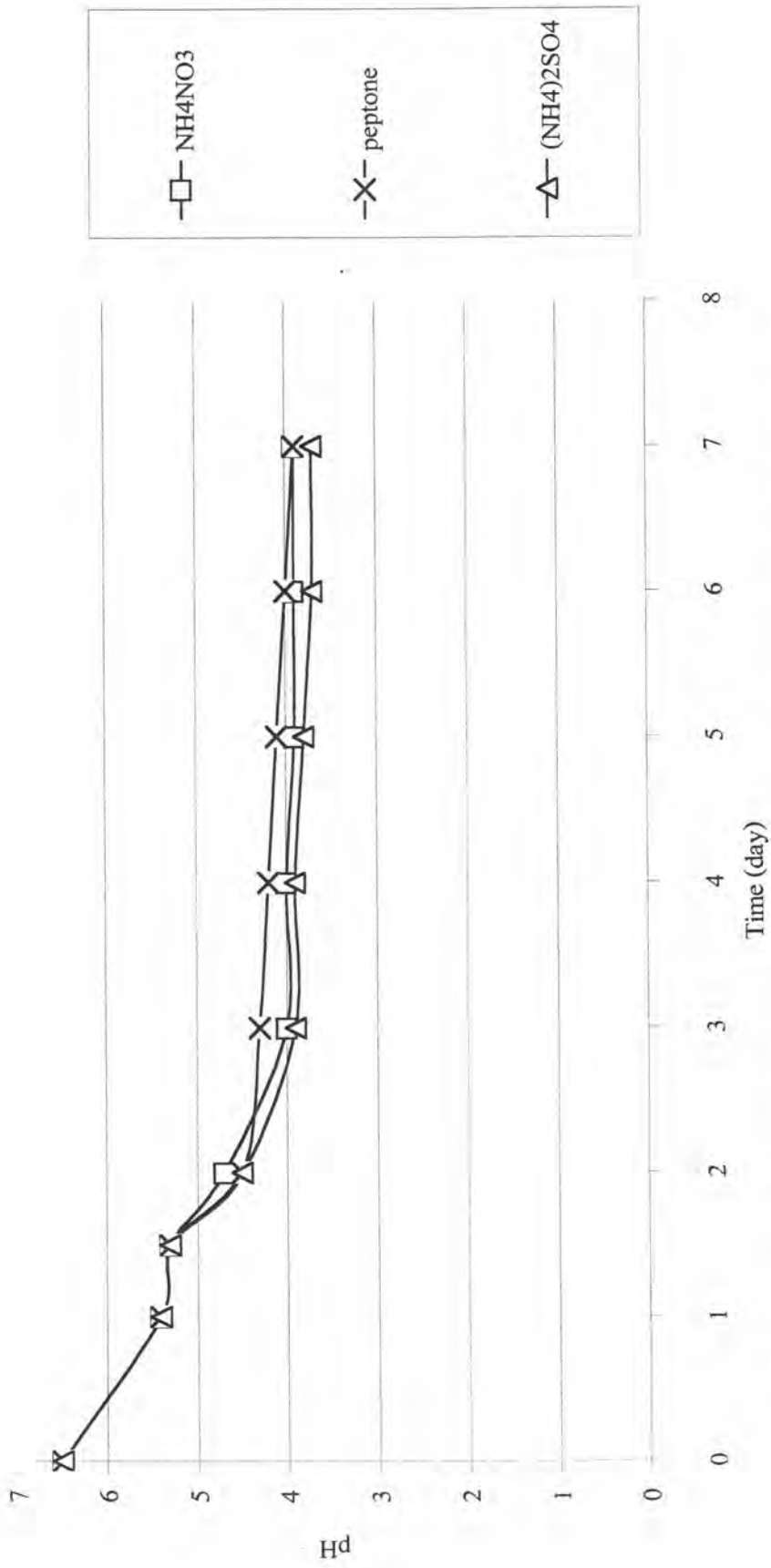
รูปที่ 41 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตพุลลูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992



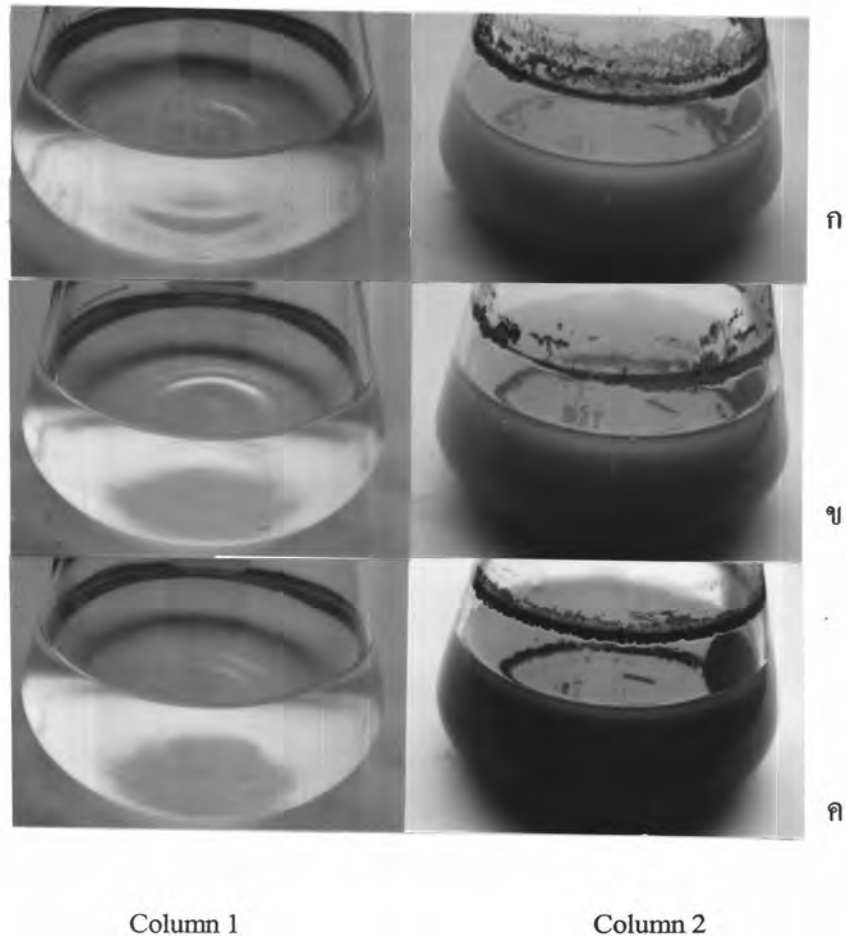
รูปที่ 42 ผลของแหล่งไนโตรเจน ต่อการผลิตของพุดดูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023



รูปที่ 43 ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุดูเลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 ในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ



รูปที่ 44 ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุดูแลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์ ATCC 42023 ในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 46 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุลูลเลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์

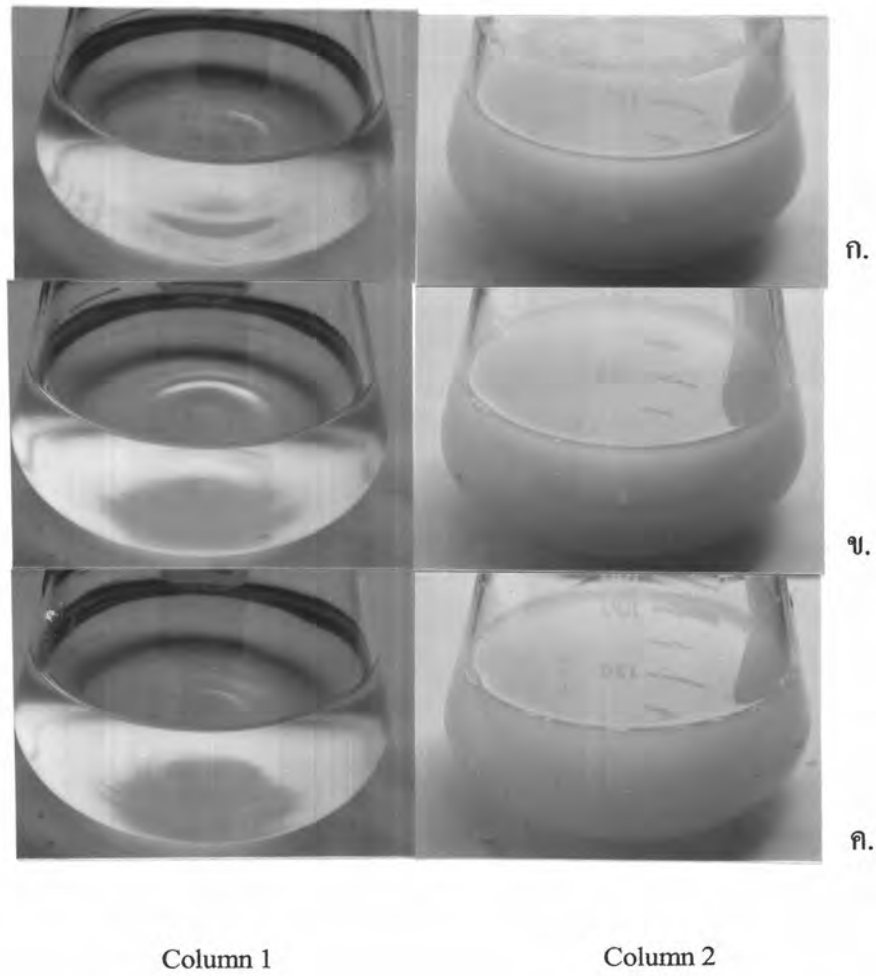
ATCC 42023 ด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

ก. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ข. NH_4NO_3

ค. peptone

Column 1. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 0 วัน

Column 2. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน



รูปที่ 45 การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุดดูเลนของ *A. pullulans* สายพันธุ์

NRRL 6992 ด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

ก. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ข. NH_4NO_3

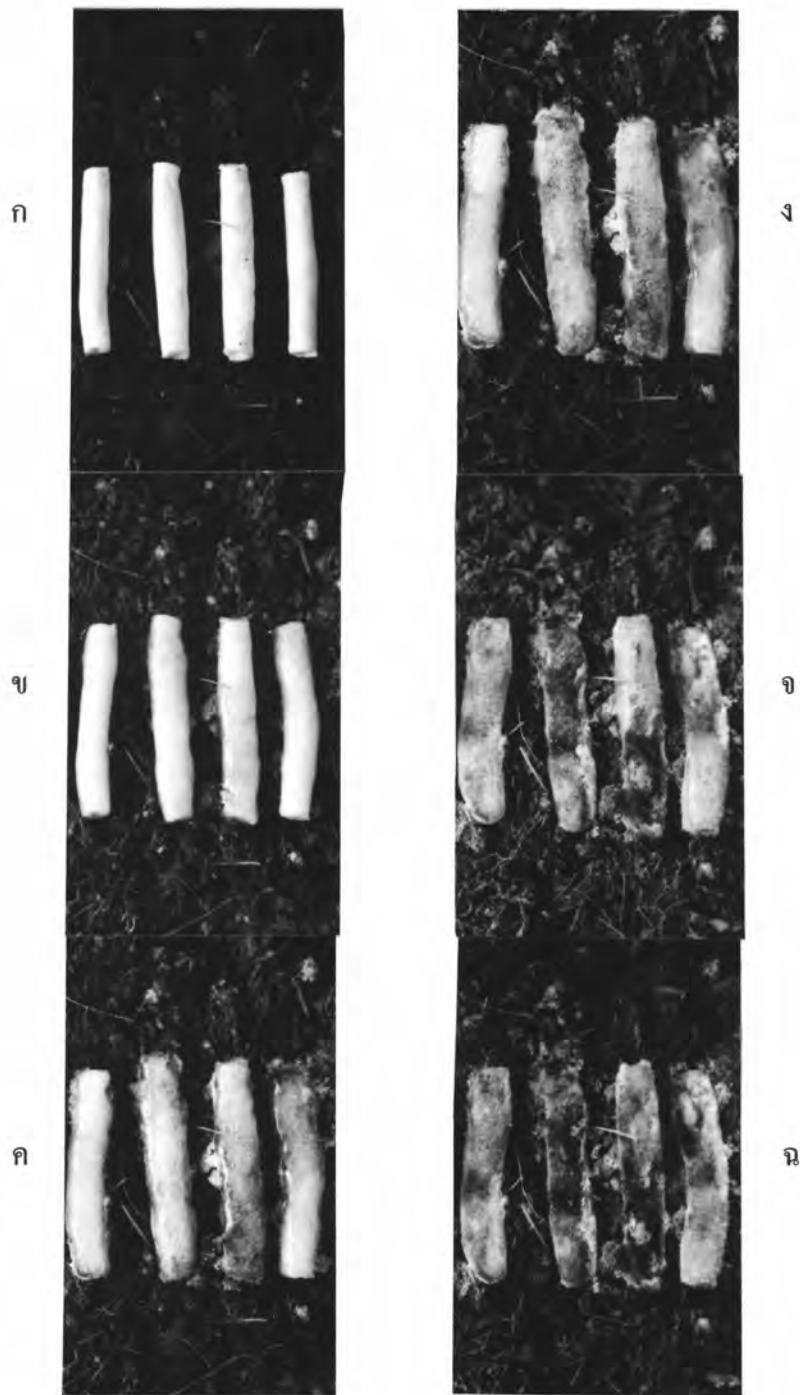
ค. peptone

Column 1. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 0 วัน

Column 2. อาหารเลี้ยงเชื้ออายุ 7 วัน

3. ผลการศึกษาการสลายตัวของพุลูลแลนในธรรมชาติ

เมื่อนำพุลูลแลนอัดแท่งอบแห้งที่ได้จาก *A. pullulans* ทั้ง 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ NRRL 6992 และสายพันธุ์ ATCC 42023 มาทดสอบการสลายตัวของบนผิวดิน พบว่า พุลูลแลนจากแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการสลายตัวของบนผิวดินต่างกัน โดยสายพันธุ์ ATCC 42023 ภายหลังจากวางบนดิน ดังรูปที่ 48 ก แท่งพุลูลแลนจะเริ่มดูดซับความชื้นจากผิวดินและเปลี่ยนสีจากสีขาวอมเทาไปเป็นสีเหลืองอมน้ำตาลในวันที่ 1 ดังรูป 48 ข ในวันที่ 3 พบว่า เส้นใยของเชื้อราจากบนผิวดิน และอากาศเริ่มขึ้นบนแท่งพุลูลแลน ดังรูปที่ 48 ค หลังจากนั้นเริ่มตั้งแต่วันที่ 5 เส้นใยของเชื้อรามีการเจริญเติบโตปกคลุมทั่วทั้งผิวแท่งพุลูลแลน และเกิดการย่อยสลายขึ้นตามลำดับ ดังรูปที่ 48 ง ถึง ฉ สำหรับแท่งพุลูลแลนจากสายพันธุ์ NRRL 6992 นั้น พบว่า ภายหลังจากการวางบนผิวดิน ดังรูปที่ 47 ก แท่งพุลูลแลนจะเริ่มดูดซับความชื้นจากผิวดิน ในวันที่ 1 และเริ่มมีเส้นใยของเชื้อราจากบนผิวดินและอากาศขึ้นบริเวณผิวในวันที่ 3 ดังภาพที่ 47 ข และ ค ตามลำดับ แท่งพุลูลแลนมีเส้นใยของเชื้อราเจริญบนผิวมากขึ้น และสลายตัวอย่างชัดเจนในวันที่ 3 ดังภาพที่ 47 ค และค่อยๆ สลายตัวมากขึ้นในวันที่ 5 เป็นต้นไป ดังรูปที่ 47 ง ถึง ฉ เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายของพุลูลแลนระหว่างสายพันธุ์ NRRL 6992 กับสายพันธุ์ ATCC 42023 พบว่า การสลายตัวของพุลูลแลนจากสายพันธุ์ NRRL 6992 ใช้เวลาสั้นกว่าพุลูลแลนจากสายพันธุ์ ATCC 42023 ดังภาพที่ 47 และ 48



รูปที่ 47 การสลายตัวของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 บนผิวคิน
ในธรรมชาติเป็นเวลา 9 วัน

ก. 0 วัน

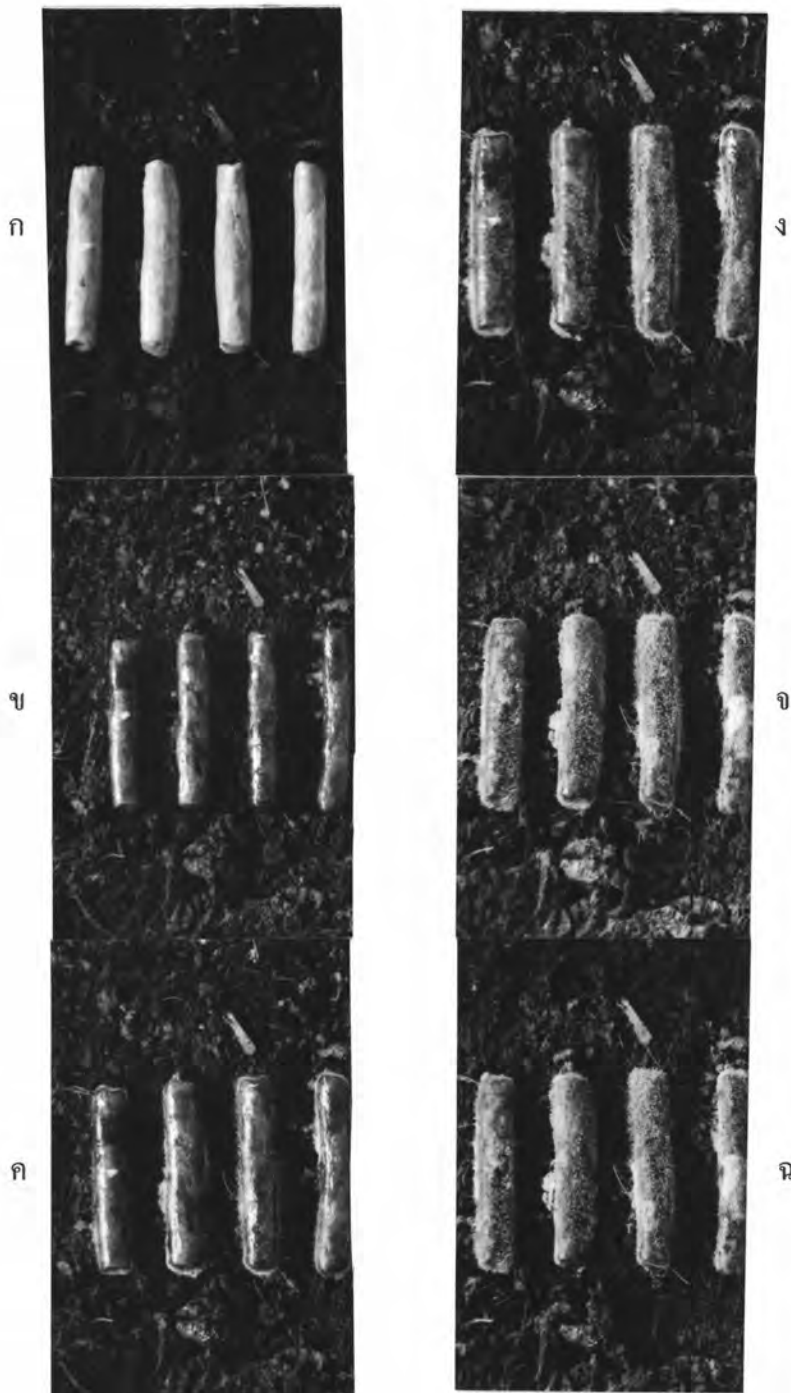
ข. 1 วัน

ค. 3 วัน

ง. 5 วัน

จ. 7 วัน

ฉ. 9 วัน



รูปที่ 48 การสลายตัวของไบโอโพลีเมอร์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* สายพันธุ์ ATTC 42023 บนผิวดิน
ในธรรมชาติเป็นเวลา 9 วัน

ก. 0 วัน

ข. 1 วัน

ค. 3 วัน

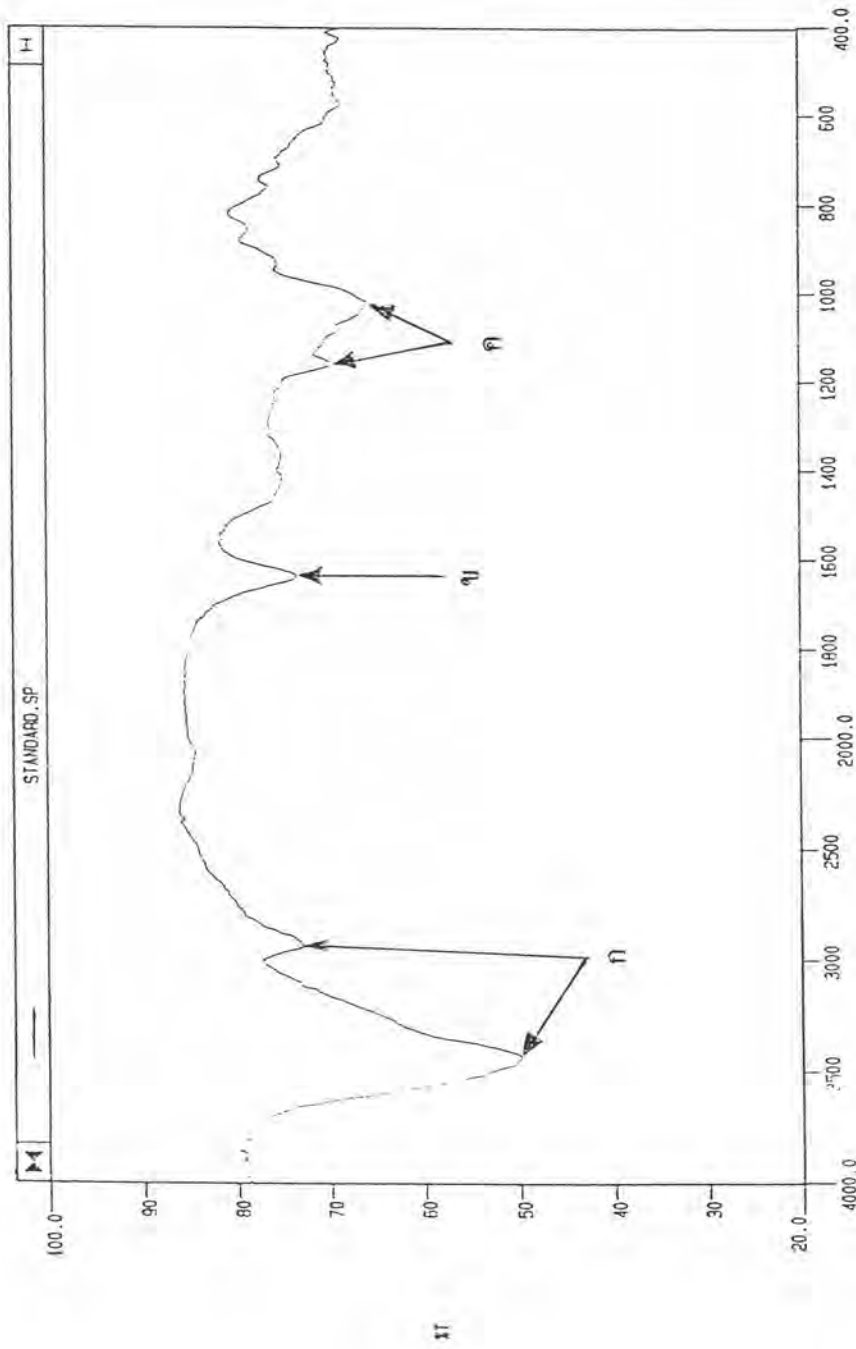
ง. 5 วัน

จ. 7 วัน

ฉ. 9 วัน

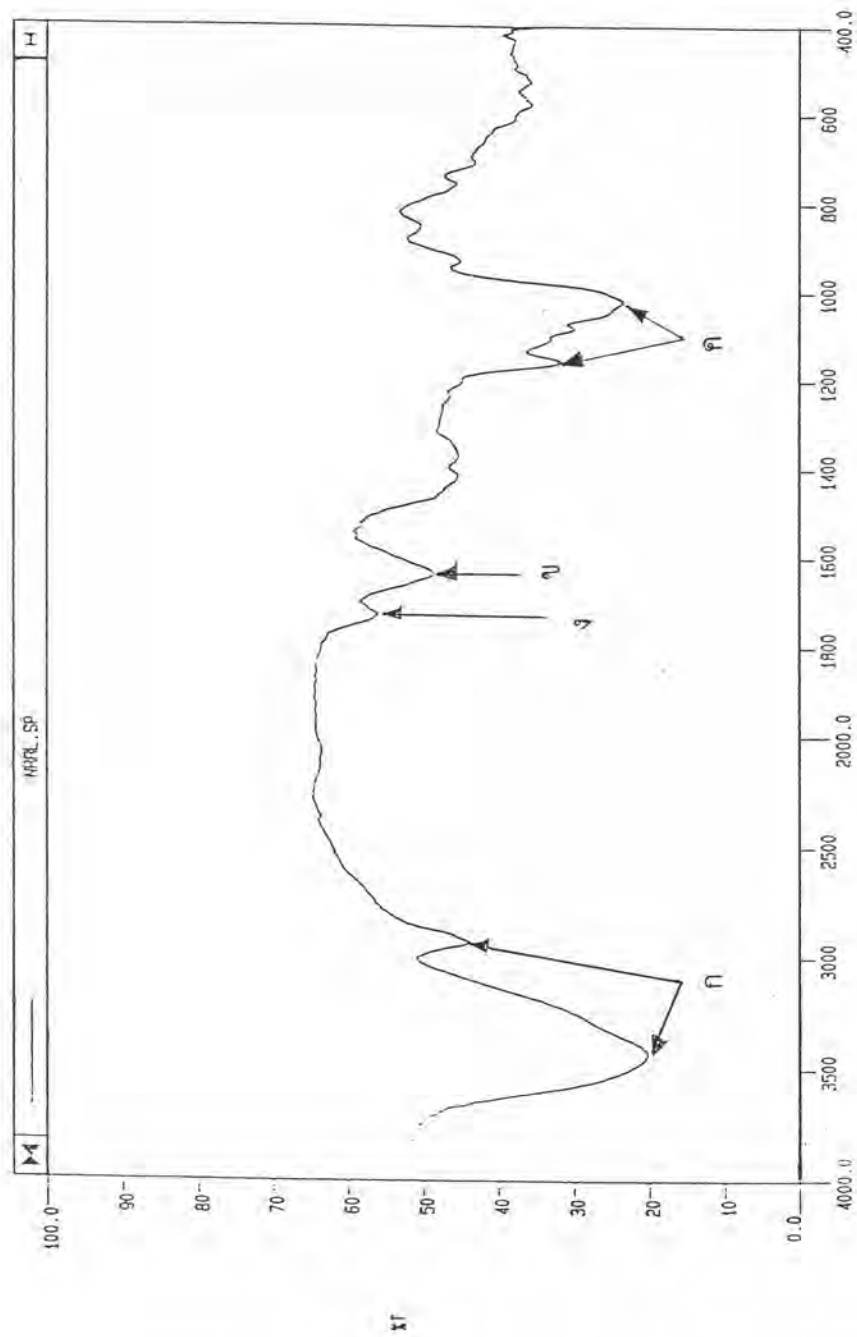
4. ผลการทดสอบความเป็นพอลิเมอร์จากไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้

จากการทดสอบความเป็นพอลิเมอร์จากไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023 เปรียบเทียบกับโครงสร้างพอลิเมอร์มาตรฐาน (Sigma Chemical, USA) ด้วยเครื่อง IR spectrophotometer พบว่า โครงสร้างพอลิเมอร์จากพอลิเมอร์มาตรฐานเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง IR spectrophotometer ดังรูปที่ 49 แล้วพบหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย หมู่อัลคิลแบบเจนเนอรัล (alkyl group-general) ดังรูป 52 ก หมู่อัลคิลแบบไฮดรอกซี (alkyl group-hydroxy) ดังรูป 52 ข และ อะลิฟาติก แอลกอฮอล์ (aliphatic alcohol) ดังรูป 52 ง สำหรับไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ NRRL 6992 เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างเครื่อง IR spectrophotometer ดังรูปที่ 50 พบว่า ไบโอพอลิเมอร์ชนิดนี้มีหมู่ฟังก์ชันที่ประกอบด้วยหมู่อัลคิลแบบเจนเนอรัล ดังรูป 52 ก หมู่อัลคิลแบบไฮดรอกซี ดังรูป 52 ข องค์ประกอบของอะมิโน ดังรูป 52 ค และอะลิฟาติก แอลกอฮอล์ ดังรูป 52 ง เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ ATCC 42023 ด้วยเครื่อง IR spectrophotometer ดังรูปที่ 51 พบว่า ไบโอพอลิเมอร์ชนิดนี้มีหมู่ฟังก์ชันที่ประกอบด้วยหมู่อัลคิลแบบเจนเนอรัล ดังรูป 52 ก หมู่อัลคิลแบบไฮดรอกซี ดังรูป 52 ข องค์ประกอบของอะมิโน ดังรูป 52 ค และ อะลิฟาติกแอลกอฮอล์ ดังรูป 52 ง เช่นเดียวกันกับไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ NRRL 6992



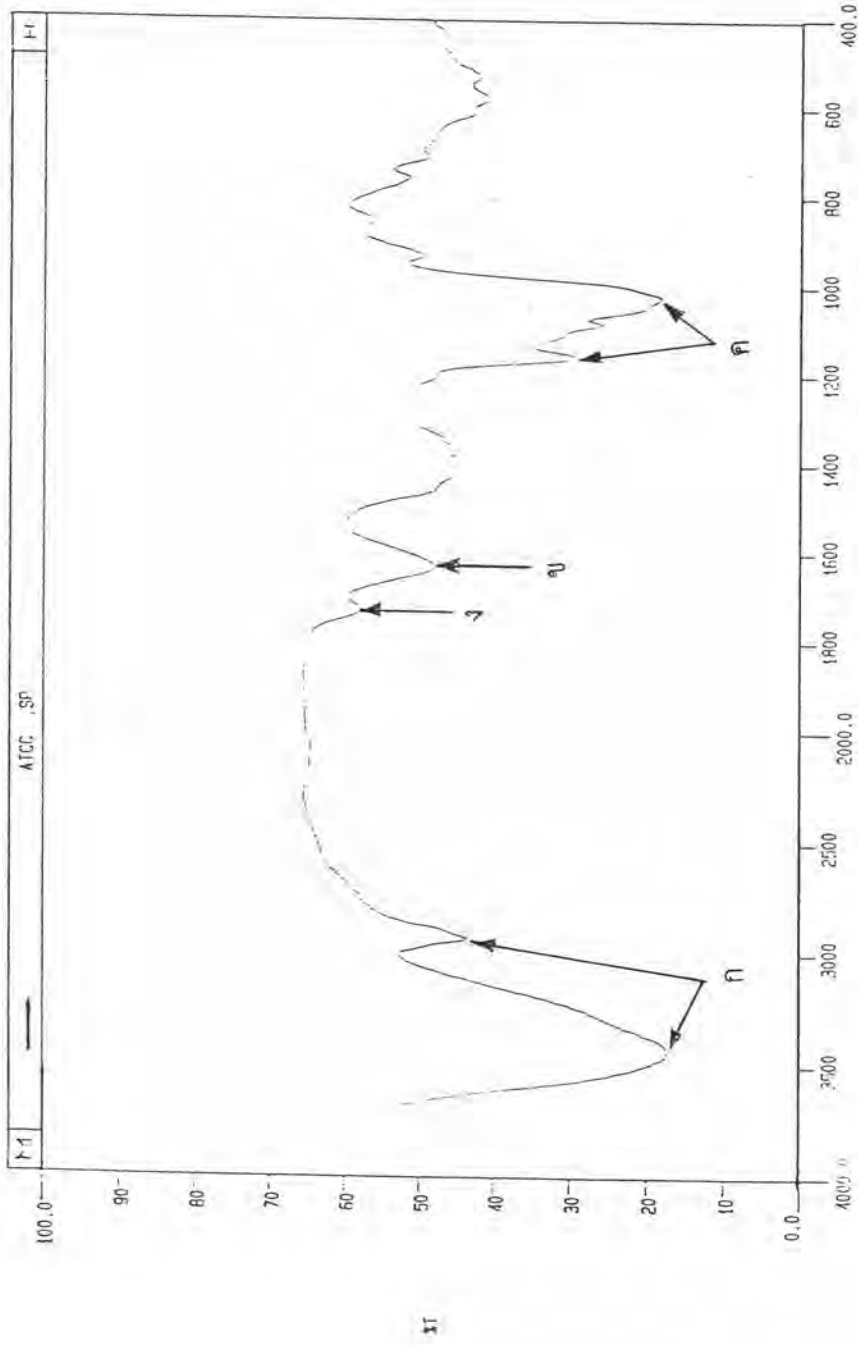
รูปที่ 49 โครงสร้างพหุคูณมาตรฐาน วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Infrared spectrophotometer

- ก Alkyl group-general
- ข Hydroxy
- ค Aliphatic alcohol



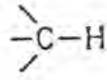
รูปที่ 50 โครงสร้างพอลิเมอร์จากสายพันธุ์ NRRL 6992 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Infrared spectrophotometer

- ก Alkyl group-general
- ข Aliphatic alcohol
- ง Hydroxy
- ค Hydroxy or NH compound

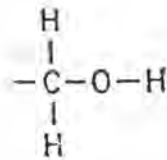


รูปที่ 51 โครงสร้างพอลิเมอร์จากสายพันธุ์ ATCC 42023 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Infrared spectrophotometer

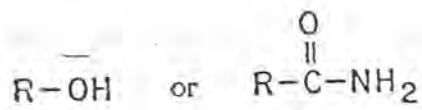
- ก Alkyl group-general
- ข Hydroxy
- ค Aliphatic alcohol
- ง Hydroxy or NH compound



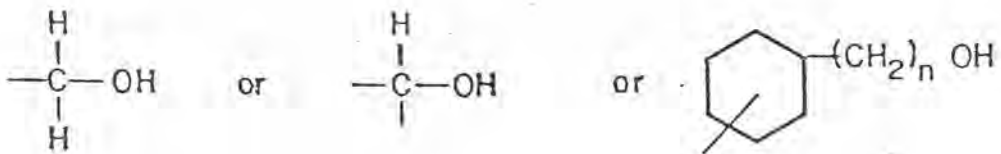
ก



ข



ค



ง

รูปที่ 52 โครงสร้างทางเคมีของหมู่ฟังก์ชันนัล (Perkin Elmer Corporation, 1990)

- ก Alkyl group
- ข Hydroxy
- ค Hydroxy or NH compound
- ง Aliphatic alcohol