หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

1. การศึกษาโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างจากเห็ดที่รับประทานได้

1.1 การศึกษาชนิดของอาหารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการสร้างโพลีแซคคาไรด์

จากการเลี้ยงเชื้อเห็ดทั้ง 11 สายพันธุ์ ในอาหารเหลวที่แปรผันชนิดของอาหารแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด ซูโครส กลูโคส แลคโตส และกาแลคโตส ผลการทดลองพบว่า เห็ดฟาง (ไทย) และเห็ดหมื่นปี ไม่พบการสร้างโพลีแซคคาไรด์ที่ขับออกมาภายนอกเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวดังกล่าวข้างต้น ในขณะที่เห็ดนางฟ้า เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดภูฐาน เห็ดหูหนู และเห็ดตีนตุ๊กแก พบการสร้างโพลีแซคคาไรด์ที่ขับออกมาภายนอกเซลล์ ส่วนเห็ดนางนวลและเห็ดนางรมพบว่าไม่สร้างโพลีแซคคาไรด์ในอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกาแลคโตส เห็ดฟาง (ไต้หวัน) และเห็ดหิ้ง สามารถสร้างโพลีแซคคาไรด์ได้ในอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคสเท่านั้น แสดงผลการทดลองในตารางที่ 1

จากการเปรียบเทียบปริมาณของโพลีแซคคาไรด์ที่ถูกสร้างขึ้น พบว่าเห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดภูฐาน เห็ดตีนตุ๊กแก เห็ดฟางและเห็ดหิ้ง สามารถสร้างโพลีแซคคาไรด์ได้ในปริมาณค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับเห็ดสายพันธุ์ที่เหลือ และนอกจากนี้จะเห็นได้ว่า ชนิดของอาหารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในการสร้างโพลีแซคคาไรด์นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถของสายพันธุ์ของเห็ดด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2

จากการทบทวนเอกสาร Poonpilai และคณะ 1976 ทดลองศึกษาสกัดแยกโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อรา Aureobasidium sp. ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส พบว่าโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้มีลักษณะคล้ายกับพูลลูแลนที่ได้จาก Aureobasidium pullulan

1.2 การจำแนกชนิดของโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างจากเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ ตามลักษณะประจุไฟฟ้า

การจำแนกชนิดของโพลีแซคคาไรด์ ตามลักษณะประจุไฟฟ้า โดยใช้สารละลาย 10% cpc พบว่าโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างจากเห็ดนางรม เห็ดภูฐาน เห็ดฟาง เห็ดหิ้ง และเห็ดตีนตุ๊กแก เป็นชนิดที่มีลักษณะประจุเป็นกลาง ส่วนเห็ดนางนวล เห็ดนางรม เห็ดเป๋าฮื้อและเห็ดหูหนู สร้างโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นประจุลบ แสดงผลการทดลองในตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่า แม้สายพันธุ์ของเห็ดจะอยู่ในจีนัสเดียวกันก็ตาม แต่โพลีแซคคาไรด์ที่สร้างออกมามีลักษณะไม่เหมือนกัน ดังเช่น เห็ดนางรม (Pleurotus ostreatus) สร้างโพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นลบ ในขณะที่เห็ดนางฟ้า (P. florida) ที่อยู่ใน

จีนัส Pleurotus เหมือนกัน สร้างโพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง

จากรายงานของ Poonpilai และคณะ(1976) การศึกษาลักษณะประจุบนโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดจาก Aureobasidium sp. พบว่ามีลักษณะประจุเป็นลบเช่นกัน และจากการศึกษาของ Davis,Rhodes และ Shuklet (1965) พบว่าโพลีแซคคาไรด์ในเชื้อรา Fusarium solani,Helotium sp.,Plectania occidentalis มีลักษณะประจุเป็นกลาง

1.3 การตรวจชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในโพลีแซคคาไรด์โดยวิธีโครมาโตกราฟีกระดาษ

นำโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ มาทำการย่อยสลายให้สมบูรณ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นนำไปตรวจสอบชนิดของน้ำตาลด้วยวิธีโครมาโตกราฟีกระดาษ พบว่าโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างจากเห็ดทั้ง 9 สายพันธุ์ มีน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบชนิดเดียวคือ กลูโคส โดยคำนวณจากค่า R_f ที่เปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน โดยค่า R_f ที่คำนวณได้มีดังนี้ คือ กลูโคส 0.46,ฟรุสโตส 0.41,กาแลคโตส 0.36,มอลโตส 0.28 และแลคโตส 0.22

จากการทดลองพอสรุปได้ว่า โพลีแซคคาไรด์ที่สร้างขึ้นจากเห็ดทั้ง 9 สายพันธุ์นี้ จัดเป็นโพลีแซคคาไรด์จำพวกกลูแคน และจากรายงานของ Komatsu และคณะ 1969 ได้รายงานไว้ว่า โพลีแซคคาไรด์ที่สร้างจากเห็ดตีนตุ๊กแก (Schitophyllum commune) มีโครงสร้างเป็น (1-3)-β-D-glucan,และ Chihara และคณะ,1970 รายงานไว้ว่า โพลีแซคคาไรด์ที่แยกสกัดจากเห็ดหอม (Lentinus edodes) มีโครงสร้างเป็น (1-3)-β-D-glucan เช่นกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สายพันธุ์ของเห็ด	ซูโครส	กลูโคส	แลคโตส	กาแลคโตส
	% น้ำตาลทั้งหมด	% น้ำตาลทั้งหมด	% น้ำตาลทั้งหมด	% น้ำตาลทั้งหมด
เห็ดนางนวล	0.17	0.19	0.14	-
เห็ดนางรม	0.21	0.17	0.06	-
เห็ดนางฟ้า	0.74	0.63	0.21	0.19
เห็ดเป๋าฮื้อ	8.64	9.64	7.86	12.34
เห็ดภูฐาน	10.96	11.25	7.83	9.41
เห็ดฟาง(ไทย)	-	-	-	-
เห็ดฟาง(ไต้หวัน)	-	8.01	-	-
เห็ดหิ้ง	-	6.79	-	-
เห็ดหมื่นปี	-	-	-	-
เห็ดหูหนู	0.14	0.17	0.14	0.13
เห็ดตีนตุ๊กแก	6.74	7.93	10.38	9.95
S. rolfsii	22.2	-	-	-

ตารางที่ 1 : แสดงการเปรียบเทียบผลของการสร้างโพลีแซคคาไรด์จากเชื้อเห็ดชนิดต่าง ๆ ในอาหารแหล่งคาร์บอนที่แปรผันชนิดเป็น ซูโครส, กลูโคส, แลคโตส และกาแลคโตส โดยทำการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

หมายเหตุ : ตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วย 95% เอธานอล ผลการตรวจสอบพบว่าตะกอนที่สายพันธุ์ต่าง ๆ ให้ผล positive ต่อวิธีฟีนอลซัลฟูริก คือ ได้สารละลายเป็นสีส้มเข้ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สายพันธุ์ของเห็ด	ชนิดของอาหารแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตโพลีแซคคาไรด์สูงที่สุด	% น้ำตาลทั้งหมด
เห็ดนางนวล	กลูโคส	0.19
เห็ดนางรม	ซูโครส	0.21
เห็ดนางฟ้า	ซูโครส	0.74
เห็ดเป๋าฮื้อ	กาแลคโตส	12.34
เห็ดภูฐาน	กลูโคส	11.25
เห็ดฟาง (ไต้หวัน)	กลูโคส	8.01
เห็ดหิ้ง	กลูโคส	6.79
เห็ดหูหนู	กลูโคส	0.17
เห็ดตีนตุ๊กแก	แลคโตส	10.83

ตารางที่ 2 : แสดงผลสรุปของชนิดอาหารแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณการผลิตโพลีแซคคาไรด์สูงสุด จากการเลี้ยงเชื้อเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สายพันธุ์ของเห็ด	โพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง	โพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นลบ
เห็ดนางนวล	0	+
เห็ดนางรม	0	+
เห็ดนางฟ้า	±	0
เห็ดเป๋าฮื้อ	0	+
เห็ดภูฐาน	±	0
เห็ดฟาง (ไต้หวัน)	±	0
เห็ดหิ้ง	±	0
เห็ดหูหนู	0	+
เห็ดตีนตุ๊กแก	±	0

± แสดงถึง โพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง

\- แสดงถึง โพลีแซคคาไรด์ที่มีประจุเป็นลบ

0 แสดงถึง ไม่พบ

ตารางที่ 3 : แสดงถึงการจำแนกชนิดของโพลีแซคคาไรด์ที่สร้างขึ้นตามลักษณะประจุไฟฟ้าจากเห็ดสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยทดสอบในสารละลาย cpc 10%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสเคลอโรกลูแคนในอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

เนื่องจากโพลีแซคคาไรด์จากจุลชีพจัดเป็นสารเมทาบอไลท์ (metabolite) แบบปฐมภูมิ (primary metabolite) ซึ่งมีลักษณะการสร้างสารเมทาบอไลท์เป็นไปตามการเจริญ (growth associate) (Smith,1985) ดังนั้นการประมาณการสร้างสเคลอโรกลูแคนในขั้นต้นนี้ ได้ถือเอาการเจริญของเส้นใยโดยน้ำหนักเป็นแนวทางในการวัดปริมาณสเคลอโรกลูแคน ก่อนขั้นตอนการสกัดแยก

2.1 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสเคลอโรกลูแคนโดยใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองหาปริมาณกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการเจริญพบว่า ที่ปริมาณของกากน้ำตาล 10.0% ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุดเป็น 4.21 กรัมต่อ 100 มล. เมื่อเทียบกับปริมาณของกากน้ำตาลที่มีปริมาณอื่น ๆ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 1

ส่วนในการหาชนิดและสัดส่วน ของแหล่งอาหารไนโตรเจนและแหล่งวิตามินที่เหมาะสม จากการทดลองในขั้นต้นได้เลือกใช้สารอินทรีย์แอมโมเนียมซัลเฟต และสารอินทรีย์โพลีเพพโตน เป็นอาหารแหล่งไนโตรเจน และใช้ผงสกัดยีสต์ เป็นอาหารแหล่งวิตามิน ผลการทดลองแสดงในกราฟรูปที่ 2 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพียงกากน้ำตาลในปริมาณ 10.0 % โดยไม่มีการเติมแหล่งอาหารไนโตรเจนและวิตามินลงไป ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุด

การหาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมนั้น ค่าพีเอชที่เหมาะสมมีค่าเป็น 5.0 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3 ค่าพีเอชเริ่มต้นของสารละลายกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 10.0% ที่ยังไม่มีการปรับค่าพีเอชนั้น มีค่าประมาณ 4.86 ซึ่งให้ผลการเจริญใกล้เคียงกัน

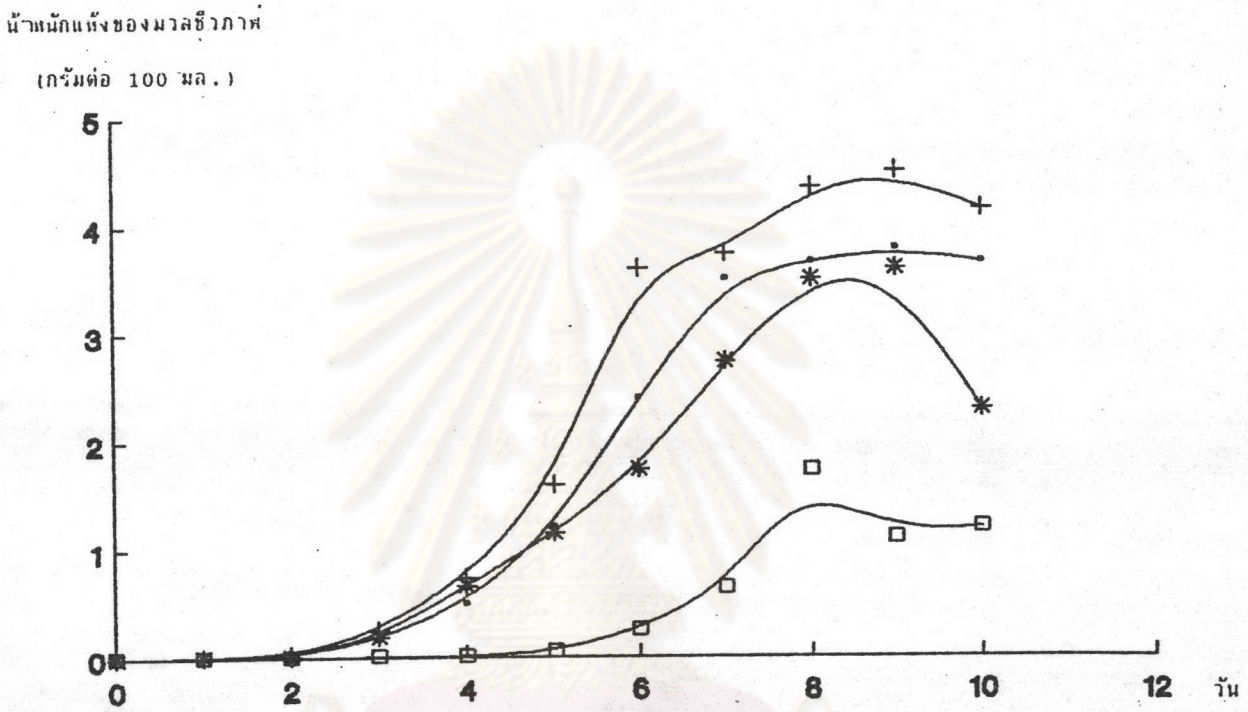
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 25 องศาเซลเซียส และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงถึง 40 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีการเจริญของเส้นใย ดังแสดงในกราฟรูปที่ 4

ดังนั้นในการทดลองต่อไป ได้ใช้อาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณและสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตสเคลอโรกลูแคน โดยมีกากน้ำตาลปริมาณ 10.0% ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อทำการแยกสกัดแล้ว สามารถให้สเคลอโรกลูแคนได้ในปริมาณสูงสุด คือ 1.50% ในวันที่ 6 ค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยสูงสุดเป็น 0.75% ในวันที่ 7 และค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นที่ 5.0 ไปเป็น 2.5 ภายในเวลา 10 วัน ของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 5

จากการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า สภาพของอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสเคลอโรกลูแคนนั้น ไม่ได้ขาดแหล่งอาหารที่ได้ทดลองแหล่งไนโตรเจนและวิตามิน

อาจเป็นเพราะกากน้ำตาลมีลักษณะที่เป็นอาหารสมบูรณ์ (complete medium) สำหรับสายพันธุ์นี้ คือ จะมีแหล่งอาหารที่สำคัญสมบูรณ์ ดังรายงานที่ Oura,1983 รวบรวมไว้ว่า ในกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลจากอ้อย จะมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 48-56% โปรตีน 2-4% โปตัสเซียม 1.5-5.0% แมกนีเซียม 0.06% และไบโอติน 1.0-3.0 มก. ต่อ กก. เป็นต้น หรือจากรายงานของ ปราณี,2529 ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำตาล ซึ่งได้แก่ น้ำตาลทั้งหมด 53.5% น้ำตาลรีดิวซ์ 20-21% ธาตุไนโตรเจน 0.62% ธาตุฟอสฟอรัส 0.06% ธาตุแคลเซียม 0.87% ธาตุโปตัสเซียม 2.49% และธาตุโซเดียม 0.06% และเถ้า 9.35%

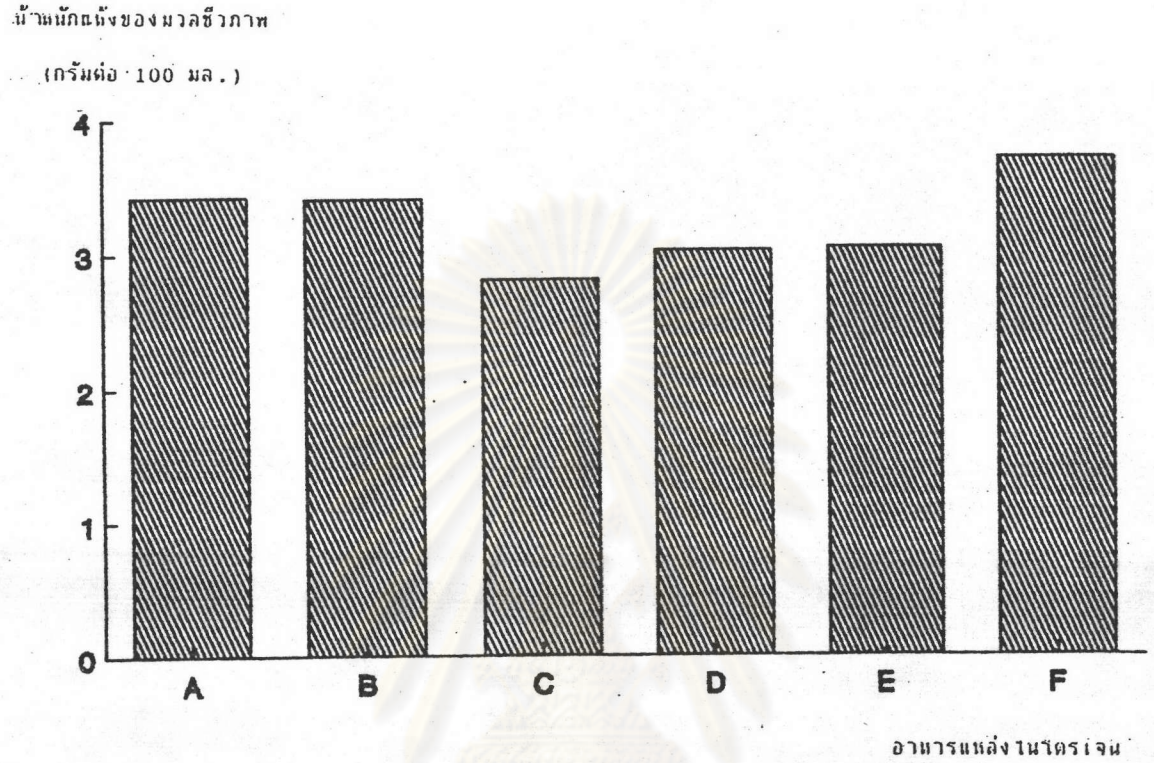
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 : แสดงผลของปริมาณกากน้ำตาลต่อการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลที่แปรผันปริมาณดังนี้

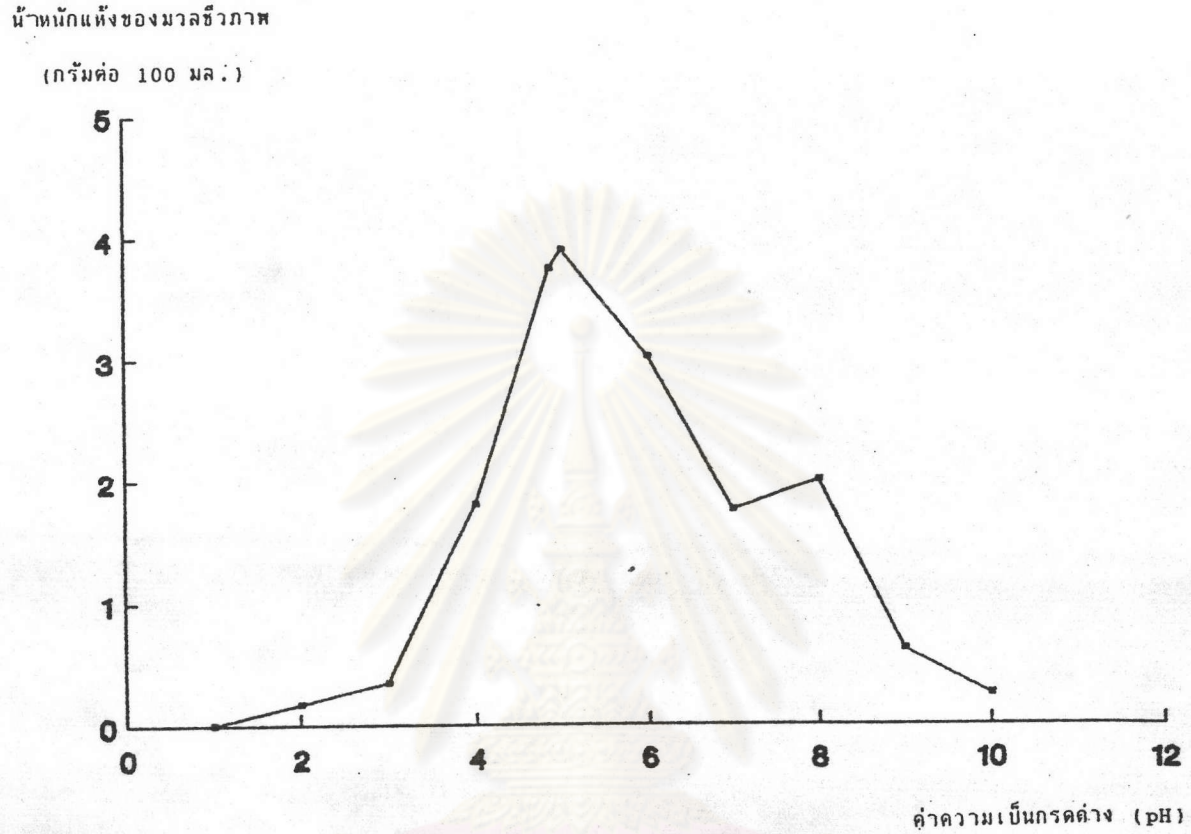
- •——• แสดงถึง ปริมาณกากน้ำตาล 7.0% (กรัม ต่อ มล.)
- +——+ แสดงถึง ปริมาณกากน้ำตาล 10.0% (กรัม ต่อ มล.)
- *——* แสดงถึง ปริมาณกากน้ำตาล 12.0% (กรัม ต่อ มล.)
- □——□ แสดงถึง ปริมาณกากน้ำตาล 15.0% (กรัม ต่อ มล.)

i 14836853



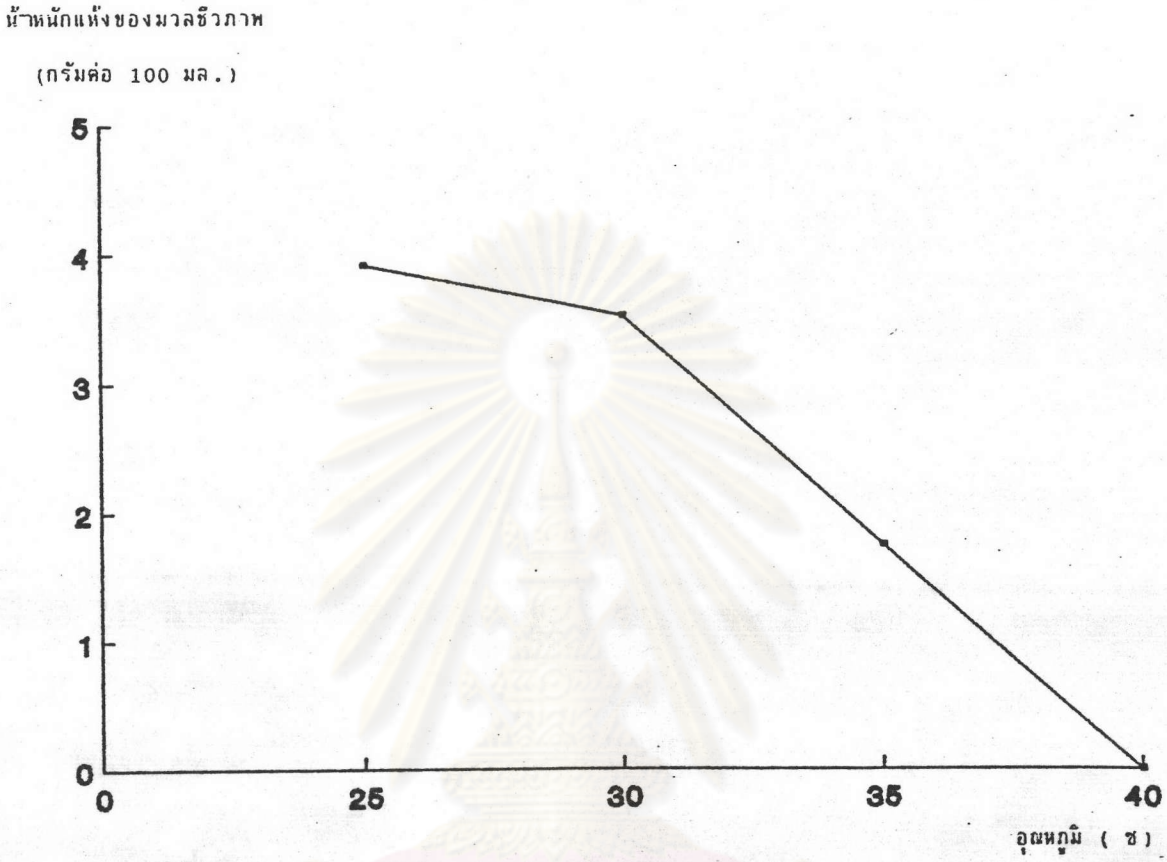
รูปที่ 2 : แสดงผลของสัดส่วนและชนิดของแหล่งอาหารไนโตรเจนและแหล่งวิตามินที่มีกากน้ำตาลปริมาณ 10.0% เป็นอาหารแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

A แสดงถึง ผสมผงสกัดยีสต์ 0.10% (กรัมต่อ มล.)
B แสดงถึง ผสมผงสกัดยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างละ 0.05% (กรัมต่อ มล.)
C แสดงถึง ผสมผงสกัดยีสต์และโพลีเปปโตนอย่างละ 0.05 (กรัมต่อ มล.)
D แสดงถึง ผสมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% (กรัมต่อ มล.)
E แสดงถึง ผสมโพลีเปปโตน 0.10% (กรัมต่อ มล.)
F แสดงถึง ชุดควบคุม (ไม่ใส่แหล่งอาหารไนโตรเจนและแหล่งวิตามินลงไปเลย)



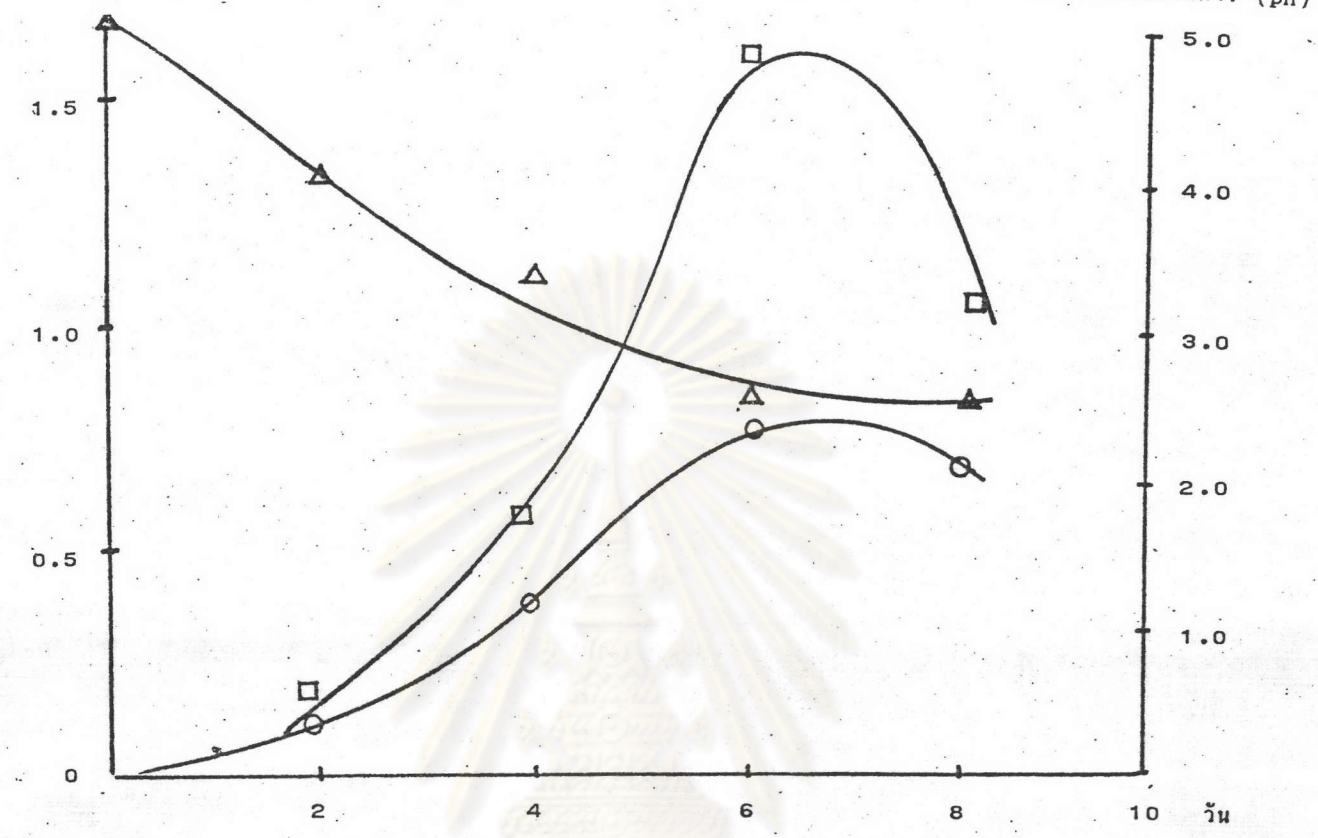
รูปที่ 3 : แสดงผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญในอาหารที่มีปริมาณกากน้ำตาล 10.0% โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 : แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญในอาหารเหลวที่มีปริมาณน้ำตาล 10.0% ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 แปรผันอุณหภูมิเป็น 25,ห้อง (30±2), 35 และ 40 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 : แสดงถึง การเจริญและการผลิตสเคลอโรกลูแคนจาก S. rolfsii ในอาหารเหลวที่มีปริมาณกากน้ำตาล 10.0% ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

○—○ แสดงถึง น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อ 100 มล.)

□—□ แสดงถึง น้ำหนักแห้งของสเคลอโรกลูแคน (กรัมต่อ 100 มล.)

△—△ แสดงถึง ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป

2.2 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสเคลอโรกลูแคนโดยใช้น้ำตาลทรายเป็นอาหารแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองหาปริมาณน้ำตาลทรายที่เหมาะสม พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร Czapex's Dox ที่แปรผันปริมาณของน้ำตาลทรายในปริมาณต่าง ๆ พบว่าน้ำตาลทรายในปริมาณ 10.0% ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุดเป็น 2.74 กรัมต่อ 100 มล. เมื่อเทียบกับน้ำตาลทรายในปริมาณอื่น ๆ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 6

ในการหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนและวิตามินที่เหมาะสมนั้น ได้เลือกใช้โพลีเพพโทนและยูเรีย เป็นอาหารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ส่วนโซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ใช้เป็นอาหารแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็น และผงสกัดยีสต์เป็นแหล่งวิตามิน จากการทดลองพบว่า ผงสกัดยีสต์ที่ปริมาณ 10.0% ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุดเป็น 5.24 กรัมต่อ 100 มล. จะเห็นได้ว่าผงสกัดยีสต์ปกติใช้เป็นแหล่งวิตามิน กลับให้ค่าการเจริญสูงกว่าแหล่งอาหารไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ แสดงว่ามีการใช้อาหารแหล่งไนโตรเจนของสายพันธุ์นี้ใช้ในปริมาณต่ำในการผลิตสเคลอโรกลูแคน นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์นี้ไม่สามารถใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ดังแสดงผลในกราฟรูปที่ 7

ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม มีค่าเป็น 5.0 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 8 โดยขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเหลวที่ยังไม่มีการปรับค่าพีเอชนั้นมีค่าประมาณ 6.23

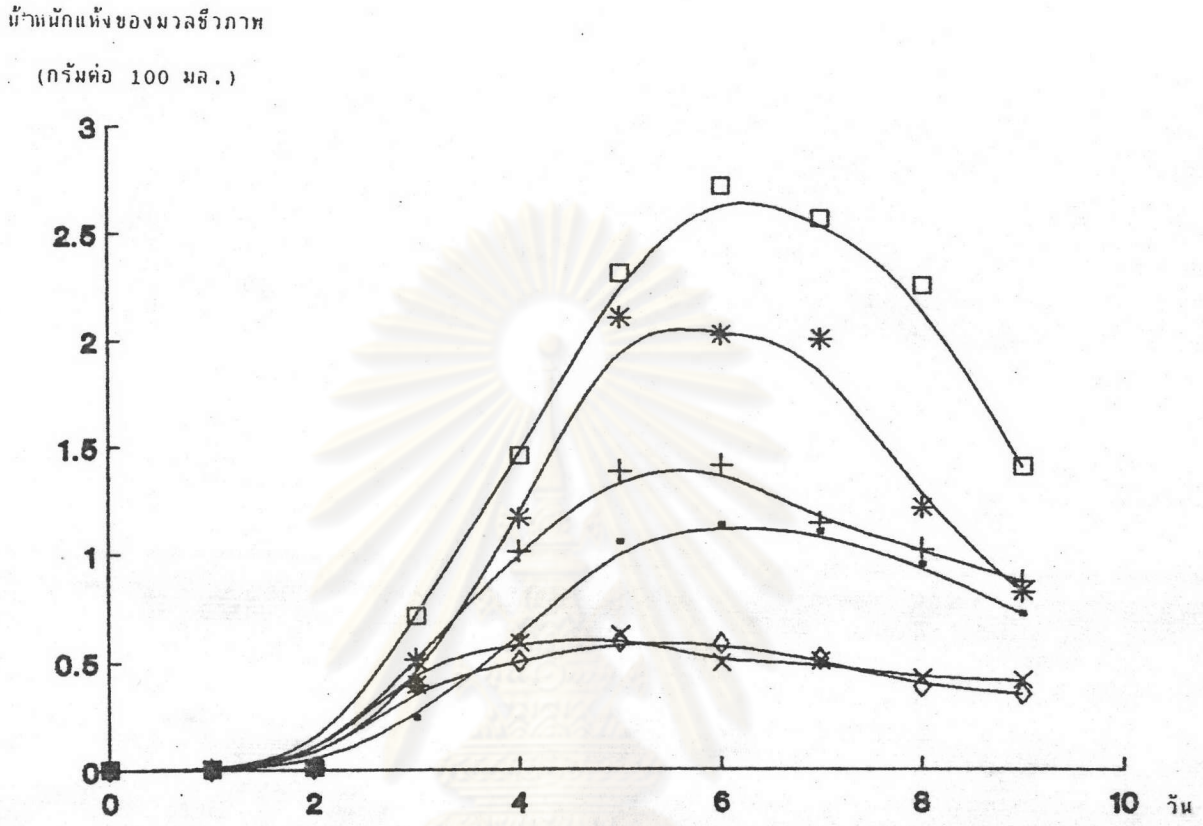
ได้นำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Czapex's Dox มาแปรผันปริมาณชนิดและปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ โดยมีแร่ธาตุที่ใช้ในอาหารสูตรนี้ ดังนี้ โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต,โปตัสเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมซัลเฟต จากผลการทดลอง ดังแสดงในกราฟรูปที่ 9 พบว่าปริมาณที่เหมาะสมที่นำมาใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนมีดังนี้ โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.25 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแร่ธาตุในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapex's Dox ในสูตรเดิมนั้น พบว่าปริมาณของแร่ธาตุที่ได้จากการทดลองหาปริมาณแร่ธาตุที่เหมาะสมครั้งนี้ ปริมาณที่ใช้นั้นน้อยกว่าในสูตรเดิมครึ่งหนึ่ง กล่าวคือ โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร และโปตัสเซียมคลอไรด์ 0.50 กรัมต่อลิตร

ค่าของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญมีค่าเป็น 35 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีการเจริญ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 10

ดังนั้นองค์ประกอบในอาหารและสภาพที่เหมาะสมในการผลิตสเคลอโรกลูแคนจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย มีดังนี้ น้ำตาลทรายในปริมาณ 10.0% ผงสกัดยีสต์ 1.0% โปรตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.50 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อทำการสกัดแยกแล้ว จะให้ผลผลิตสเคลอโรกลูแคน 2.21% ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ ค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยสูงสุดถึง 1.52% ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ และค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นที่ 5.0 ไปเป็น 2.25 ภายในเวลา 8 วัน ดังแสดงผลในกราฟรูปที่ 11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

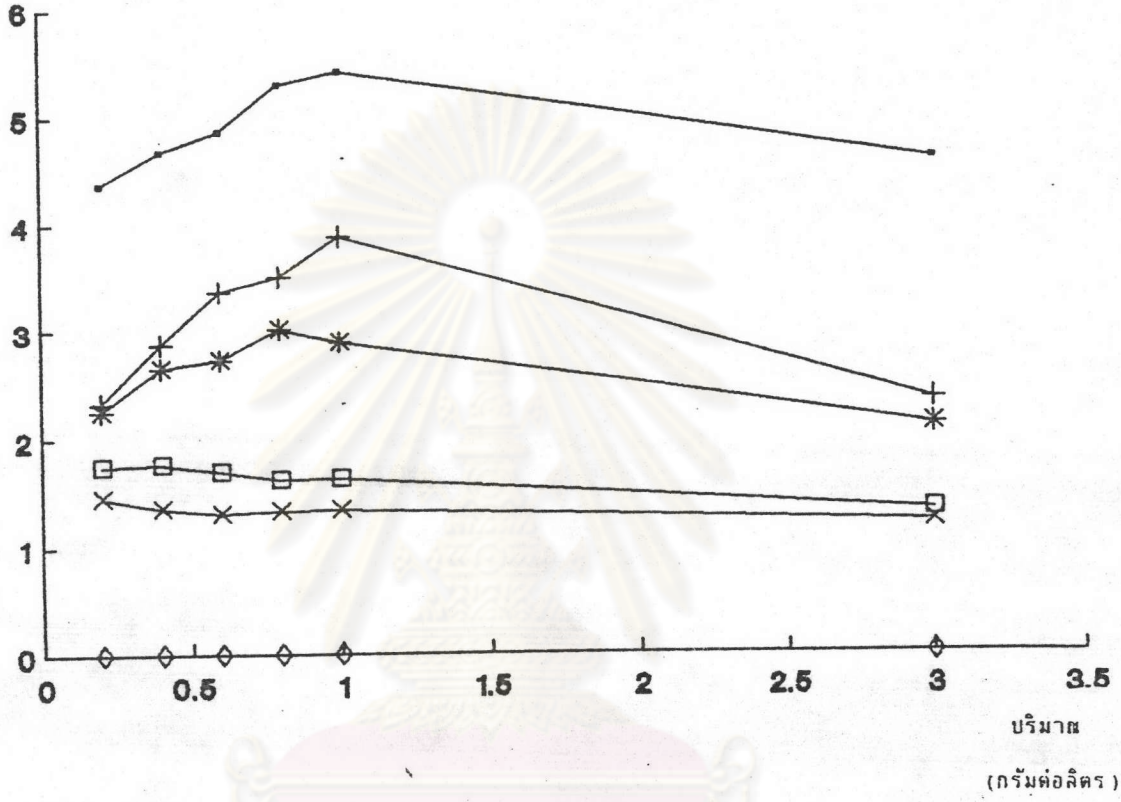


รูปที่ 6 : แสดงผลของปริมาณน้ำตาลทรายต่อการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำตาลทรายที่แปรผันปริมาณดังนี้

- •——• แสดงถึง ปริมาณน้ำตาลทราย 3.0% (กรัมต่อ มล.)
- +——+ แสดงถึง ปริมาณน้ำตาลทราย 5.0% (กรัมต่อ มล.)
- ✳——✳ แสดงถึง ปริมาณน้ำตาลทราย 7.0% (กรัมต่อ มล.)
- □——□ แสดงถึง ปริมาณน้ำตาลทราย 10.0% (กรัมต่อ มล.)
- ×——× แสดงถึง ปริมาณน้ำตาลทราย 15.0% (กรัมต่อ มล.)
- ◇——◇ แสดงถึง ปริมาณน้ำตาลทราย 20.0% (กรัมต่อ มล.)

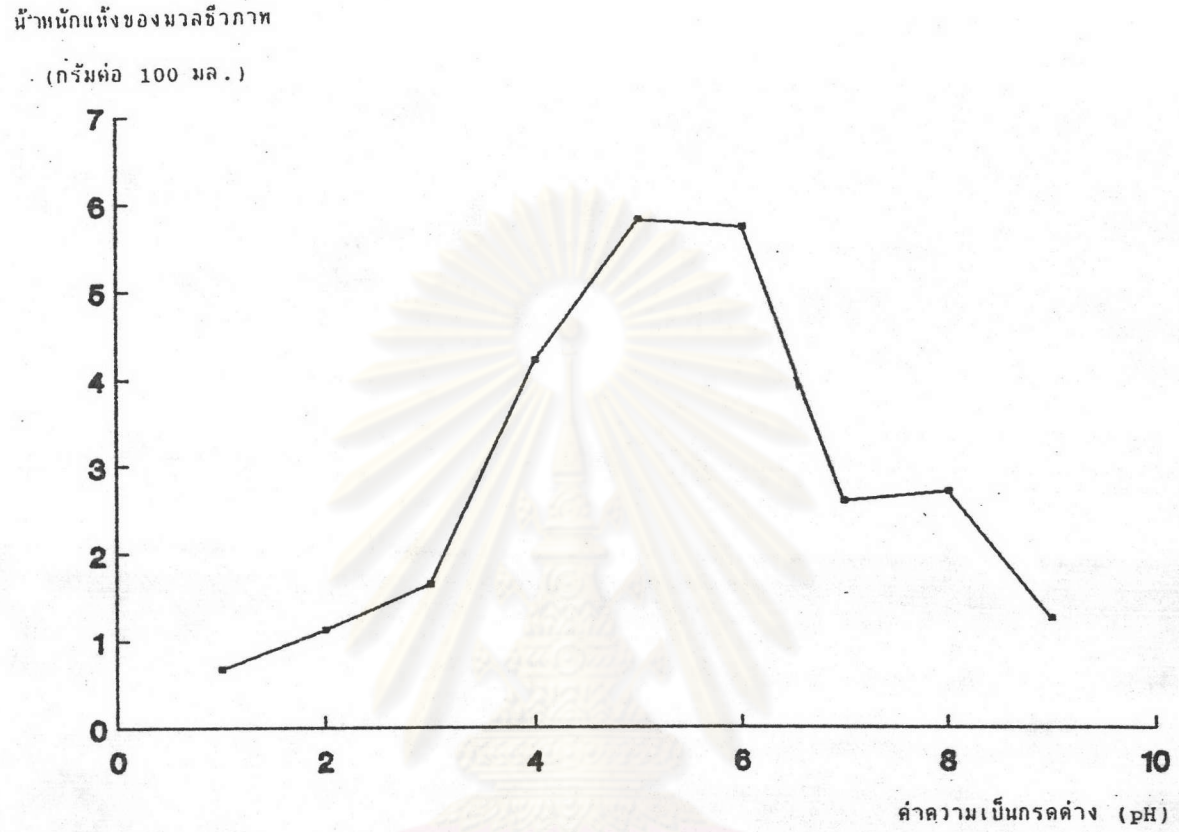
น้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพ

(กรัมต่อ 100 มล.)



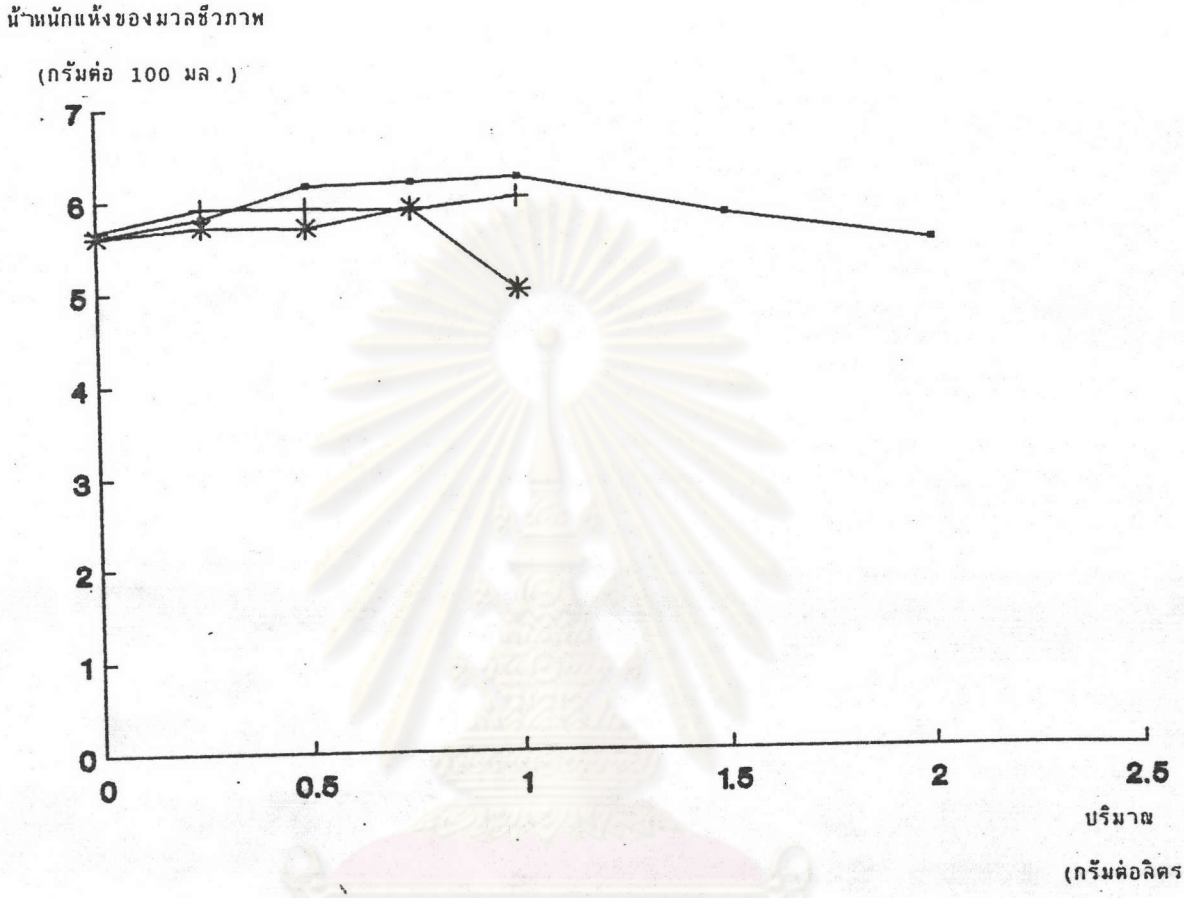
รูปที่ 7 : แสดงผลของชนิดและปริมาณของแหล่งอาหารไนโตรเจนและแหล่งวิตามินที่เหมาะสมในการเจริญ ในอาหารที่มีน้ำตาลทรายปริมาณ 10.0% เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

- •——• แสดงถึง ผงสกัดยีสต์
- +——+ แสดงถึง โพลีเปปโตน
- ✳——✳ แสดงถึง โซเดียมไนเตรต
- □——□ แสดงถึง แอมโมเนียมไนเตรต
- ×——× แสดงถึง แอมโมเนียมซัลเฟต
- ◊——◊ แสดงถึง ยูเรีย



รูปที่ 8 : แสดงผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญ ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลทราย 10.0% ผงสกัดยีสต์ 1.0% โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

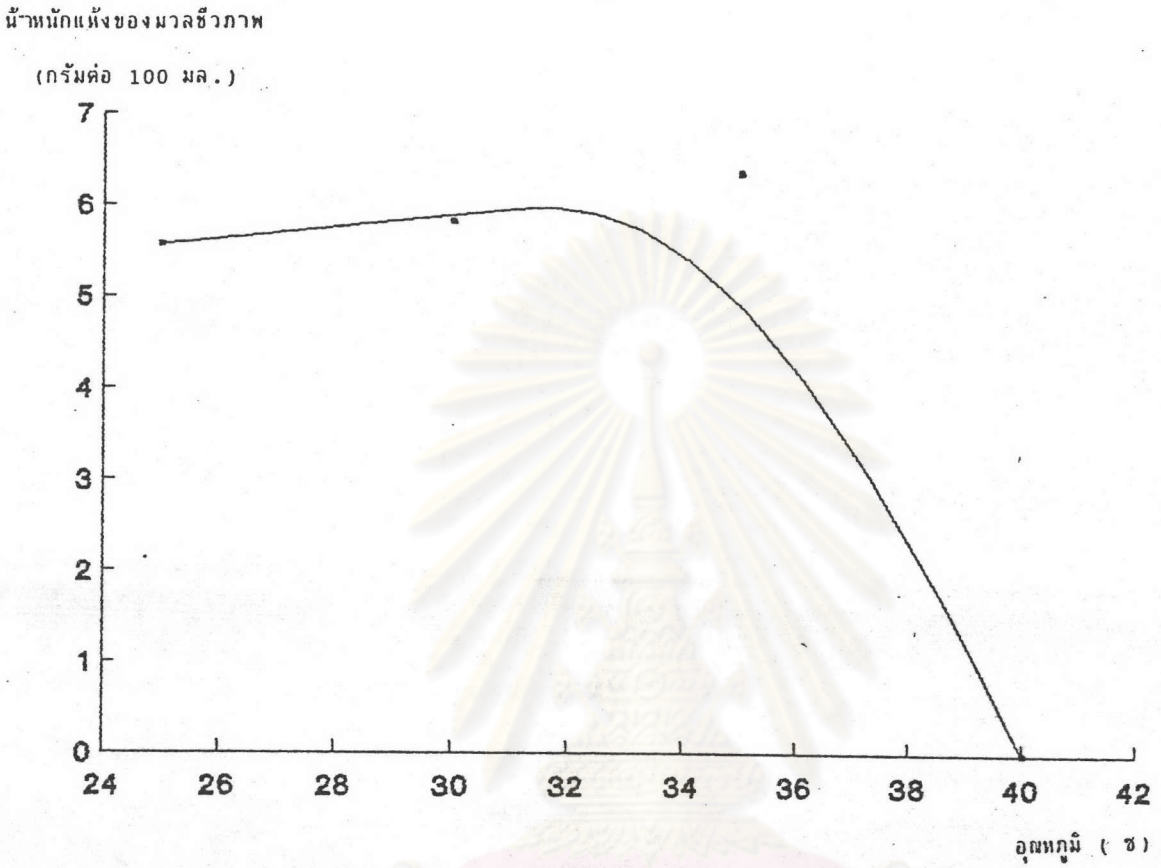


รูปที่ 9 : แสดงผลของชนิดและปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ต่อการเจริญ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทราย 10.0% ผงสกัดยีสต์ 1.0% ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

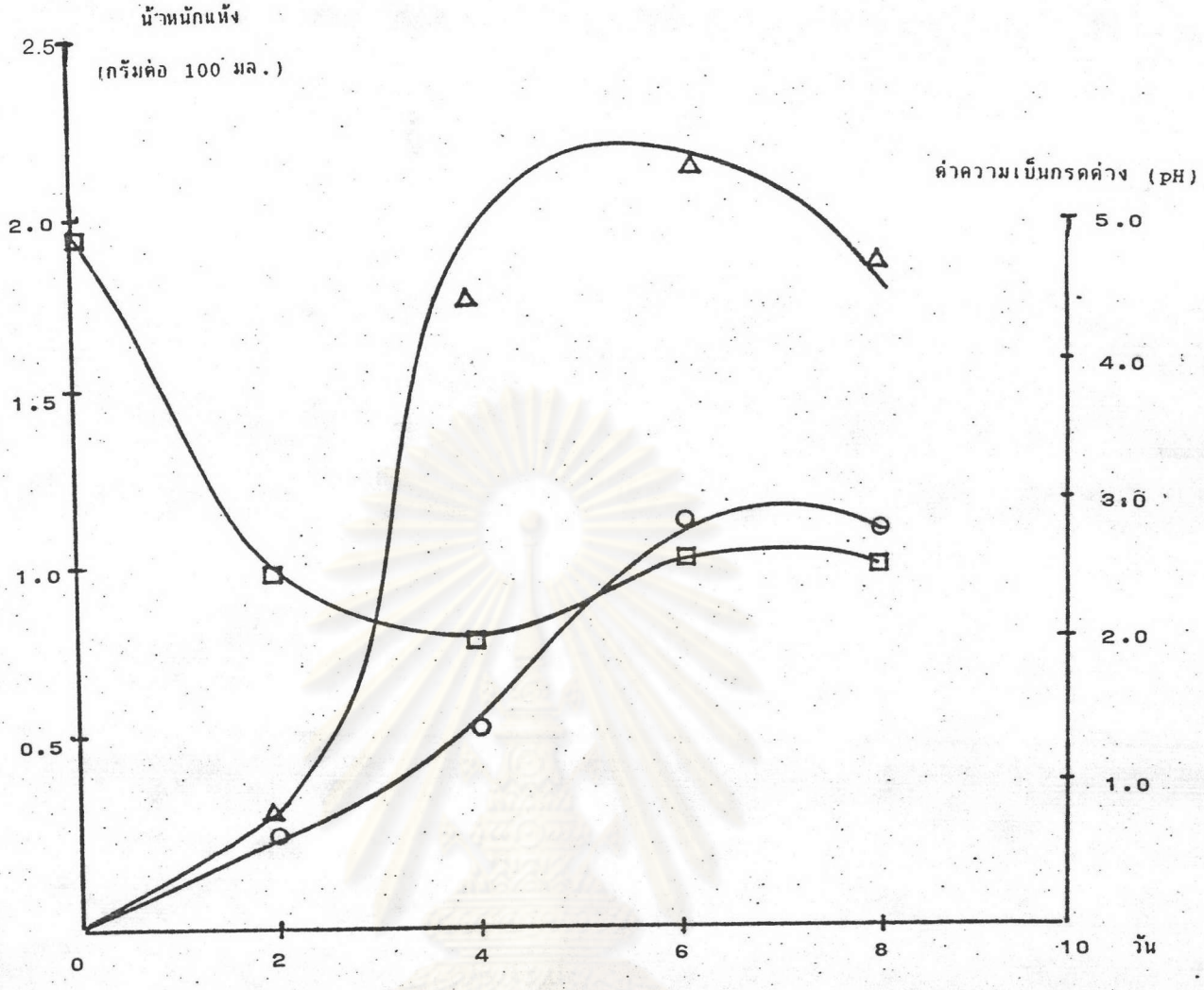
•——• แสดงถึง โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

+——+ แสดงถึง โปตัสเซียมคลอไรด์

—— แสดงถึง แมกนีเซียมซัลเฟต



รูปที่ 10 : แสดงถึงผลของอุณหภูมิการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่ใช้ปริมาณน้ำตาล 10.0% ผงสกัดยีสต์ 1.0% ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 มีแร่ธาตุต่าง ๆ ในปริมาณดังนี้ โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร, โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.25 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน



รูปที่ 11 : แสดงการเจริญและการผลิตสเคลอโรกลูแคนจาก S. rolfsii ในอาหารเหลวที่มีปริมาณน้ำตาล 10.0% ผงสกัดยีสต์ 1.0% โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.25 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

○——○ แสดงถึง น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อ 100 มล.)

△——△ แสดงถึง น้ำหนักแห้งของสเคลอโรกลูแคน (กรัมต่อ 100 มล.)

□——□ แสดงถึง ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป

2.3 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสเคลอโรกลูแคนโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นอาหารแหล่งคาร์บอน

2.3.1 แหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ (non-hydrolyzed)

จากการทดลองหาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสม พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสูตร Czapex's Dox ที่แปรผันปริมาณของแป้งมันสำปะหลังในปริมาณต่าง ๆ พบว่าแป้งมันสำปะหลังในปริมาณ 3.5% ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุดเป็น 3.12 กรัมต่อ 100 มล. เมื่อเทียบกับแป้งมันสำปะหลังในปริมาณอื่น ๆ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 12

ในการหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน และวิตามินที่เหมาะสมนั้น พบว่าอาหารแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงสุดเป็น 3.68 กรัมต่อ 100 มล. คือ โซเดียมไนเตรทปริมาณ 0.8% ดังแสดงในกราฟรูปที่ 13 ส่วนปริมาณของผงสกัดยีสต์ที่ใช้เป็นแหล่งวิตามิน พบว่าปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.8% ดังแสดงในกราฟรูปที่ 14

ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม มีค่าเป็น 5.0 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 15 โดยค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเหลวที่ยังไม่มีการปรับค่าพีเอชนั้น มีค่าประมาณ 4.8

ชนิดและปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ได้นำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ Czapex's Dox มาแปรผันปริมาณเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.2 จากผลการทดลอง ดังแสดงในกราฟรูปที่ 16 พบว่า ปริมาณที่เหมาะสมที่นำมาใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน มีดังนี้ โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.75 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของแหล่งแร่ธาตุในสูตร Czapex's Dox เดิมนั้น มีเพียงปริมาณของโปตัสเซียมคลอไรด์เท่านั้นที่สูงกว่าสูตรเดิม ที่เหลือให้ผลเช่นเดียวกับผลการทดลองในข้อ 2.2

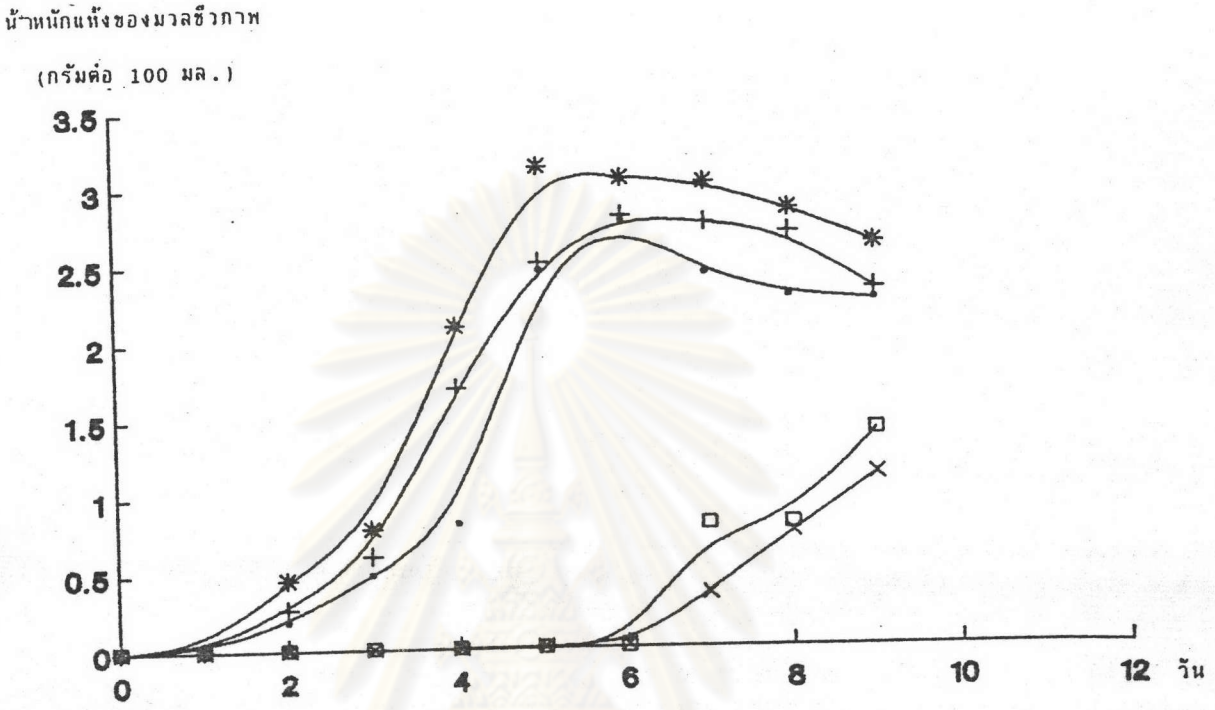
ค่าของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญมีค่าเป็น 25 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีการเจริญ เช่นเดียวกัน ดังแสดงผลในรูปที่ 17

ดังนั้นองค์ประกอบในอาหารและสภาพที่เหมาะสมในการผลิตสเคลอโรกลูแคนจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ มีดังนี้ แป้งมันสำปะหลัง 3.5% โซเดียมไนเตรท 0.8% โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.75 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และผงสกัดยีสต์ 0.8% ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อทำการสกัดแยกแล้ว จะให้ผลผลิตสเคลอ

โรกลูแคนสูงสุดในปริมาณ 1.5% ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ และค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นที่เป็น 5.0 ไปเป็น 2.1 ในเวลา 9 วัน ดังแสดงในรูปที่ 18

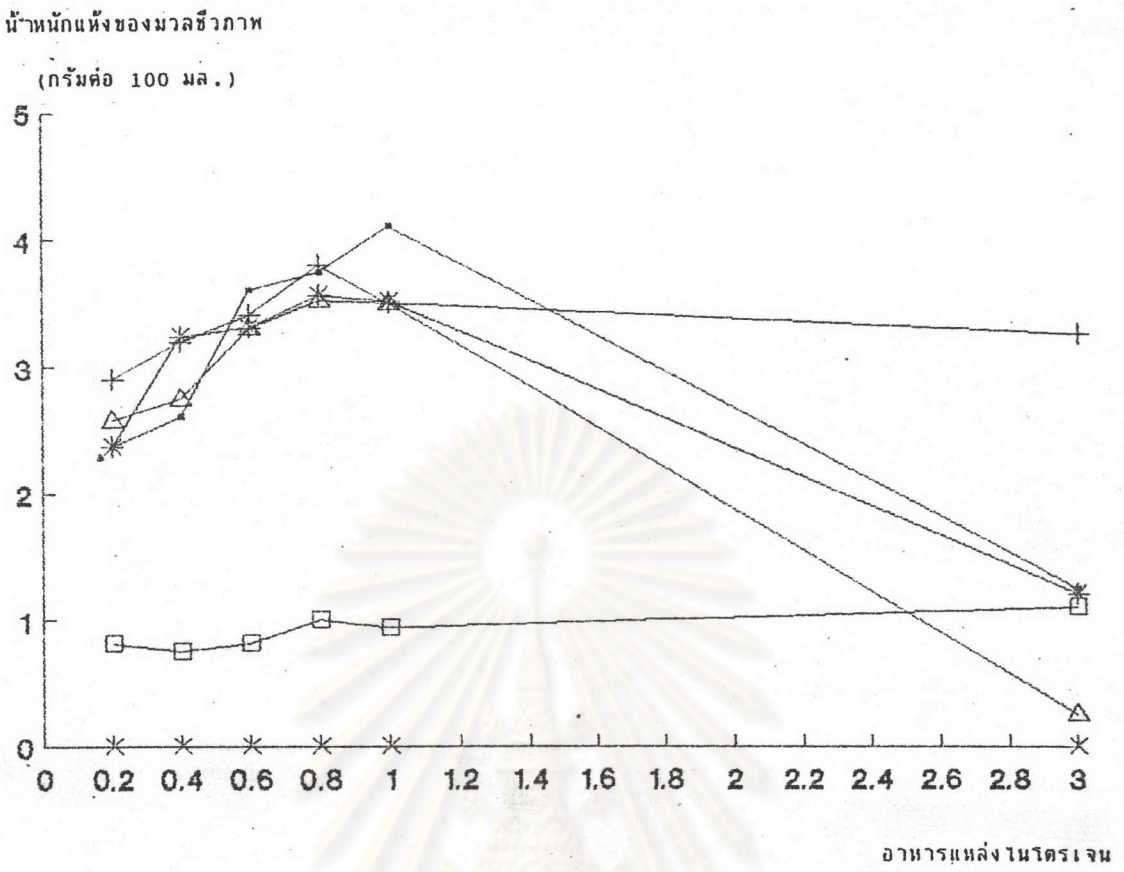
ในขั้นตอนการสกัดแยกนี้ ต้องใช้เอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสในการไฮโดรไลซ์ ส่วนที่เป็นแป้งตกค้าง ซึ่งปนอยู่กับสเคลอโรกลูแคนทั้งไป เพื่อที่จะได้ไม่มีตะกอนของแป้งมาปนเปื้อนในขั้นตอนการตกตะกอนด้วย 95% เอธานอล และยังพบว่าพ้นจากวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อเป็นต้นไป เมื่อนำส่วนที่เป็นสารละลายส่วนใส จากขั้นตอนการสกัดแยกมาทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน ปรากฏว่าให้ผลเป็น negative คือไม่ให้สีน้ำเงินเข้ม ซึ่งแสดงว่าไม่มีส่วนที่เป็นแป้งเหลืออยู่ ดังนั้นในการสกัดแยกหลังจากวันที่ 7 จึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซ์แล้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 : แสดงผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังต่อการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่แปรผันปริมาณดังนี้

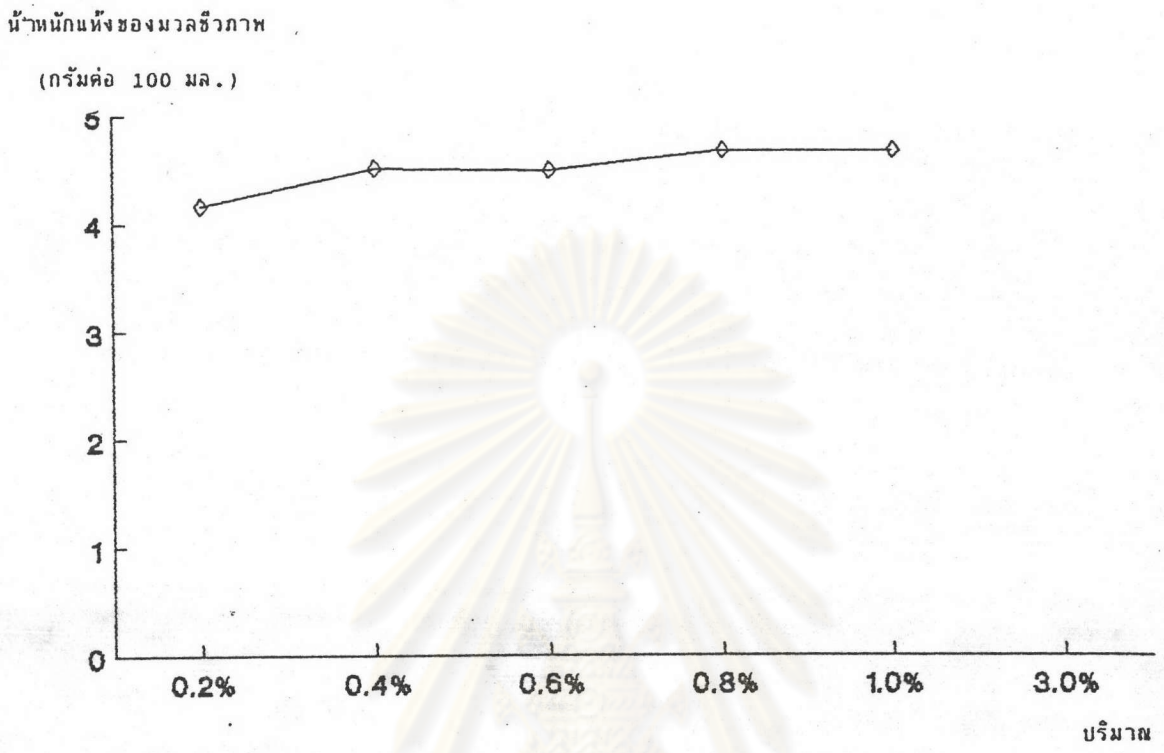
- •——• แสดงถึง ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 2.5 % (กรัมต่อ มล.)
- +——+ แสดงถึง ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 3.0 % (กรัมต่อ มล.)
- *——* แสดงถึง ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 3.5 % (กรัมต่อ มล.)
- □——□ แสดงถึง ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 4.0 % (กรัมต่อ มล.)
- ×——× แสดงถึง ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 5.0 % (กรัมต่อ มล.)



รูปที่ 13: แสดงผลชนิดและปริมาณของแหล่งอาหารไนโตรเจนและแหล่งวิตามินที่เหมาะสมในการเจริญ ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังในปริมาณ 3.5% เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน

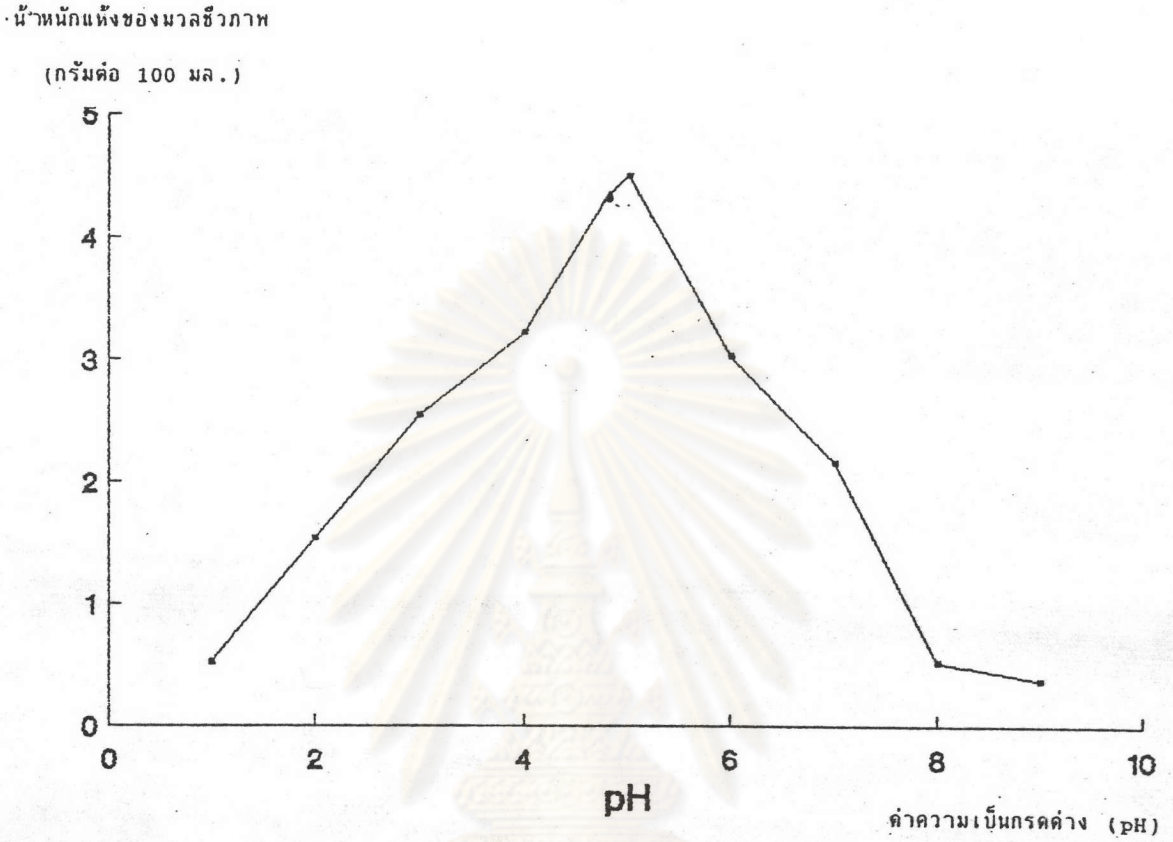
- •——• แสดงถึง ผงสกัดยีสต์
- △——△ แสดงถึง โพลิเปปโตน
- +——+ แสดงถึง โซเดียมไนเตรต
- ✳——✳ แสดงถึง แอมโมเนียมไนเตรต
- □——□ แสดงถึง แอมโมเนียมซัลเฟต
- ×——× แสดงถึง ยูเรีย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



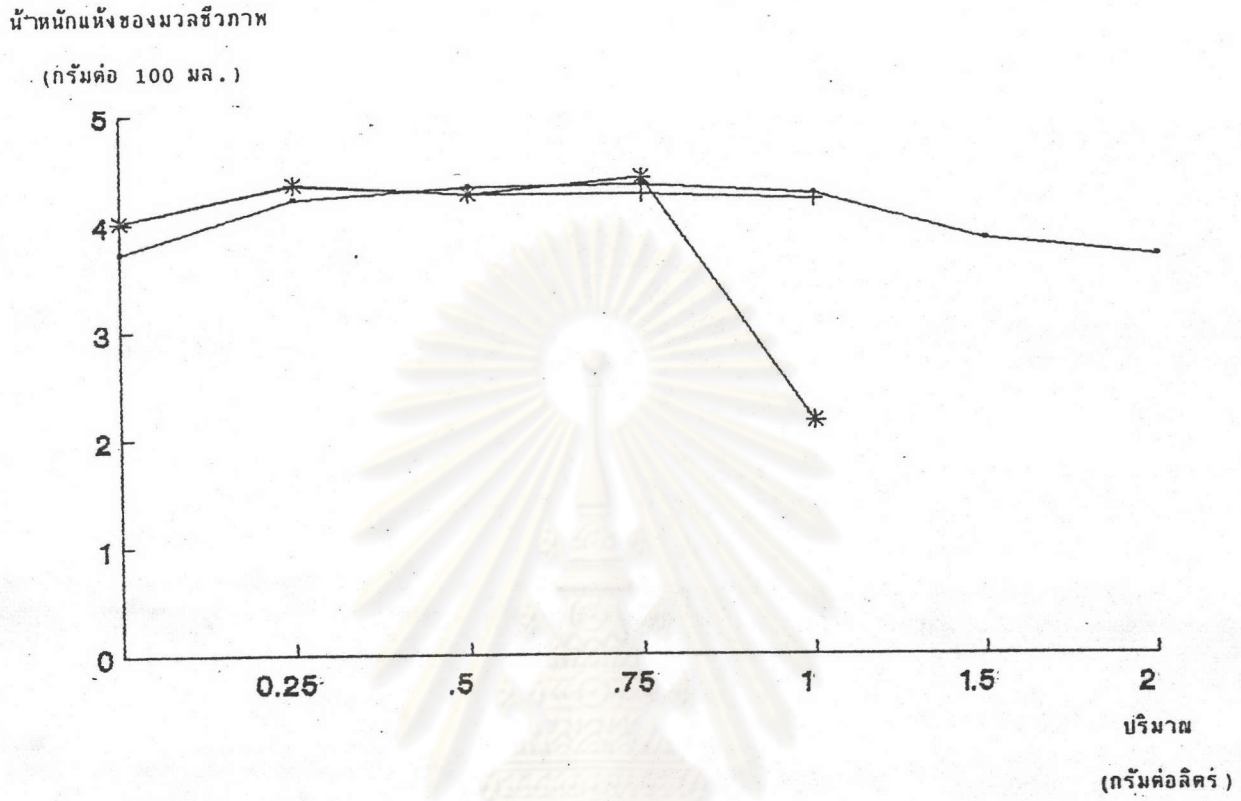
รูปที่ 14 : แสดงผลของสัดส่วนที่เหมาะสมของแหล่งวิตามิน (ผงสกัดยีสต์) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 3.5% และโซเดียมไนเตรต 0.8% เป็นอาหารแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15: แสดงผลของค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 3.5% โซเดียมไนเตรต 0.8% และผงสกัดยีสต์ 0.8% เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



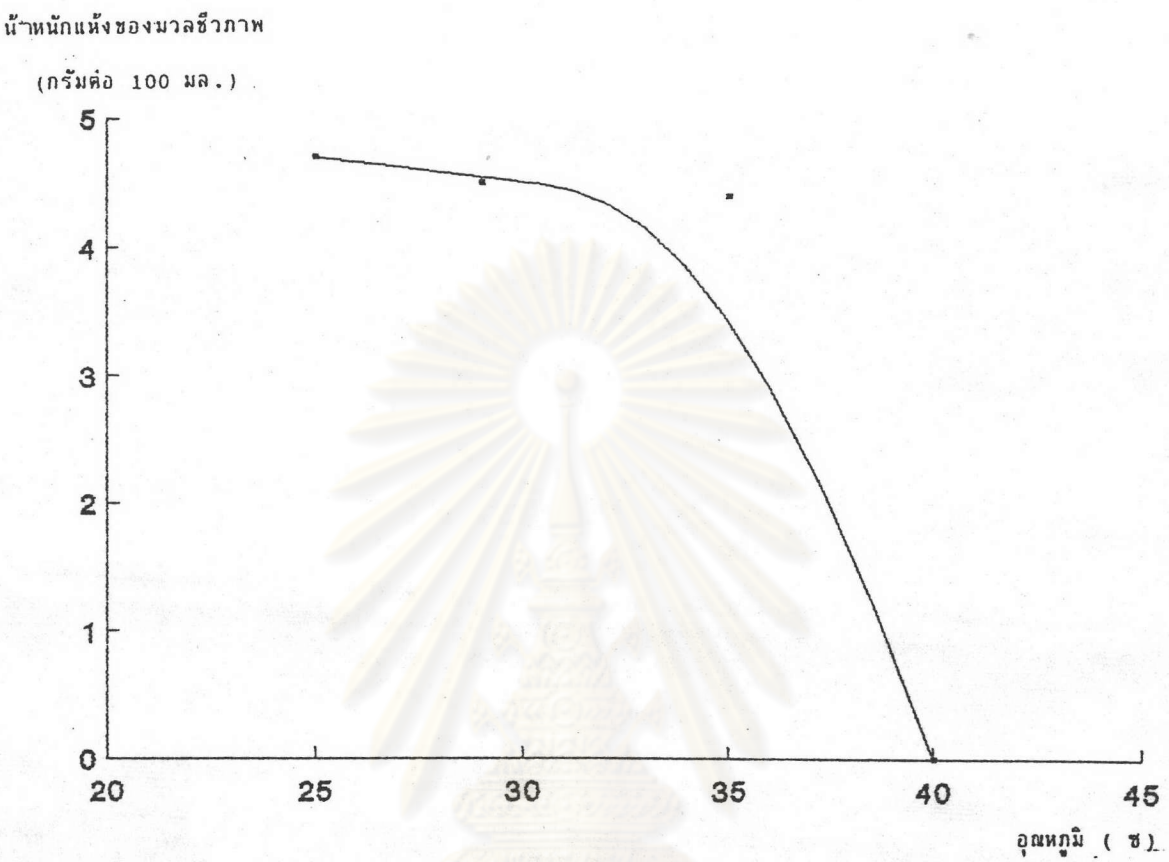
รูปที่ 16 : แสดงผลของชนิดและปริมาณของแร่ธาตุต่าง ๆ ต่อการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณของแป้งมันสำปะหลัง 3.5% โซเดียมไนเตรต 0.8% และผงสกัดยีสต์ 0.8% โดยมีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 โดยแปรผันกรดและแหล่งแร่ธาตุต่าง ๆ ดังนี้

•——• แสดงถึง โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

—— แสดงถึง โปตัสเซียมคลอไรด์

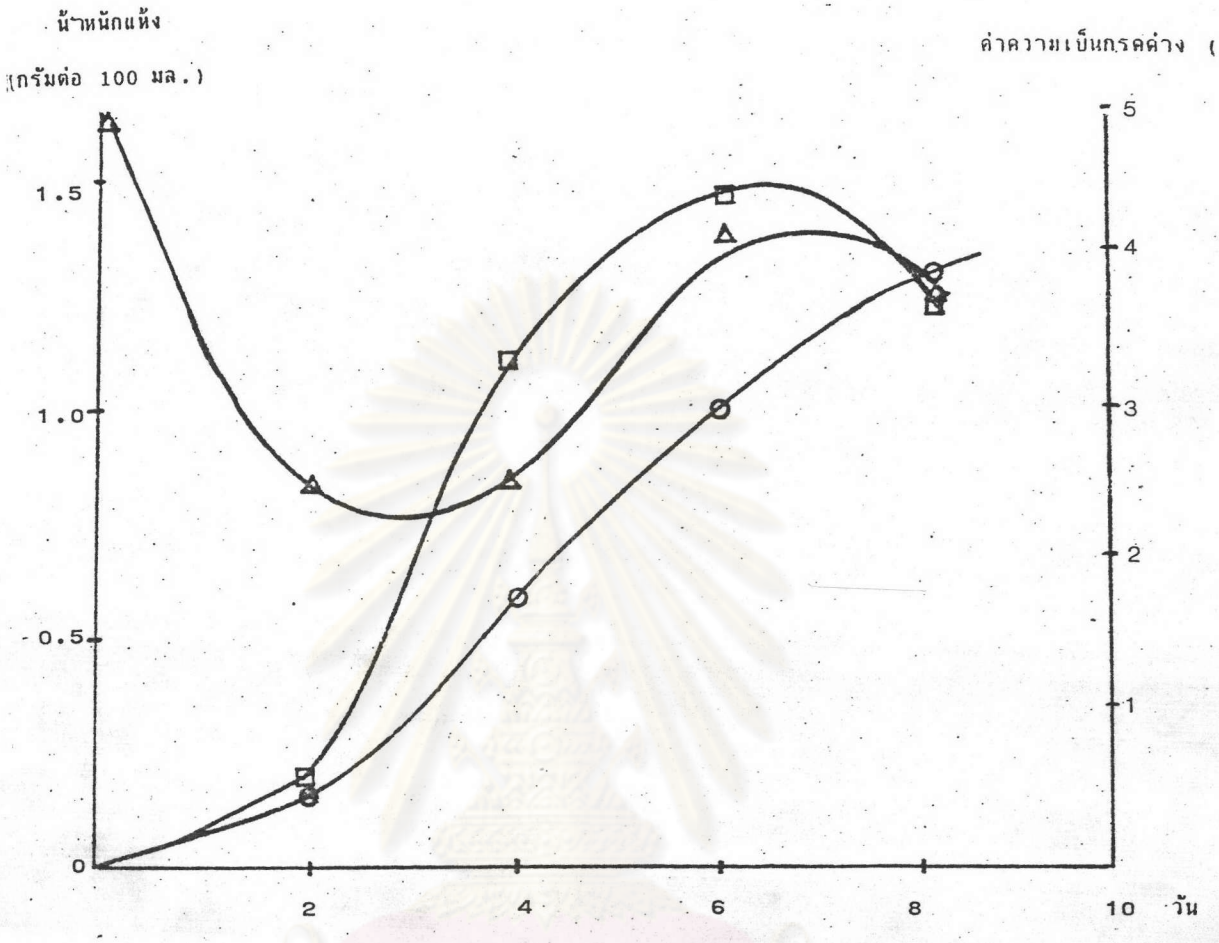
+——+ แสดงถึง แมกนีเซียมซัลเฟต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 : แสดงผลของอุณหภูมิต่อการเจริญโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีปริมาณของแป้งมันสำปะหลัง 5% โซเดียมไนเตรต 0.8% ผงสกัดยีสต์ 0.8% ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5% โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.75% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25% ในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 : แสดงการเจริญและการผลิตสเคลอโรกลูแคนจาก S. rolfsii ในอาหารเหลวที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 3.5% โซเดียมไนเตรต 0.8% ผงสกัดยีสต์ 0.8% โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5% โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.75% และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25% เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

○—○ แสดงถึง น้ำหนักแห้งของเซลล์ (กรัมต่อ 100 มล.)

□—□ แสดงถึง น้ำหนักแห้งของสเคลอโรกลูแคน (กรัมต่อ 100 มล.)

△—△ แสดงถึง ค่าพีเอชที่เปลี่ยนไป

2.3.2 แหล่งคาร์บอนที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์

ปริมาณของน้ำตาลหลังจากนำแป้งมันสำปะหลังไปไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลส และใช้ชนิดและปริมาณของอาหารแหล่งไนโตรเจน วิตามินและแร่ธาตุต่าง ๆ เช่นเดียวกับปริมาณและชนิดของแหล่งอาหารต่าง ๆ ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแป้งมันสำปะหลังในปริมาณ 10.0% หลังจากไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์แล้ว พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 83.95 มก. ต่อ มล. ให้ค่าน้ำหนักแห้งของมวลชีวภาพสูงที่สุดเป็น 3.23 กรัมต่อ 100 มล. เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่จะนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลฟา-อะไมเลสในปริมาณอื่น ๆ โดยที่ในปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 3.5% มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 33.4 มก. ต่อ มล. แป้งมันสำปะหลังปริมาณ 5.0% มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 48.51 มก. ต่อ มล. และแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 15.0% มีน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 139.23 มก. ต่อ มล. ดังแสดงในกราฟรูปที่ 19

ค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมมีค่าเป็น 4.0 ในขณะที่ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเหลวที่ยังไม่มีการปรับค่าพีเอชนั้นมีค่าประมาณ 6.9 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 20

ค่าของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญมีค่าเป็น 35 องศาเซลเซียส ดังแสดงในกราฟรูปที่ 21 และเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีการเจริญเช่นกัน

ดังนั้นองค์ประกอบในอาหารและสภาพที่เหมาะสมในการผลิตสเคลอโรกลูแคนจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลฟา อะไมเลส มีดังนี้ แป้งมันสำปะหลัง 10.0% ที่ไฮโดรไลซ์แล้ว โซเดียมไนเตรท 0.8% โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.75 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และผงสกัดยีสต์ 0.8% ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จากกราฟรูปที่ 22 ผลผลิตสเคลอโรกลูแคนสูงสุดมีค่าเป็น 1.0% ในวันที่ 9 ของการเลี้ยงเชื้อ ค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยมีค่าเป็น 1.37% ในวันที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ และค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นที่ 4.0 มาเป็น 3.12 ในเวลา 8 วัน

จากกราฟแสดงการศึกษาการเจริญ และการผลิตสเคลอโรกลูแคน จากอาหารแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิดนี้ (กราฟรูปที่ 5,11,18 และ 22) จะเห็นได้ว่าในช่วงปลายของ log phase ค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยและสเคลอโรกลูแคนมีค่าลดต่ำลง ในขณะที่ค่าพีเอชในช่วงนี้สูงขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย ปรากฏการณ์นี้สอดคล้องกับรายงานของ Davis และคณะ,1965 ที่รายงานไว้ว่า กรดอินทรีย์ที่ถูกสร้างขึ้นในอาหารและคาร์โบไฮเดรตที่เก็บสะสมไว้ในเส้นใย บางส่วนจะถูกนำมาใช้ในการสร้างโพลีแซคคาไรด์และหลังจากนั้นโพลีแซคคาไรด์ที่ถูกสร้างขึ้นมา เมื่อถึงระยะ stationary phase จะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอนไซม์กลูคาเนส (glucanase) เป็นผลให้ค่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยและโพลีแซคคาไรด์ลดต่ำลง และค่าพีเอชสูงขึ้น เนื่องจากมีการนำกรดอินทรีย์บางส่วนไปใช้ในการผลิตโพลีแซคคาไรด์ และจากการศึกษาของ Kritzman,Chet และ Herid,1977 พบว่าเมื่อเลี้ยง S. rolfsii ในอาหารสังเคราะห์ จะมีการสร้างกรดออกซาลิก (oxalic acid) ออกมาด้วย

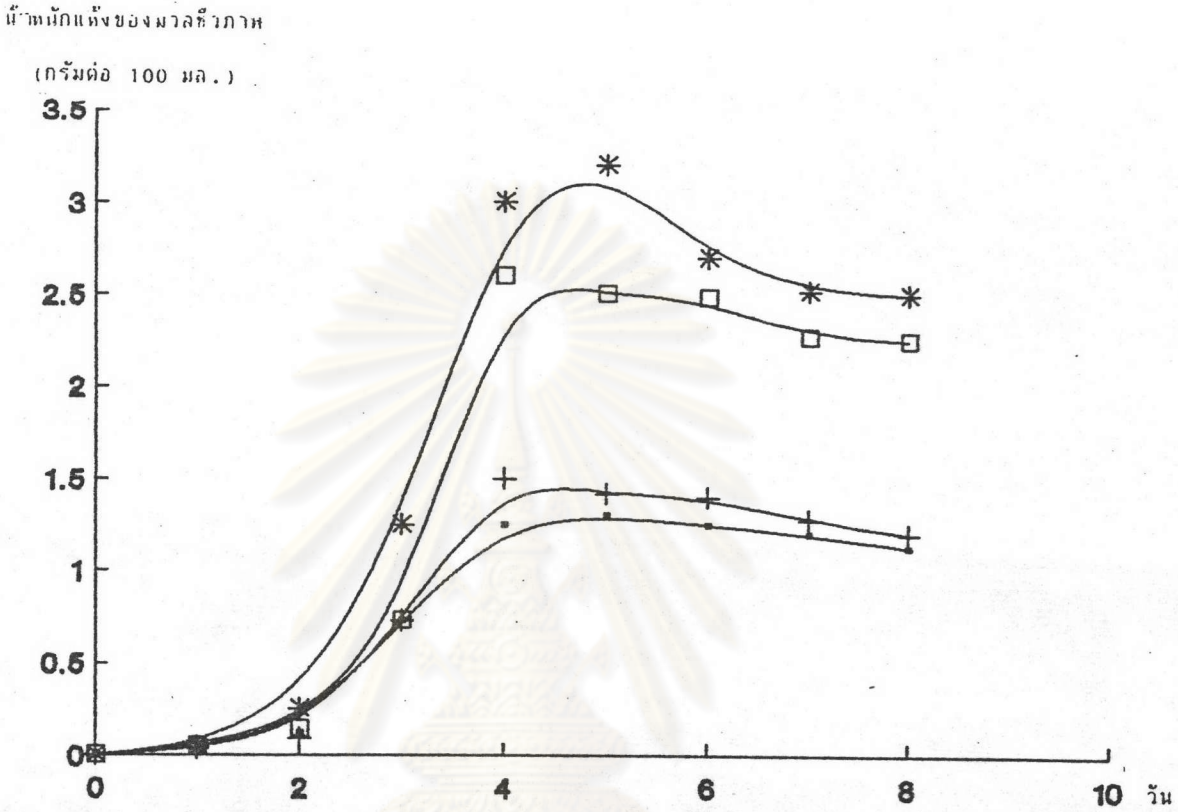
จากการสำรวจเอกสารทั้งหมด ยังไม่พบว่ามีผู้ใดเคยใช้อาหารแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นในการผลิตสเคลอโรกลูแคนจากเชื้อรา S. rolfsii นอกจากกลูโคสเท่านั้น Compere และ Griffith,1978 ได้เคยทำการผลิตสเคลอโรกลูแคนนจาก S. rolfsii ATCC 15206 ในอาหารที่มีองค์ประกอบดังนี้ กลูโคสในปริมาณ 30.0 กรัมต่อลิตร,โซเดียมไนเตรท 3.0 กรัมต่อลิตร,โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร,แมกนีเซียมซัลเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร และผงสกัดยีสต์ (Ambrex 1003) 2.0 กรัมต่อลิตร โดยทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบ Batch ขนาด 14 ลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตสเคลอโรกลูแคนสูงสุด 15 กรัมต่อลิตร หรือ 1.50% ในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้ในระดับขวดเขย่า พบว่าการผลิตสเคลอโรกลูแคนจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย จะให้ผลผลิตสเคลอโรกลูแคนสูงที่สุด เมื่อเทียบกับอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ โดยให้ผลผลิตเป็น 2.21% ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีสูตรอาหารที่ใช้ดังนี้ น้ำตาลทราย 10.0% โปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร โปตัสเซียมคลอไรด์ 0.25 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และผงสกัดยีสต์ 1.0% ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าปริมาณของสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้สูงกว่าของ Compere และ Griffith คิดเป็นร้อยละ 0.7 และปริมาณของแร่ธาตุที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ก็มีค่าน้อยกว่าครึ่งหนึ่งด้วยนับว่าได้ผลดีกว่า แต่จากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่ามีข้อเสียเปรียบคือ การใช้ผงสกัดยีสต์เป็นอาหารแหล่งไนโตรเจน ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง คือ 1.0% หรือ 10 กรัมต่อลิตร เนื่องจากผงสกัดยีสต์มีราคาแพงซึ่งถ้าจะมีการนำไปใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมนั้น จะต้อง

ใช้ในปริมาณที่มาก ทำให้เสียค่าใช้จ่ายสูง อย่างไรก็ดี การใช้น้ำตาลทรายหรือการเตรียมกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลังอาจเป็นการลดค่าใช้จ่าย เมื่อเทียบกับการใช้กลูโคสเป็นอาหารแหล่งคาร์บอนและในขณะเดียวกัน การใช้กากน้ำตาลในการผลิตสเคลอโรกลูแคนก็เป็นอีกจุดหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ในการเพาะเลี้ยง S. rolfsii เพื่อผลิตสเคลอโรกลูแคนนั้น พบว่าในสภาพที่เหมาะสมที่ใช้ผลิตนั้นไม่ต้องเติมแหล่งอาหารชนิดใดลงไปเลย ก็สามารถให้ผลผลิตสเคลอโรกลูแคนที่สูงได้

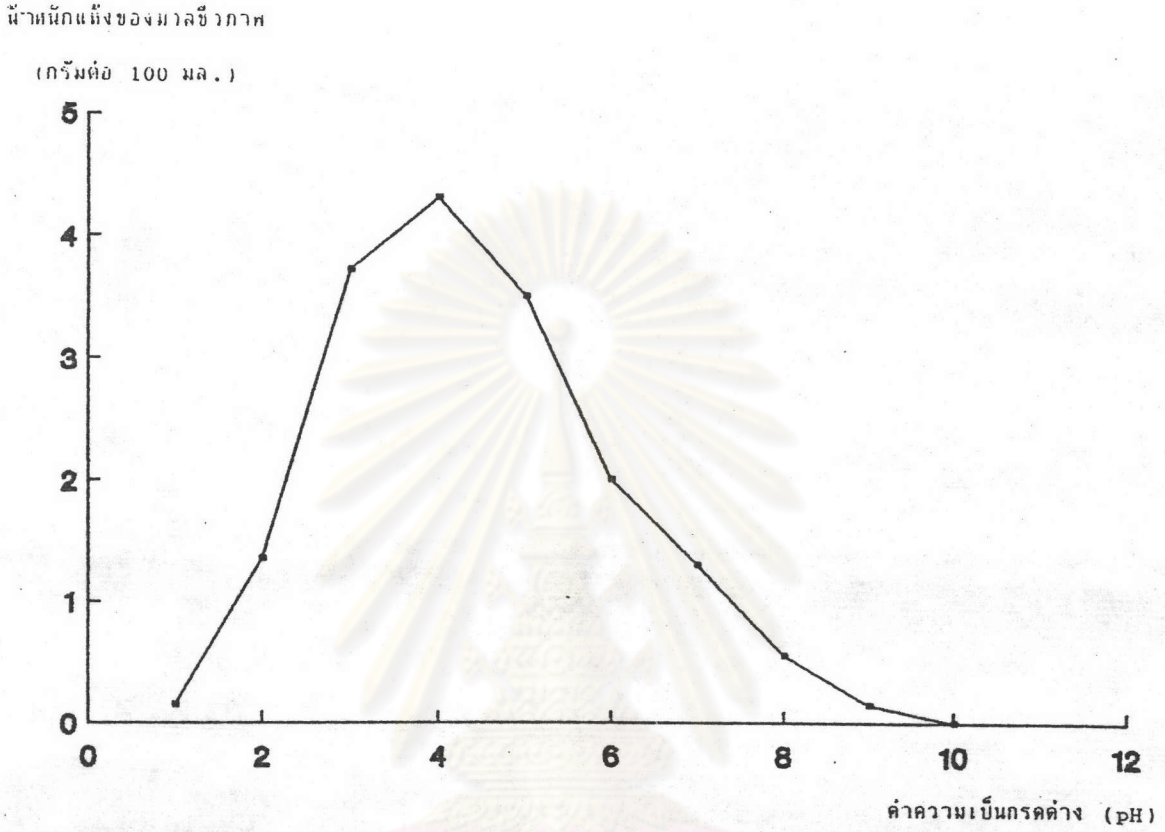
จากผลการศึกษาการเจริญ จะเห็นได้ว่าค่าพีเอชใน culture broth จะมีค่าลดลง และในขณะเดียวกันผลผลิตที่ได้และน้ำหนักแห้งของเส้นใยก็ลดลง ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่อาจเป็นไปได้ เมื่อจะมีการผลิตสเคลอโรกลูแคน คือ ควรจะรักษาพีเอชที่เหมาะสมให้คงที่ตลอดการหมัก ซึ่งอาจใช้ในรูปของการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



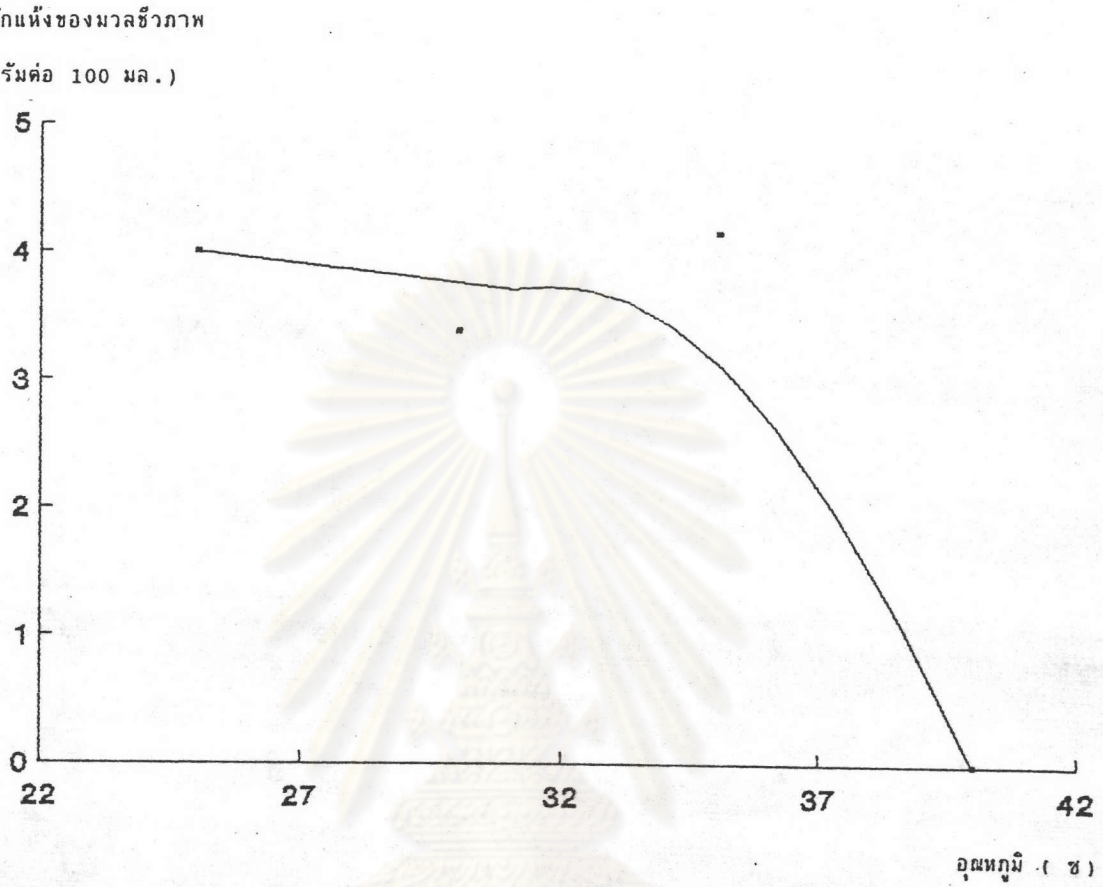
รูปที่ 19 : แสดงผลของปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสต่อการเจริญ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่แปรผันมีปริมาณดังนี้

- •——• แสดงถึง ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่นำไปไฮโดรไลซ์ 3.5% (กรัมต่อ มล.)
- +——+ แสดงถึง ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่นำไปไฮโดรไลซ์ 5.0% (กรัมต่อ มล.)
- ✳——✳ แสดงถึง ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่นำไปไฮโดรไลซ์ 10.0% (กรัมต่อ มล.)
- □——□ แสดงถึง ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่นำไปไฮโดรไลซ์ 15.0% (กรัมต่อ มล.)



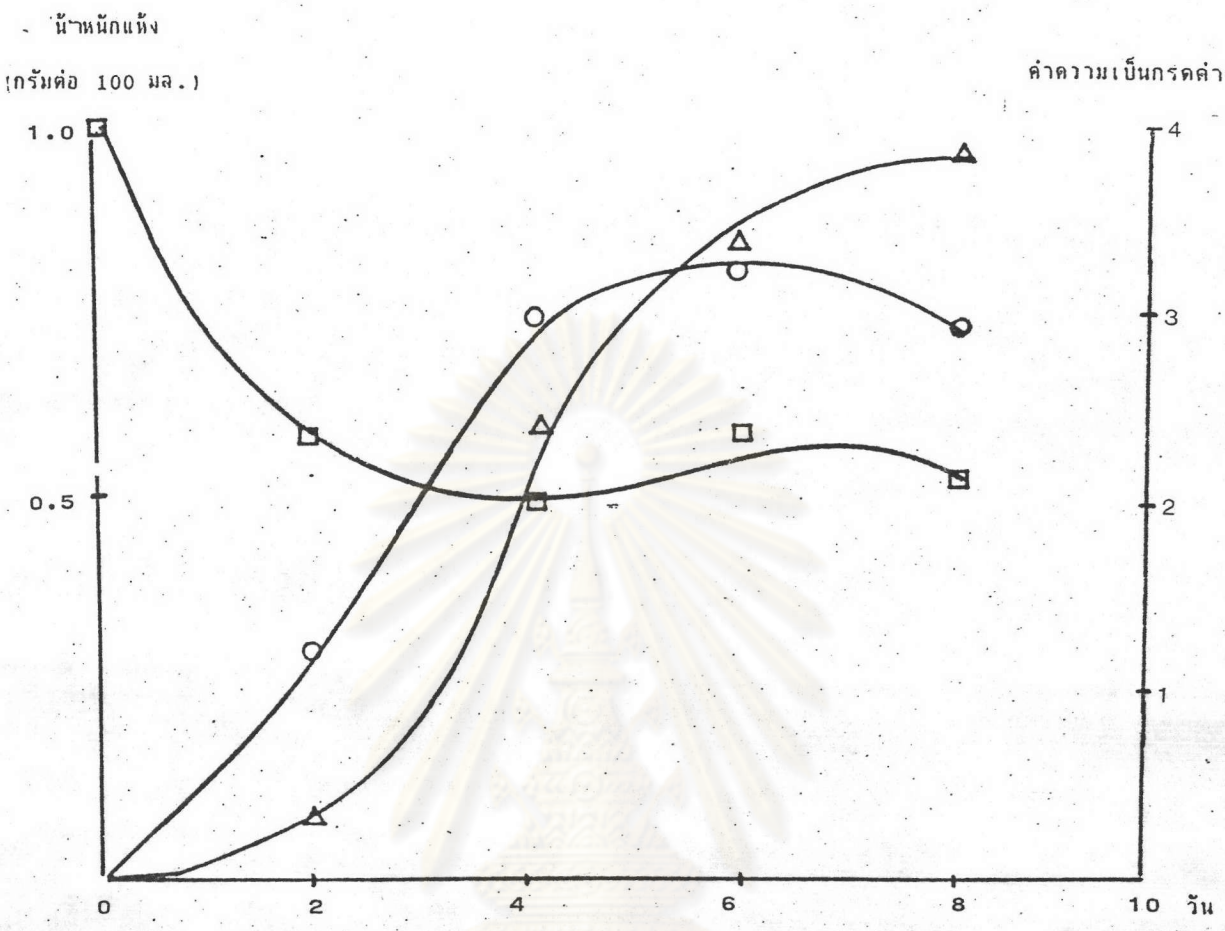
รูปที่ 20 : แสดงผลของค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารต่อการเจริญ โดยมีแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 10.0% ที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 : แสดงผลของอุณหภูมิที่ต่อการเจริญ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 10.0% ที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส มีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 : แสดงการเจริญและการผลิตสเคลอโรกลูแคนจาก S. rolfsii ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 10.0% ที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส เป็นอาหารแหล่งคาร์บอน เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที

O—O แสดงถึง น้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัมต่อ 100 มล.)

△—△ แสดงถึง น้ำหนักแห้งของสเคลอโรกลูแคน (กรัมต่อ 100 มล.)

□—□ แสดงถึง ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลง

3. การตรวจสอบประจุและปริมาณน้ำตาลในสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

จากการตรวจสอบประจุบนสเคลอโรกลูแคน ที่แยกสกัดได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยใช้สารละลาย 10% cpc พบว่าสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนทั้งหมดนี้ มีลักษณะประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) ที่สอดคล้องกับคำรายงานของ Paul,1979

เมื่อนำสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนทั้งหมด มาย่อยสลายและตรวจวิเคราะห์น้ำตาล โดยทำการไฮโดรไลซ์อย่างสมบูรณ์ แล้วนำมาตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก พบว่าสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย แป้งมันสำปะหลังไม่ไฮโดรไลซ์และแป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลซ์ มีค่าของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ในช่วง 85-89% ดังนั้นมีเพียงส่วนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตเพียง 11-15% ในขณะที่สเคลอโรกลูแคนที่ผลิตจากกากน้ำตาล มีปริมาณน้ำตาลเพียง 63.25% ซึ่งมีส่วนประกอบอื่นที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตถึง 36.75% ผลดังแสดงในตารางที่ 4 และเมื่อทำการตรวจสอบหาปริมาณกลูโคสที่เป็นองค์ประกอบของสเคลอโรกลูแคน พบว่าในสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย มีปริมาณกลูโคสสูงสุด คือ 88.07% รองลงมาคือ แป้งมันสำปะหลังไม่ไฮโดรไลซ์,แป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ และกากน้ำตาล ตามลำดับ และการที่พบปริมาณกลูโคสน้อยที่สุดในสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากกากน้ำตาล คือ มีค่ากลูโคสเพียง 70.14% นั้น แสดงให้เห็นว่ามีสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่ติดอยู่ในปริมาณค่อนข้างมาก อาจติดมากับกากน้ำตาลที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบอื่น ๆ ปนอยู่มาก ดังที่ Oura,1983 รวบรวมไว้

จากนั้นนำผงสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนของทั้งหมด มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีของ Prem และ Roy,1974 พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดได้จากสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ และแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ มีค่าเพิ่มขึ้นจากขั้นตอนที่ยังไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์เล็กน้อย คือ ประมาณ 0.43-1.36% ดังแสดงในตารางที่ 5 ส่วนสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ตรวจพบ มีค่าเพิ่มขึ้น 9.94% แสดงว่าขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Prem และ Roy นี้สามารถกำจัดส่วนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต หรือ impurity ได้ค่อนข้างดี ส่วนปริมาณกลูโคสที่ตรวจพบในขั้นตอนนี้ ก็ให้ผลในทำนองเดียวกันกับค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่วัดได้

3.1 การตรวจสอบการมีขั้ว

จากการทดลองหาค่า EEO พบว่าไม่สามารถดำเนินงานได้ เพราะสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมนั้น ไม่สามารถเตรียมให้เป็นเจลถาวรได้ แม้จะเพิ่มความ

เข้มข้นของสเคลอโรกลูแคนหรือทำการลดอุณหภูมิใน Electrophoretic chamber แล้วก็ตาม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แหล่งอาหารที่ใช้ผลิตสเคลอโรกลูแคน	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณกลูโกส (เปอร์เซ็นต์)
กากน้ำตาล	63.25	75.76	70.14
น้ำตาลทราย	89.71	88.42	88.07
แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์	85.21	85.12	84.87
แป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วย enzyme	86.09	84.75	84.51

ตารางที่ 4 : แสดงผลการวิเคราะห์น้ำตาลของสเคลอโรกลูแคนที่แยกสกัดได้จาก S. rolfsii ที่เจริญในอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในรูปที่ยังไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (crude)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แหล่งอาหารที่ใช้ผลิตสเคลอโรกลูแคน	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณกลูโกส (เปอร์เซ็นต์)
กากน้ำตาล	73.19	80.90	70.31
น้ำตาลทราย	90.14	88.76	90.60
แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์	86.13	88.04	89.54
แป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วย enzyme	87.45	85.53	85.62

ตารางที่ 5 : แสดงผลการวิเคราะห์น้ำตาลของสเคลอโรกลูแคนที่แยกสกัดได้จาก S. rolfsii ที่เจริญในอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ในรูปที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การศึกษาคุณสมบัติบางประการ

4.1 การศึกษาสมบัติการอุ้มน้ำต่ออุณหภูมิ

จากการศึกษาของอุณหภูมิต่าง ๆ ที่ 40,50,60 และ 80 องศาเซลเซียส ที่นำไปใช้ในการอบสเคลอโรกลูแคนที่อยู่ในรูปเจล จนมีค่าน้ำหนักแห้งคงที่ แล้วนำไปทดสอบหาความสามารถในการอุ้มน้ำ โดยคำนวณความสามารถในการอุ้มน้ำเป็นน้ำหนักของน้ำ (กรัม) ที่ถูกอุ้มหรือดูดซึมไว้ด้วยสเคลอโรกลูแคนปริมาณ 10 กรัมโดยน้ำหนักแห้ง ดังแสดงผลในตารางที่ 6 จากผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นค่าอุณหภูมิที่รักษาความสามารถในการอุ้มน้ำไว้ได้มากที่สุด โดยจะอยู่ในช่วงที่สามารถอุ้มน้ำไว้ได้ 22-25% (ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของสเคลอโรกลูแคน) ที่อุณหภูมิสูง ๆ ขึ้นไปค่าความสามาถในการอุ้มน้ำก็จะลดต่ำลงตามลำดับ และผลการทดลองจากสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ได้ไฮโดรไลซ์ พบว่ามีความสามารถในการอุ้มน้ำสูงที่สุด โดยมีค่าความอุ้มน้ำ 25.214% ในขณะที่สเคลอโรกลูแคนจากแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหลือ มีความสามารถอยู่ในช่วง 22.24-22.26% แต่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่าสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทรายนั้น มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำสูงที่สุด คือ 7.721% เมื่อเทียบกับสเคลอโรกลูแคนจากแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหลือ ที่มีความสามารถในการอุ้มน้ำอยู่ในช่วง 6.4-6.9% เท่านั้น

4.2 การเปรียบเทียบค่าความหนืดของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

จากการนำสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ มาผ่านขั้นตอนการสกัด แล้วเตรียมเป็นสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่ความเข้มข้น 0.5% โดยละลายในน้ำที่ปราศจากอิออน นำไปวัดความหนืดโดยเครื่อง viscometer ผลการทดลองพบว่า สารละลายสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล น้ำตาลทราย และแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ ให้ค่าความหนืดใกล้เคียงกันคือ 137.00,128.00,132.00 cp ตามลำดับ ในขณะที่สารละลายสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ ให้ค่าความหนืดเพียง 55.00 cp ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 7

หน่วยพื้นฐานที่ใช้ในการวัดความหนืด คือ "poise"

จากสมการค่าความหนืด (viscosity)

$$\text{viscosity} = n = \frac{\text{shear stress}}{\text{shear rate}} = \frac{F'}{S}$$

โดยที่ : shear stress (F') หมายถึง แรงต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ที่ทำให้เกิด shearing action มีหน่วยเป็น dynes ต่อ ตร.ซม.

: shear rate (S) หมายถึง สัดส่วนของความเร็วของชั้นของสารละลายที่เคลื่อนที่ มีหน่วยเป็น reciprocal second (sec^{-1})

ดังนั้นค่าความหนืด 1 poise หรือ 100 centripoise (cp) หมายถึง สารละลายที่ต้องใช้ shear stress 1 dynes ต่อ ตร.ซม. เพื่อให้เกิด shear rate ต่อ 1 วินาที (The Brookfield Viscometer "more Solution to Sticky problems)

4.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความหนืด

จากการเตรียมสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่มีความเข้มข้น 0.07% (Bluhm และคณะ,1982) และไปบ่มที่อุณหภูค่าต่าง ๆ แล้วนำมาพิจารณาค่าความหนืดที่เปลี่ยนไป พบว่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ค่าความหนืดสูงขึ้นเมื่อเทียบกับอุณหภูมิห้อง ดังแสดงผลในรูปที่ 23 สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ได้ค่าความหนืดสูงขึ้น 30.37% เมื่อเทียบกับความหนืดที่อุณหภูมิห้อง และในทำนองเดียวกัน สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย ให้ค่าความหนืด 24.76% ที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็น แป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ให้ค่าความหนืดสูงขึ้น 14.91% และเตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ ให้ค่าความหนืดสูงขึ้น 32.10% จากรายงานของ Bluhm และคณะ ที่รายงานไว้ว่าค่าความหนืดของสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่ความเข้มข้น 0.72 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส จะทำให้ค่าความหนืดสูงขึ้น ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Bluhm และคณะ

ในช่วงอุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) จนถึงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าความหนืดยังมีค่าคงเดิม ซึ่งสอดคล้องเป็นบางส่วนกับรายงานของ Paul,1979 ที่รายงานไว้ว่าสารละลายสเคลอโรกลูแคนมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง

แต่หลังจากอุณหภูมิมีค่าสูงขึ้นเป็น 100 องศาเซลเซียส และ 121 องศาเซลเซียส พบว่าค่าความหนืดจะลดลง โดยที่ 121 องศาเซลเซียส สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็น กากน้ำตาล น้ำตาลทราย แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ และไฮโดรไลซ์ จะสูญเสียความหนืดจากเดิมตามลำดับดังนี้ 50.08,61.81, 49.21 และ 61.60% และทำนองเดียวกันที่อุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส จะสูญเสียความหนืดจากเดิมตามลำดับดังนี้ 24.21,57.05,14.03 และ 30.72% ในขณะที่ Blanshard และ Mitchell,1979 ได้รายงายเปรียบเทียบไว้ว่าที่อุณหภูมิ 90 องศา

เซลเซียส เวลานาน 500 วัน สเคลอโรกลูแคนยังคงรักษาสภาพความหนืดเดิมไว้ได้ถึง 90% แต่จากผลการทดลองพบว่า เมื่อทดลองบ่มสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลานาน 20 นาที สเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้สามารถรักษาค่าความหนืดเดิมได้เพียง 86-43% เท่านั้น

Milas และ Rinando รายงานไว้ว่าการที่อุณหภูมิมีผลต่อความหนืดของสารละลายสเคลอโรกลูแคนนั้น เกิดขึ้นจากอุณหภูมิทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเดิมของกลูโคสเรซิดิวซ์ และการจับตัวของน้ำในโครงสร้างที่เป็น triple helix

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สเคลอโรกลูแคนที่ผลิตจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความสามารถในการอุ้มน้ำ น้ำหนักของน้ำ (กรัม) ต่อ 10 กรัมน้ำหนักแห้ง
อาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย	40	2.2641
	50	2.0846
	60	1.1325
	80	0.7721
อาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล	40	2.2465
	50	2.0917
	60	1.2076
	80	0.6867
อาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลัง ที่ไม่ไฮโดรไลซ์	40	2.5214
	50	2.0092
	60	1.2042
	80	0.6434
อาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์	40	2.2464
	50	2.0844
	60	1.2073
	80	0.6959

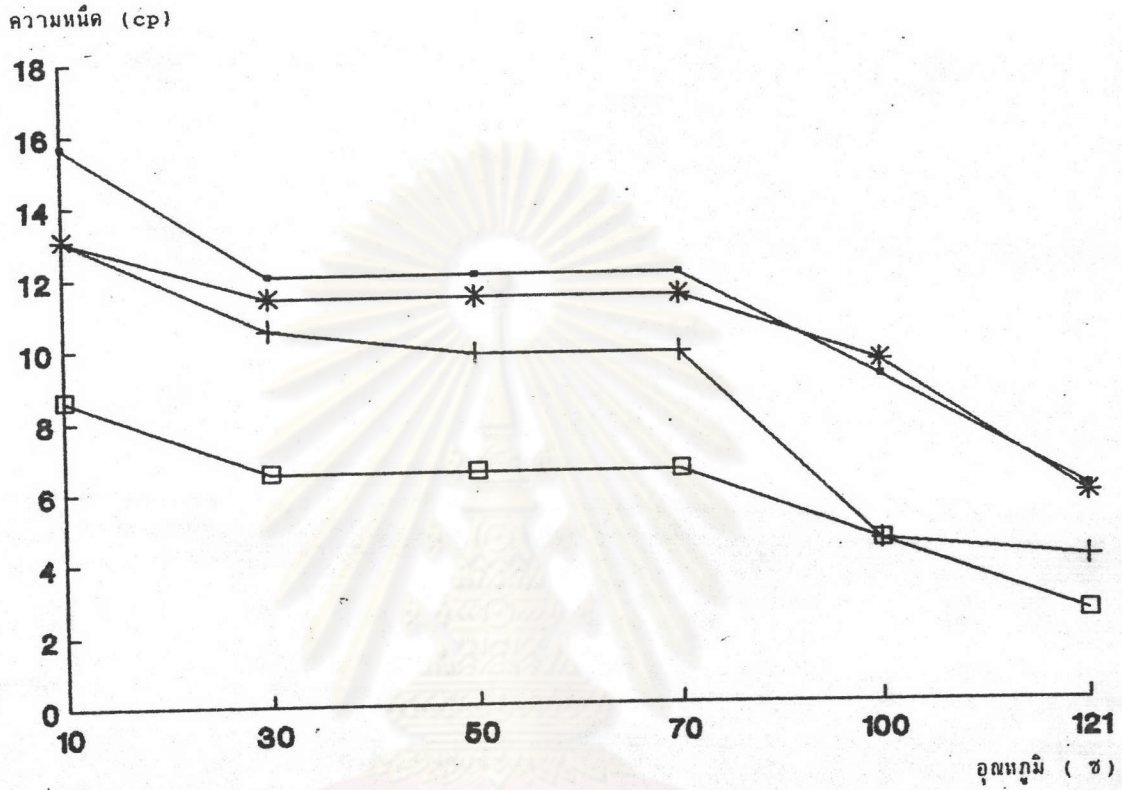
ตารางที่ 6 : แสดงผลเปรียบเทียบความสามารถในการอุ้มน้ำ (imbibition property) ของสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตจากอาหารแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ต่อค่าอุณหภูมิที่แปรผันเป็น 40,50,60 และ 80 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แหล่งอาหารคาร์บอนที่ใช้ผลิตสเคลอโรกลูแคน	ค่าความหนืด
กากน้ำตาล	137.00
น้ำตาลทราย	128.00
แป้งมันสำปะหลังไม่ไฮโดรไลซ์	132.00
แป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลซ์	55.00

ตารางที่ 7 : แสดงค่าความหนืดเปรียบเทียบของสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยมีความเข้มข้นของสารละลาย 0.5% วัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง viscometer โดยใช้ spindle ขนาด No. 2 ความเร็ว spindle เป็น 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 : แสดงผลของอุณหภูมิต่อความหนืดของสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยมีความเข้มข้นของสารละลาย 0.07% วัดความหนืดโดยใช้เครื่อง viscometer spindle ที่ใช้ขนาด No. 2 ความเร็ว spindle 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

•——• แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล

+——+ แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย

—— แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์

□——□ แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์

4.4 การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อความหนืด

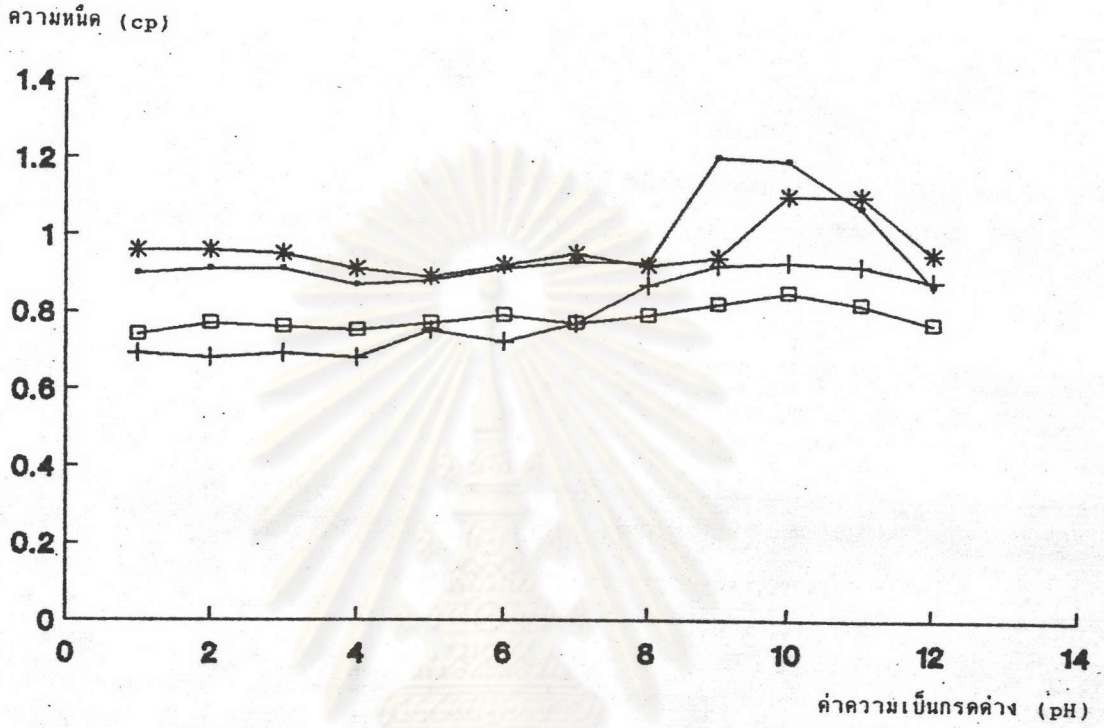
จากการเตรียมสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่มีความเข้มข้น 0.03% โดยละลายในน้ำที่ปราศจากอิออนโดยแปรผันค่าพีเอชตั้งแต่ 1.0-12.0 จากนั้นนำไปวัดค่าความหนืด จากผลการทดลองพบว่า ค่าความหนืดของสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ จะมีค่าค่อนข้างคงที่ ในช่วงพีเอชตั้งแต่ 1.0-8.0 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bluhm และคณะ,1982 บางส่วน ที่กล่าวไว้ว่าความหนืดของสารละลายสเคลอโรกลูแคนจะมีความเสถียรในช่วงค่าพีเอชที่กว้างตั้งแต่ 1.0-12.0 และช่วงค่าพีเอชตั้งแต่ 8.0-11.0 พบว่าค่าความหนืดจะมีค่าสูงขึ้นและค่าความหนืดจะลดต่ำลงเมื่อค่าพีเอชเป็น 12.0 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 24

และจากการศึกษาของ Milas และ Rinando,1987 พบว่าเมื่อละลายสเคลอโรกลูแคนในสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ จะเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสภาพโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคน จากรูปร่างที่เป็น triple helix ไปเป็นแบบขด (coil)

4.5 การศึกษาปริมาณเกลือที่มีผลต่อความหนืด

เตรียมสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่มีความเข้มข้น 0.07% ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่แปรผันความเข้มข้น ผลการทดลองพบว่า สารละลายสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ จะมีค่าความหนืดสูงขึ้นเรื่อย ๆ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 26 ตั้งแต่ช่วงที่มีปริมาณเกลือ 1.0%-2.0% โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของเกลือเป็น 2% จะให้ค่าความหนืดสูงที่สุด และค่าความหนืดจะลดลงอย่างรวดเร็วที่ค่าความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 2.5% ขึ้นไป ซึ่งจากผลการทดลองจะสองคล้องกับรายงานของ Compere และ Griffith,1978

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



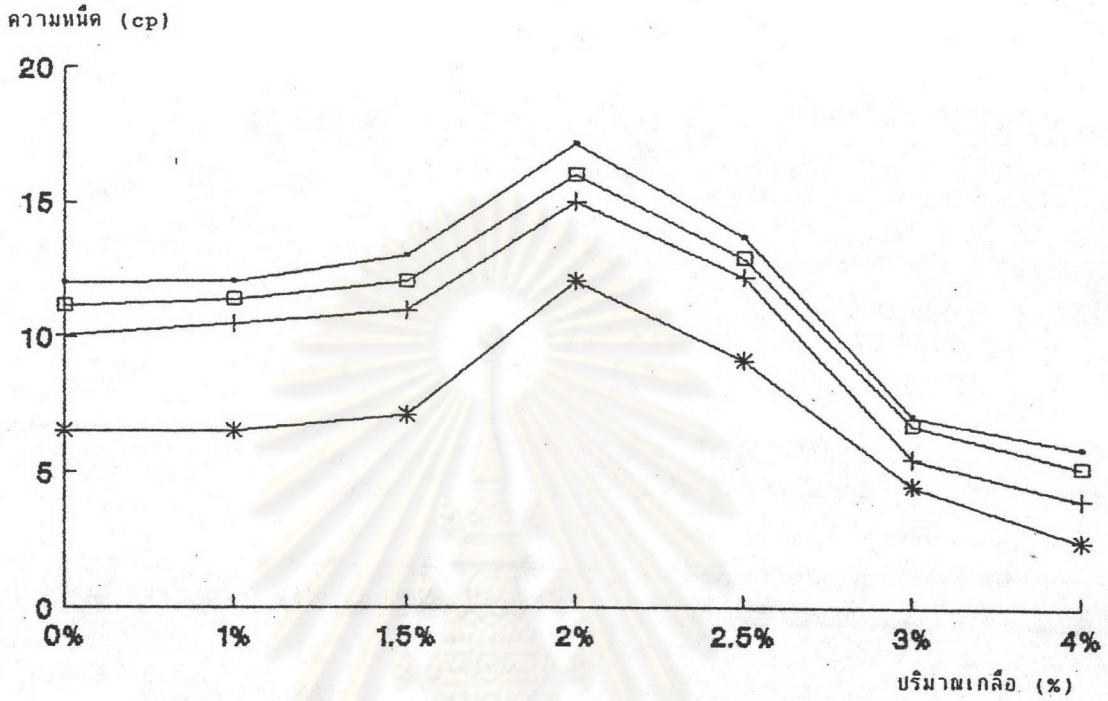
รูปที่ 24 : แสดงผลของค่าพีเอชที่มีผลต่อความหนืดของสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่มีความเข้มข้น 0.03% วัดความหนืดโดยเครื่อง viscometer spindle ที่ใช้ขนาด No. 2 ความเร็วของ spindle 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

●——● แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล

+——+ แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย

—— แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์

□——□ แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์



รูปที่ 25 : แสดงผลของปริมาณเกลือที่มีผลต่อความหนืดของสารละลายสเคลอโรกลูแคนที่มีความเข้มข้น 0.07% วัดความหนืดโดยเครื่อง viscometer spindle ที่ใช้ขนาด No. 2 ความเร็วของ spindle 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

•——• แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล

+——+ แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย

□——□ แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์

✳——✳ แสดงถึง สเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์

4.6 <u>การหาขนาดโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ</u>

การประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยการใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟี ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ จี-200 มาคำนวณหาค่า K_{av} เปรียบเทียบกับเด็กซ์แทรนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 17,200 40,200 153,000 และ 487,000 และกลูโคส ตามวิธีในข้อ 5.6 โดยเรียงลำดับของขนาดโมเลกุลเด็กซ์แทรนมาตรฐาน 4 ชนิด และกลูโคส ดังแสดงในกราฟรูปที่ 26 และจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล และค่า K_{av} ซึ่งแสดงในรูปที่ 27 สามารถประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็น กากน้ำตาล น้ำตาลทราย แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ และแป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลซ์ ได้ดังนี้คือ 120,000 480,000 360,000 และ 380,000 ตามลำดับ โดยแสดงผลโครมาโตกราฟี ในรูปที่ 28,29,30,31

จากรายงานของ Paul,1979 กล่าวไว้ว่า น้ำหนักโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคนอยู่ในช่วงกว้างนั้น ขึ้นอยู่กับชนิด (spicies) ของจุลชีพ ชนิดอาหาร และสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปปริมาณองศาของการโพลีเมอร์ไรซ์ของสเคลอโรกลูแคนจะอยู่ในช่วงกว้าง คือ 110 ถึง 1,600 โดยค่าปริมาณองศาของการโพลีเมอร์ไรซ์มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล ดังอธิบายได้ในสมการ (Busev และ Efimov,1981)

$$nM \text{ ----------} > Mn$$

โดยที่ M เป็นโมเลกุลหน่วยย่อยของโมโนแซคคาไรด์
Mn เป็นโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์
n เป็นปริมาณองศาของการโพลีเมอร์ไรซ์

ดังนั้นเมื่อทราบค่า n ก็สามารถคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของโพลีแซคคาไรด์ได้ โดยที่ต้องทราบน้ำหนักโมเลกุลของส่วนที่เป็นโมโนแซคคาไรด์ก่อน

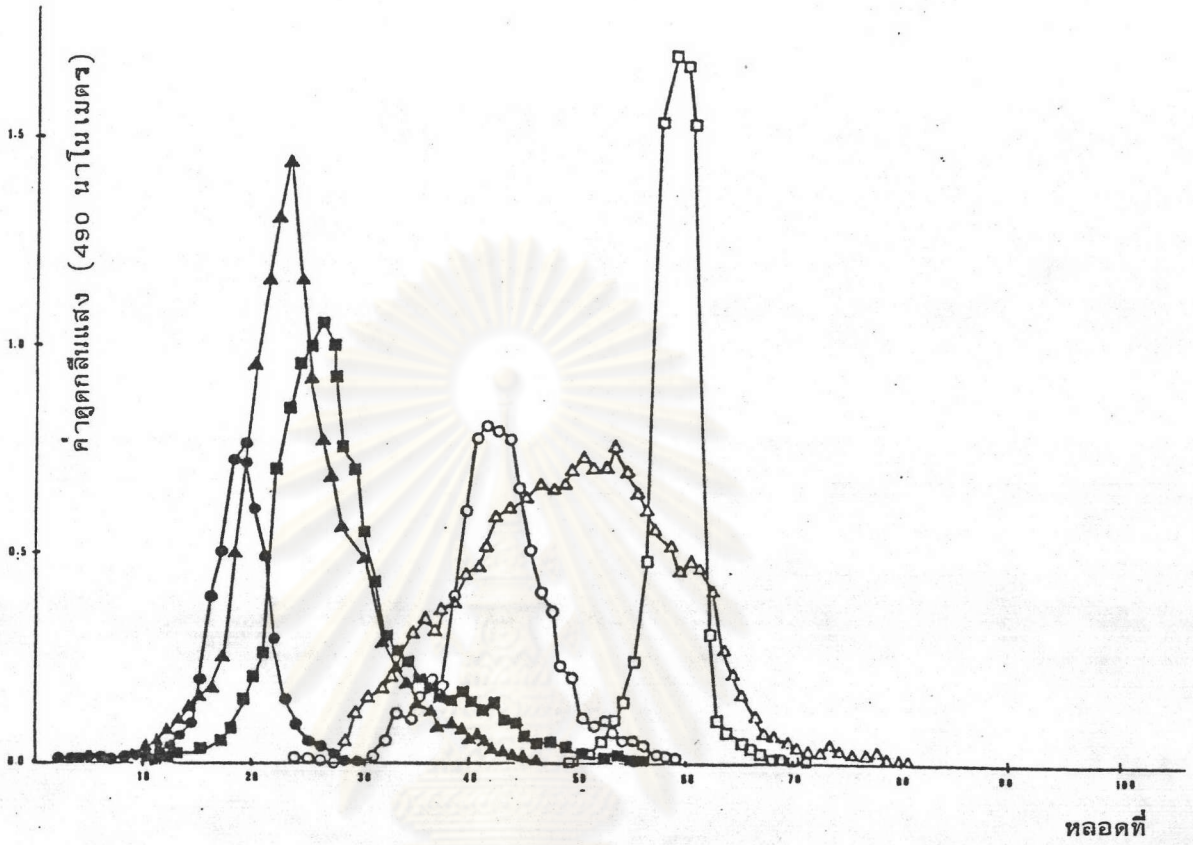
จากความสัมพันธ์ดังกล่าวข้างต้น สามารถคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคนได้ โดยมีกลูโคสเป็นโมโนแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบย่อยของสเคลอโรกลูแคน และมีค่าน้ำหนักโมเลกุลเป็น 180 ดังนั้นจากค่าปริมาณองศาของการโพลีเมอร์ไรซ์ที่อยู่ในช่วง 110-1,600 ก็คือ ช่วงของน้ำหนักโมเลกุลที่มีค่าเป็น 12,800-288,000

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล มีค่าน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงที่ Paul ได้รายงานไว้ ส่วนสเคลอโร

กลูแคนที่ผลิตจากอาหารแหล่งคาร์บอนชนิดที่เหลือ มีค่าสูงกว่าในช่วงที่ Paul ได้รายงานไว้เช่นกัน

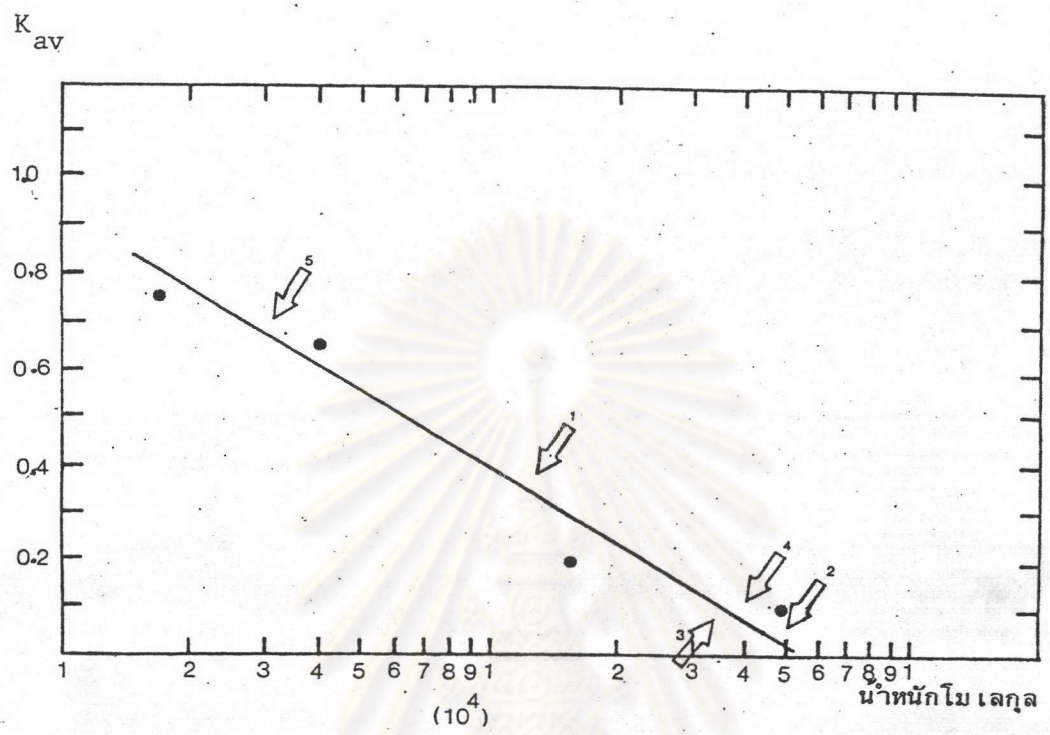
นอกจากนี้ Compere และ Griffith ,1978 รายงานว่าสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตขึ้นใช้ในเชิงพาณิชย์นั้น มีค่าปริมาณองศาของการโพลีเมอร์ไรซ์ประมาณ 800 ซึ่งก็อยู่ในช่วงค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 144,000 ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่าสเคลอโรกลูแคนที่ผลิตได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาลมีค่าใกล้เคียงที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



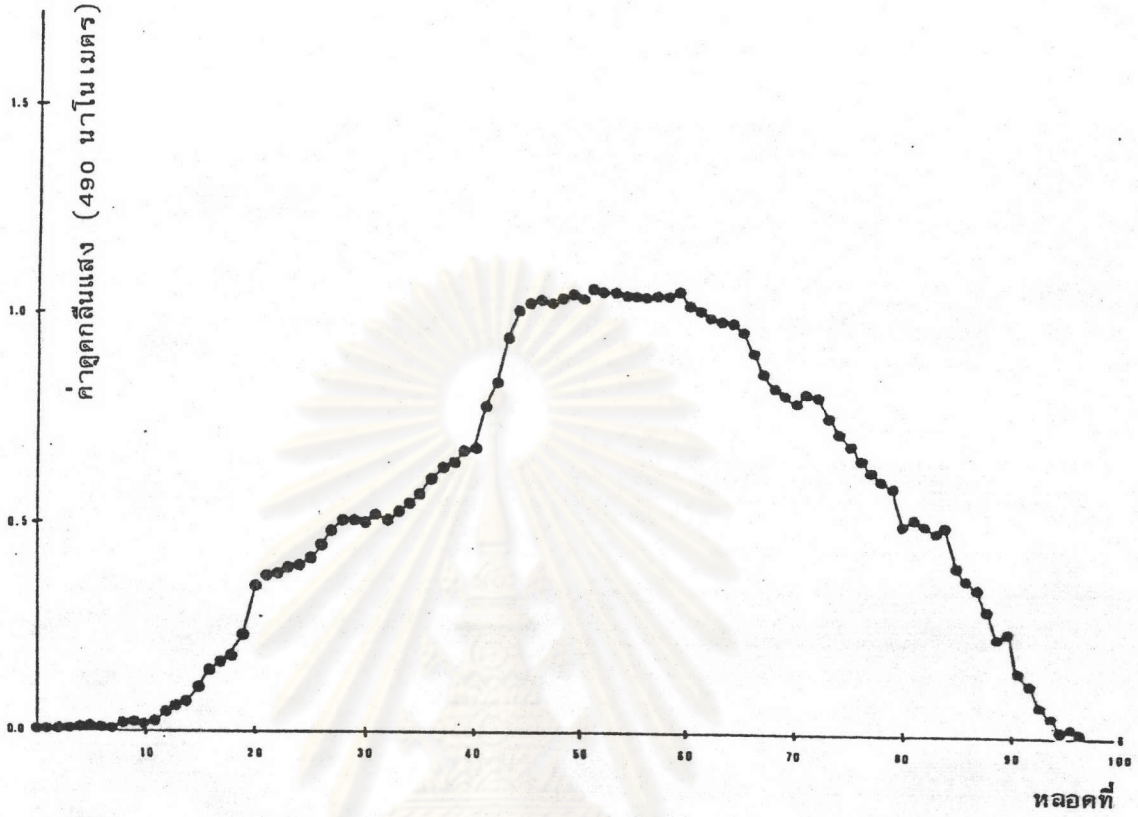
รูปที่ 26 : แสดงโครมาโตกราฟีของเด็กซ์แทรนมาตรฐานและกลูโคส บนเซฟาเด็กซ์ จี-200 โดยผ่านสารละลายเด็กซ์แทรนมาตรฐาน ลงในคอลัมน์ขนาด 2.4x70 ซม. ชะเด็กซ์แทรนมาตรฐานออกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ 0.1 นอร์มอล เก็บสารละลายเด็กซ์แทรนมาตรฐานและกลูโคสหลอดละ 1.5 มล. ที่อัตราการไหล 0.12 มล. ต่อนาที

●—● แสดงถึง บลูเด็กซ์แทรน (น้ำหนักโมเลกุล = 2,000,000)
▲—▲ แสดงถึง เด็กซ์แทรน น้ำหนักโมเลกุล 487,000
■—■ แสดงถึง เด็กซ์แทรน น้ำหนักโมเลกุล 153,000
○—○ แสดงถึง เด็กซ์แทรน น้ำหนักโมเลกุล 40,200
△—△ แสดงถึง เด็กซ์แทรน น้ำหนักโมเลกุล 17,200
□—□ แสดงถึง กลูโคส (น้ำหนักโมเลกุล 180)



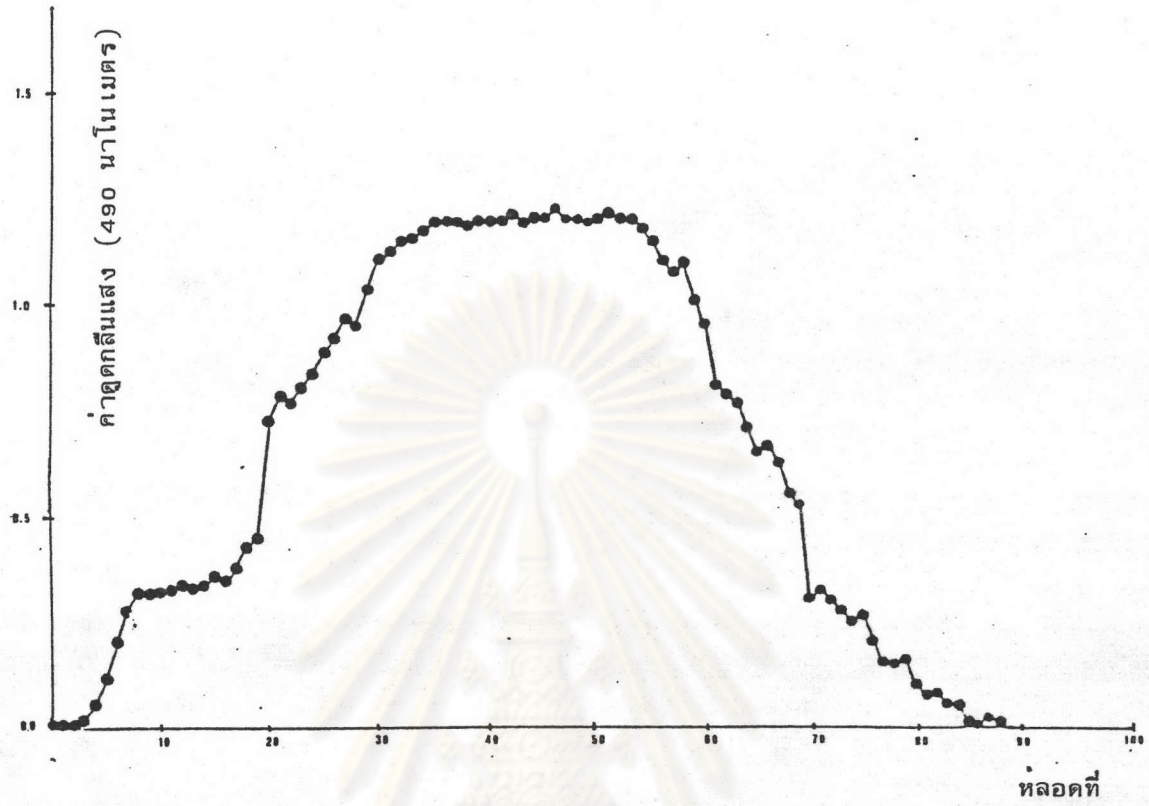
รูปที่ 27 : กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักโมเลกุลและค่า K_{av} โดยเปรียบเทียบกับเด็กซ์แทรนมาตรฐานที่มีขนาดโมเลกุลดังนี้ 487,000 153,000 40,200 10,700 (●)

1 แสดงถึง ค่า K_{av} ของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจาก กากน้ำตาล
2 แสดงถึง ค่า K_{av} ของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจาก น้ำตาลทราย
3 แสดงถึง ค่า K_{av} ของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจาก แป้งมันสำปะหลังไม่ไฮโดรไลซ์
4 แสดงถึง ค่า K_{av} ของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจาก แป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลซ์
5 แสดงถึง ค่า K_{av} ของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจาก แป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลซ์ที่ผ่านการย่อยสลายบางส่วน



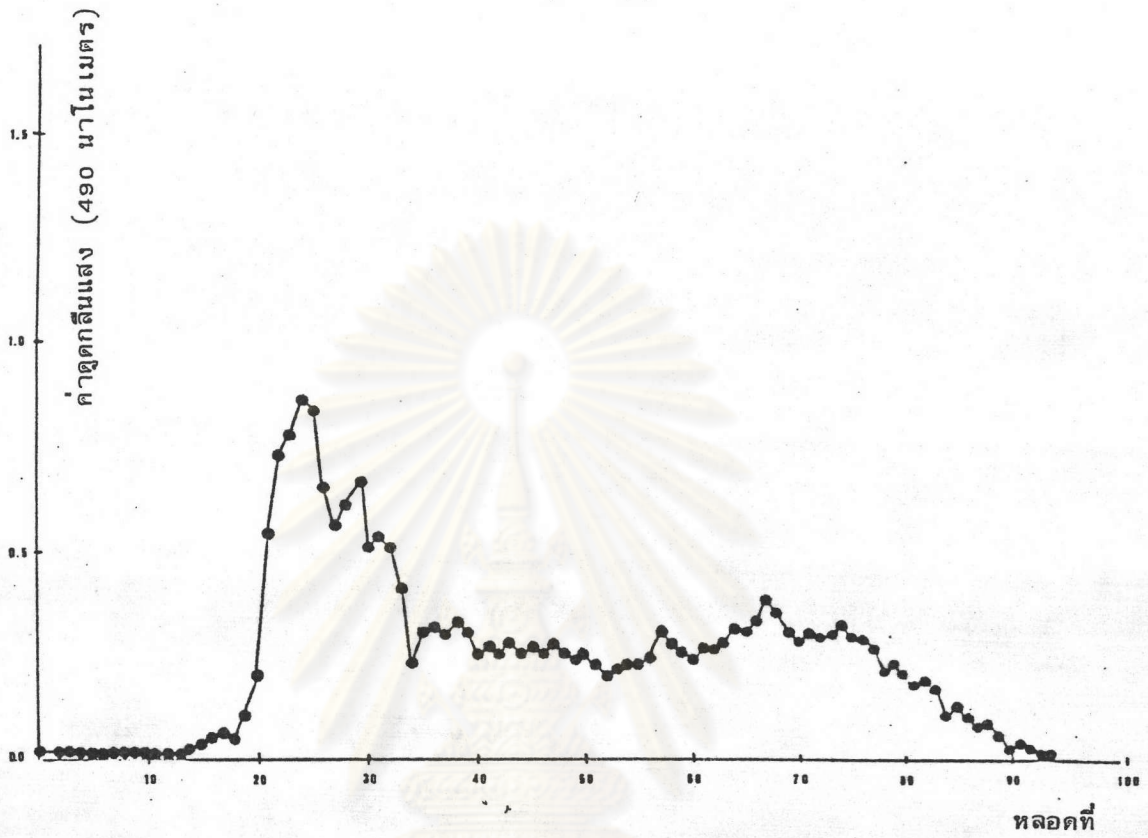
รูปที่ 28 : แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นกากน้ำตาล โดยผ่านการละลายสเคลอโรกลูแคนลงไปในคอลัมน์ขนาด 2.4x70 ซม. ชะสเคลอโรกลูแคนออกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ 0.1 นอร์มอล เก็บสารละลายสเคลอโรกลูแคนหลอดละ 1.5 มล. ที่อัตราการไหล 0.12 มล. ต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

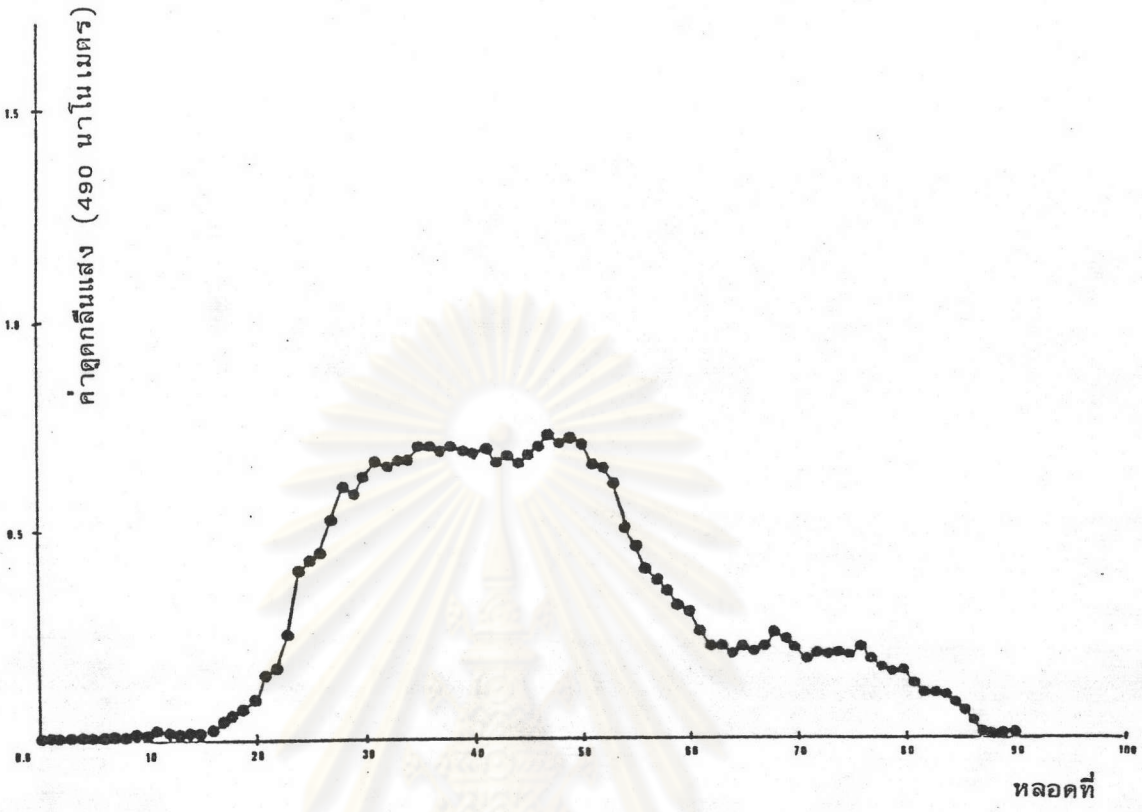


รูปที่ 29 : แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลทราย โดยผ่านการละลายสเคลอโรกลูแคนลงไปในคอลัมน์ขนาด 2.4x70 ซม. ชะสเคลอโรกลูแคนออกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ 0.1 นอร์มอล เก็บสารละลายสเคลอโรกลูแคนหลอดละ 1.5 มล. ที่อัตราการไหล 0.12 มล. ต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30 : แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ไฮโดรไลซ์ โดยผ่านการละลายสเคลอโรกลูแคนลงไปในคอลัมน์ขนาด 2.4x70 ซม. ชะสเคลอโรกลูแคนออกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ 0.1 นอร์มอล เก็บสารละลายสเคลอโรกลูแคน หลอดละ 1.5 มล. ที่อัตราการไหล 0.12 มล. ต่อนาที



รูปที่ 31 : แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ โดยผ่านการละลายสเคลอโรกลูแคนลงไปในคอลัมน์ขนาด 2.4x70 ซม. ชะสเคลอโรกลูแคนออกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดร็อกไซด์ 0.1 นอร์มอล เก็บสารละลายสเคลอโรกลูแคน หลอดละ 1.5 มล. ที่อัตราการไหล 0.12 มล. ต่อนาที

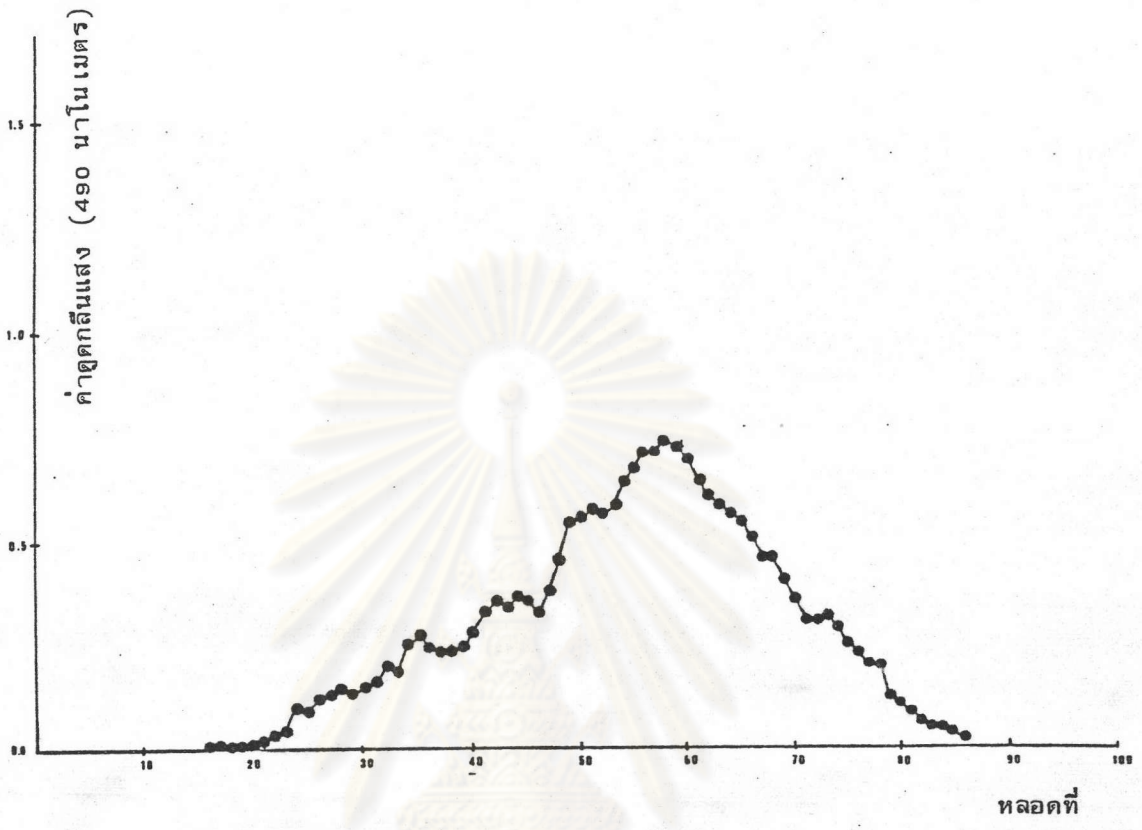
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7 การศึกษาคุณสมบัติขนาดโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคนในสภาพการไฮโดรไลซ์ที่กำหนด

จากการนำสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ มากระทำการไฮโดรไลซ์บางส่วน โดยที่สภาพการไฮโดรไลซ์ คือ ใช้กรดไฮโดรคลอริก 2.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองในข้อ 5.7 นำไฮโดรไลเซทที่ได้กรองผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ จี-200 มาเปรียบเทียบค่า K_{av} ของเด็กซ์แทรนมาตรฐานและกลูโคสตามวิธีในข้อ 5.6 จากกราฟรูปที่ 32 แสดงว่าลักษณะของโมเลกุลที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ในสภาพที่กำหนด ซึ่งเมื่อนำไปหาค่า K_{av} แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับค่า K_{av} ที่แสดงในรูปที่ 27 พบว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคนที่ถูกไฮโดรไลซ์บางส่วน ที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลัง ที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ มีค่าประมาณ 30,000 ซึ่งเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ยังไม่ไฮโดรไลซ์ มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเป็น 380,000

จากการทดลองครั้งนี้ สามารถเป็นแนวทางหนึ่งในการผลิตสเคลอโรกลูแคนให้มีค่าปริมาณองศาของการโพลีเมอร์ไรซ์ตามต้องการได้ โดยต้องทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์โมเลกุลของสเคลอโรกลูแคน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



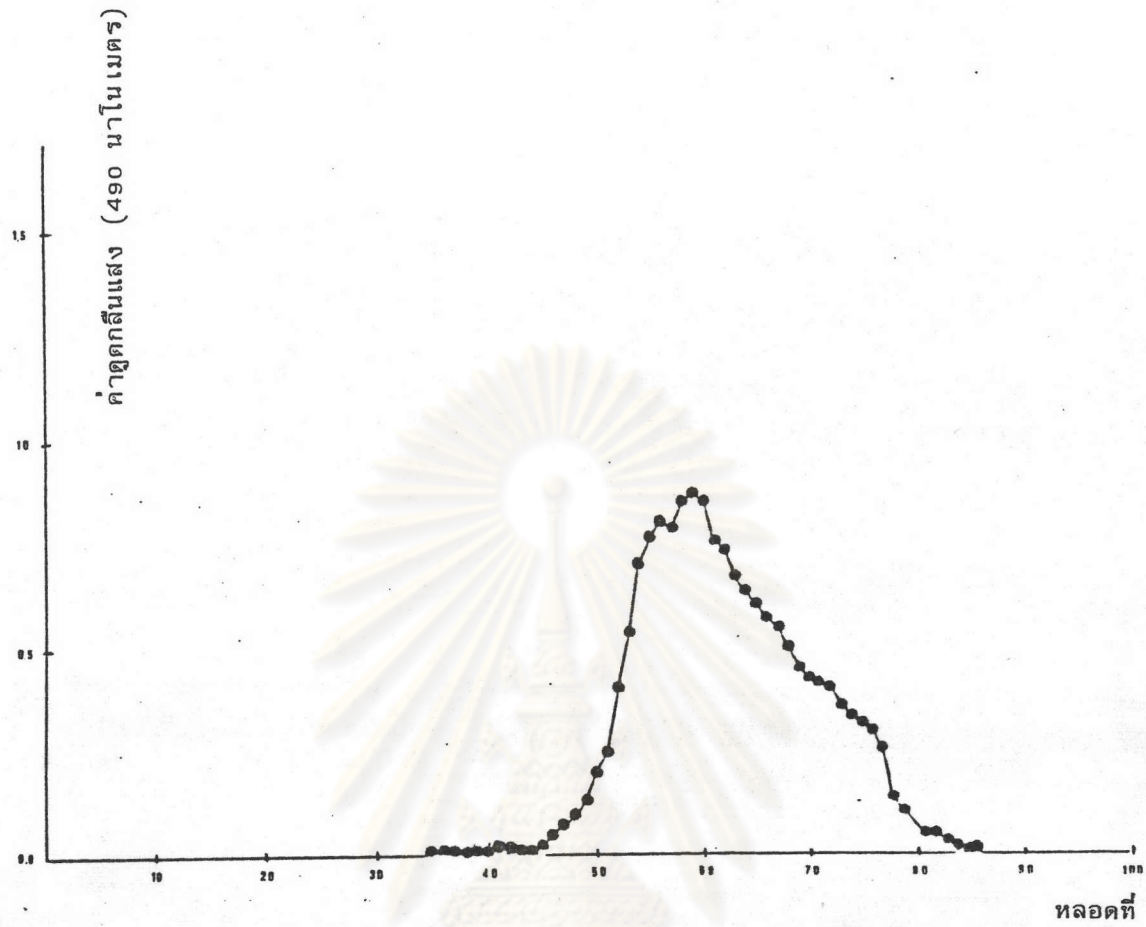
รูปที่ 32 : แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ โดยทำการไฮโดรไลซ์สเคลอโรกลูแคนบางส่วน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 การศึกษาคุณสมบัติขนาดโมเลกุลของสเคลอโรกลูแคนในสภาพการไฮโดรไลซ์สมบูรณ์

จากการนำสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมได้จากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ ไปทำการไฮโดรไลซ์สมบูรณ์ เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 4.3 จากนั้นกรองผ่านคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเซฟาเด็กซ์ จี-200 เช่นเดียวกับข้อ 5.6 ดังแสดงผลในรูปที่ 34 จากการนำค่า K_{av} ซึ่งมีค่าเป็น 0.975 มาหาค่าน้ำหนักโมเลกุล โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในรูปที่ 27 พบว่าไม่สามารถอ่านค่าที่แน่นอนได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟรูปที่ 26 ซึ่งแสดงลำดับของเด็กซ์แทรนมาตรฐานและกลูโคส พบว่าค่าของลำดับขนาดโมเลกุลที่ตรวจพบ อยู่ในช่วงค่าลำดับของกลูโคส คือ อยู่ในช่วงลำดับหลอดที่ 50-65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 33 : แสดงโครมาโตกราฟีของสเคลอโรกลูแคนที่เตรียมจากอาหารแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ โดยทำการไฮโดรไลซ์สเคลอโรกลูแคนอย่างสมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย