การผลิต การหาลักษณะสมบัติ และการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* YTP6-14

นางสาวศุภิศา เอกเผ่าพันธุ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND FILM FORMATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM *Aureobasidium pullulans* YTP6-14

Miss Supisa Ekkpowpan

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิต การหาลักษณะสมบัติ และการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* YTP6-14
โดย	นางสาวศุภิศา เอกเผ่าพันธุ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. กาญจณา จันทองจีน)

Chulalongkorn University

ศุภิศา เอกเผ่าพันธุ์ : การผลิต การหาลักษณะสมบัติ และการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 (PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND FILM FORMATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM *Aureobasidium pullulans* YTP6-14) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร. สุเทพ ธนียวัน, 118 หน้า.

Aureobasidium pullulans YTP6-14 เป็นราคล้ายยีสต์ที่แยกจากบริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี เมื่อทำการศึกษาปัจจัยการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ และการขึ้นรูปฟิล์ม พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน เปปโทน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น 3.5 เป็นเวลา 4 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดที่ 12.33 กรัมต่อลิตร เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ละลายน้ำได้ปานกลางโดยมีตะกอนเล็กน้อย และไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ มีความสามารถในการอุ้มน้ำเทียบเท่ากับคาราจีแนน มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว มีความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ใกล้เคียงกับแซนแทนกัมในน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันทานตะวัน ไม่มีความสามารถในการก่อเจล มีประจุเป็นกลาง ทนความร้อนได้สูง และมีพฤติกรรมการไหลแบบนอนนิวโตเนียน ชนิดซูโดพลาสติกโดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์พบว่ามีความหนืดเพิ่มขึ้น พอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่ไม่เติมกลีเซอรอลและที่เติมกลีเซอรอลซึ่งเป็น พลาสติไซเซอร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) มาขึ้นฟิล์มเทียบกับฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ พบว่าฟิล์มที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอลมีลักษณะเปราะ แข็ง และไม่ยืดหยุ่น ส่วนฟิล์มที่เติมกลีเซอรอลจะเพิ่มความยืดหยุ่นได้ นอกจากนี้กลีเซอรอลยังทำให้ฟิล์มมีความหนา ความยืดที่จุดขาด การซึมผ่านของไอน้ำ การละลายเพิ่มขึ้น และความต้านทานแรงดึงลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอล ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มีค่าความต้านทานแรงดึงต่ำกว่าฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ แต่มีความยืดหยุ่นสูงกว่าทางการค้า การซึมผ่านของไอน้ำและการละลายสูงกว่าฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต	....
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก	....
ปีการศึกษา	2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม	....

5672109623 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY
KEYWORDS: AUREOBASIDIUM PULLULANS / EXOPOLYSACCARIDE/EDIBLE FILM

SUPISA EKKPOWPAN: PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND FILM FORMATION OF EXOPOLYSACCHARIDE FROM *Aureobasidium pullulans* YTP6-14. ADVISOR: ASSOC. PROF. JIRAPORN THANIYAVARN, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUTHEP THANIYAVARN, Ph.D., 118 pp.

A yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans* YTP6-14 was isolated from the coastal area of Koh Si Chang, Chonburi province, Thailand. The aim of this study was to formulate a suitable medium as well as optimum condition for the production of exopolysaccharides, chemical and physical properties of polysaccharide and their film formation. It was found that the optimal medium for exopolysaccharide production by this strain was yeast malt extract (YM) with 6% sucrose (w/v) as a carbon source and peptone at 0.5% (w/v) as a nitrogen source, pH 3.5 at 30 ^{o}C for 96 h with agitation speed of 200 rpm. Under these conditions a yield of 12.33 g/L was obtained. Chemical and physical properties of polysaccharide are as followed; the polysaccharide is partly soluble in water but not in other solvents (methanol, acetone, isopropanol and n-butanol), water holding capacity quite the same as carrageenan. These polysaccharide consist of glucose, not form gel, neutral charge, high temperature resistant, good emulsifier comparable to xanthan gum in soybean oil and sunflower oil and exhibiting a non-Newtonian pseudoplastic behavior. When glycerol (as plasticizer) were added at 1, 1.5 and 2 % (w/v), film without glycerol were brittle and rigid while glycerol improved flexibility of the films. In addition, increasing concentration of glycerol resulted in decreased tensile strength (TS) but increased in elongation (E), thickness, water vapor permeability (WVP) and film solubility. Film polysaccharide had a elongation, water vapor permeability and solubility higher than Tesco cling film but with lower tensile.

Department:	Microbiology	Student's Signature	....
Field of Study:	Microbiology and Microbial Technology	Advisor's Signature	....
		Co-Advisor's Signature	....
Academic Year:	2015		

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์ช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน และรองศาสตราจารย์จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำหลักการในการดำเนินงานวิจัย และ กำลังใจในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัยจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร ที่กรุณารับเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กาญจณา จันทองจีน และ ผศ.ดร.ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ รวมทั้งช่วยปรับปรุงและแก้ไขเล่มวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาคจุลชีววิทยาที่ให้ความรู้ และความช่วยเหลือต่างๆ และเจ้าหน้าที่บนภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาเทคโนโลยีทางการอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และให้ความเอ็นดู จนทำให้การทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล อาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีทางการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณนางสาวรุ่งนภา อ่อนชู นางอำไพ เขตสาลี เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและพี่แอน ปริญญาเอก ภาควิชาเทคโนโลยีทางการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ ตลอดคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์สำหรับการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่กิตติชัย เจ้าหน้าที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆน้องๆห้อง 1804/12 ตลอดทั้งพี่ๆน้องๆเพื่อนๆบนภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ให้ความรู้ในการทำวิจัย และให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่ให้คำแนะนำ และกำลังใจจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ....จ

กิตติกรรมประกาศ....ฉ

สารบัญ....ช

สารบัญตาราง....ฌ

สารบัญรูปภาพ....ญ

บทที่ 1 บทนำ....1

1.1 ประวัติความเป็นมา....1

1.2 วัตถุประสงค์....3

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ....3

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม....4

2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)....4

2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ (microbial polysaccharide)....9

2.3 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรมต่างๆ....16

2.4 การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารของพอลิแซ็กคาไรด์....20

2.5 *A. pullulans*....23

2.6 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์....29

2.7 ฟิล์มและสารเคลือบที่บริโภคได้ (edible film and coating)....32

2.8 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์....40

2.9 สมบัติการไหล (rheological properties)....41

บทที่ 3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง....43

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง....43

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 44
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..47
บทที่ 4 ผลการทดลอง...56
4.1 ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ...56
4.2 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ 64
4.3 ลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์..67
4.4 ขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 และทดสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีของฟิล์มที่ได้ 76
4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* YTP6-14...85
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง...88
รายการอ้างอิง 98
ภาคผนวก.. 114
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.. 115
ภาคผนวก ข สารเคมี... 116
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.. 117
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 118

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ 5

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์...10

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์..12

ตารางที่ 2.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรมต่างๆ 18

ตารางที่ 2.5 ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์และการประยุกต์ใช้ในอาหาร..........................21

ตารางที่ 2.6 การประยุกต์ใช้ *A. pullulans* ในอุตสาหกรรมต่างๆ 27

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์จากวันที่ 1-2 ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง 65

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14...66

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับน้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ที่เวลา 24 ชั่วโมง...69

ตารางที่ 5.1 คุณสมบัติของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์กับฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้และฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ 94

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างอะไมโลส และอะไมโลเพกติน......6

รูปที่ 2.2 โครงสร้างไคติน......7

รูปที่ 2.3 โครงสร้างเซลลูโลส 8

รูปที่ 2.4 โครงสร้างเจลแลน......8

รูปที่ 2.5 โครงสร้างเดกซ์แทรน......13

รูปที่ 2.6 โครงสร้างพูลลูแลน 14

รูปที่ 2.7 โครงสร้างเคอร์ดแลน 14

รูปที่ 2.8 โครงสร้างลีแวน 15

รูปที่ 2.9 โครงสร้างเจลแลน......15

รูปที่ 2.10 โครงสร้างแซนแทนกัม......16

รูปที่ 2.11 คุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ 20

รูปที่ 2.12 การจัดจำแนกอนุกรมวิธานของ *A. pullulans*......23

รูปที่ 2.13 วงจรชีวิตของ *A. pullulans* 25

รูปที่ 2.14 ชั้นของพอลิแซ็กคาไรด์บนผนังเซลล์ของ *A. pullulans* 29

รูปที่ 2.15 หน้าที่ของฟิล์ม 33

รูปที่ 2.16 ชนิดของฟิล์มและสารเคลือบที่บริโภคได้ 36

รูปที่ 2.17 ลักษณะการไหลของของเหลว 42

รูปที่ 4.1 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2 สูตรที่ใช้เปรียบเทียบ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากสูตรอาหารของ Youssef และคณะ (1999) ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 57

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีการแปรผันชนิดของคาร์บอน ดังนี้ กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแลกโทส ที่ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 58

รูปที่ 4.3 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของซูโครส ดังนี้ 3, 6, 9 ,12 และ 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 59

รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีการแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น ดังนี้ 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 60

รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดเบส 3.5 ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของเปปโทน ดังนี้ 0.1 0.3 0.5 0.7 และ 0.9 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 62

รูปที่ 4.6 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดเบส 3.5 ความเข้มข้นเปปโทน 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีการแปรผันช่วงเวลาที่ใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนี้ 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ168 ชั่วโมง 63

รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมแสดง (ก) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส และ (ข) ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ภายหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที 68

รูปที่ 4.8 ผลวิเคราะห์ชนิดประจุของ (ก) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 (ข) แซนแทนกัม (ชุดควบคุมที่มีประจุลบ) และ (ค) สารละลาย CPC และโซเดียมคลอไรด์ (ชุดควบคุมที่มีประจุบวก)..................71

รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส..................72

รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..73

รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 2.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 73

รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 3.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 74

รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 4.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 74

รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 5.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 75

รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ของแซนแทนกัมที่ความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 75

รูปที่ 4.16 ลักษณะของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ (ก) ไม่เติมกลีเซอรอล (ข) 1% (ค) 1.5% และ (ง) 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร...77

รูปที่ 4.17 ความหนาของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ 78

รูปที่ 4.18 ค่าสี L* ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร...79

รูปที่ 4.19 ค่าสี a* ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..80

รูปที่ 4.20 ค่าสี b* ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร..80

รูปที่ 4.21 ค่า ΔE^* ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร....81

รูปที่ 4.22 ความต้านทานแรงดึง ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ 82

รูปที่ 4.23 ความยืดที่จุดขาดของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1 และ 1.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ 82

รูปที่ 4.24 การซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ 83

รูปที่ 4.25 การละลายน้ำของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ 84

รูปที่ 4.26 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* YTP6-14 (ก.) เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน และ (ข.) เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน....85

รูปที่ 4.27 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า เมื่อเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 24-168 ชั่วโมง พบ (ก.) บลาสโตสปอร์ และ การแตกหน่อ (ลูกศรชี้) (ข.) เส้นใยเทียม (ค.) เส้นใยเทียมและเซลล์พอง (ลูกศรชี้) (ง.) เส้นใยเทียมและมีการสร้างท่องอก (ลูกศรชี้) (จ.) เซลล์พองและมีการสร้างท่องอก (ลูกศรชี้) (ฉ.) เซลล์พองและการแตกหน่อ (ช.) เส้นใยเทียมและโคนิเดียติดอยู่บริเวณปลายและด้านข้างของเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้)....87

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ในปัจจุบันประเทศไทยมีบทบาทสำคัญในเศรษฐกิจโลกมากขึ้น ทั่วโลกต่างให้ความสนใจในการขยายตัวทางเศรษฐกิจของประเทศไทยโดยเฉพาะการขยายตัวทางเศรษฐกิจด้านอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งประเทศไทยมีการผลิตสินค้าเพื่อการบริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกสินค้าไปทั่วโลก แต่เนื่องจากประชากรที่เพิ่มมากขึ้นทำให้วัตถุดิบที่ใช้สำหรับอุตสาหกรรมอาหารไม่เพียงพอจึงต้องมีการสั่งจากต่างประเทศเข้ามา ทำให้เพิ่มต้นทุนในกระบวนการผลิตมากขึ้น ดังนั้นการผลิตวัตถุดิบขึ้นได้เองจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้เป็นอย่างมาก สารไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) เป็นพอลิเมอร์ที่ผลิตได้จาก พืช สัตว์และจุลินทรีย์ สารนี้เป็นวัตถุดิบหลักอย่างหนึ่งที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารในรูปสารเติมแต่งอาหาร (food additive) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางกายภาพของอาหารให้ดีขึ้นเป็นที่พึงพอใจของผู้บริโภค ดังนั้น หากประเทศไทยสามารถผลิตสารเหล่านี้ได้เองจะช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตได้มากขึ้น

พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในอาหาร เป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก พอลิแซ็กคาไรด์สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวมาเชื่อมต่อกัน เรียกว่า ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) และ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่างชนิดกันมาเชื่อมต่อกัน เรียกว่า เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) พอลิแซ็กคาไรด์เป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สัตว์ จุลินทรีย์และสาหร่าย เป็นต้น (Venugopal, 2011) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งแบคทีเรีย ราและยีสต์ เช่น แซนแทนกัม ผลิตจาก *Xanthomonas* sp. เจลแลน ผลิตจาก *Sphingomonas* sp. เดกซ์แทรน ผลิตจาก *Leuconostoc* sp. และแอลจิเนต ผลิตจาก *Azotobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น (Kumar และคณะ, 2007; Rehm, 2010) การใช้จุลินทรีย์ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีข้อดีกว่าการใช้สิ่งมีชีวิตอื่นในการผลิต คือ การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ทำได้ง่าย ผลิตได้เป็นจำนวนมาก และรวดเร็วกว่าการผลิตในพืชและสาหร่าย การเจริญของจุลินทรีย์ไม่ขึ้นกับสภาวะดินฟ้าอากาศและฤดูกาล ขั้นตอนการสกัดสารและการทำให้บริสุทธิ์ทำได้ง่าย และสามารถควบคุมคุณภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ในการผลิตได้ โดยการควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตสารของจุลินทรีย์ (สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์, 2551) พอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างโดย

จุลินทรีย์อาจได้รับการปลดปล่อยออกนอกเซลล์ในลักษณะเป็นเมือกหรืออยู่ในรูปของแคปซูลติดอยู่กับเซลล์เรียกว่า เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide หรือ EPS) มีการนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการเกษตร ยา เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมปิโตรเลียม อุตสาหกรรมสิ่งทอ สารซักฟอก และ การบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารเพื่อเพิ่มคุณภาพและรสชาติของอาหารให้ดีขึ้น เช่น สารที่ทำให้ข้นหนืด (viscosifying), สารเพิ่มความคงตัว (stabilizing), สารก่อเจล (gelling) และสารก่ออิมัลชัน (emulsifying) สารก่อฟิล์ม (film forming) เป็นต้น (Jolly และคณะ, 2002; Sheoran และคณะ, 2012)

Aureobasidium pullulans เป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) ชื่อสามัญ คือ แบล็คยีสต์ เนื่องจากในระหว่างการเจริญจะผลิตเม็ดสีเมลานินจึงทำให้โคโลนีมีสีดำ เชื้อเจริญภายใต้ภาวะที่มีอากาศ มีรูปร่างได้หลายลักษณะ เช่น บลาสโตสปอร์ (blastospores), เซลล์พอง (swollen cell), คลาไมโดสปอร์ (chlamydospores) เส้นใยแท้ (mycelium) หรือเส้นใยเทียม (pseudomycelium) เป็นต้น (Ramos และ Garcia Acha, 1975) โดยรูปร่างจะขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง (Ravella และคณะ, 2010) *A. pullulans* เป็นราที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำทะเล บนผิวของใบพืชและผลไม้ เป็นต้น (Deshpande และคณะ, 1992) *A. pullulans* เป็นเชื้อที่มีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เนื่องจากสามารถผลิตสารได้หลากหลายชนิด เช่น โปรตีนเซลล์เดียว ซิเดอโรฟอร์ และเอนไซม์ เช่น อะไมเลส เซลลูเลส และไลเปส เป็นต้น (Chi และคณะ, 2009; Deshpande และคณะ, 1992) นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* ยังมีบทบาทสำคัญในด้านอุตสาหกรรม สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* ได้แก่ สายพันธุ์ ชนิดของคาร์บอนและไนโตรเจน ปริมาณของคาร์บอนและไนโตรเจน สภาวะการเลี้ยงเชื้อ (อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเบส เวลา ความต้องการอากาศ และอื่นๆ) (Campbell และคณะ, 2003; Singh และคณะ, 2008) พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีบทบาทสำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น พูลลูแลน คุณสมบัติของพูลลูแลน คือ ละลายน้ำได้ดี ไม่เป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือมะเร็ง สามารถรับประทานได้ ไม่มีรส และกลิ่น (Choudhury และคณะ, 2011; Gniewosz และ Synowiec, 2011; Leathers, 2003)

พูลลูแลนมีคุณสมบัติสามารถขึ้นเป็นรูปฟิล์มได้ จึงมีการนำพูลลูแลนมาทำฟิล์มหรือสารเคลือบที่สามารถบริโภคได้ (edible films and coatings) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหาร ช่วยลดการสูญเสียความชื้น ลดการแลกเปลี่ยนแก๊สที่สำคัญ เช่น แก๊สออกซิเจน และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของอาหาร (Fajardo และคณะ, 2010) ฟิล์มนี้สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และปลอดภัยต่อผู้บริโภค ในการ

ทำฟิล์มที่บริโภคได้มีการนำสารต้านจุลินทรีย์ผสมลงไป เช่น แบคเทอริโอซิน เอนไซม์ น้ำมันหอมระเหย และกรดไขมัน เป็นต้น (Seydim และ Sarikus, 2006) เพื่อเพิ่มความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร ดังรายงานวิจัยของ Gniewosz และคณะ (2013) ได้นำน้ำมันหอมระเหยที่สกัดมาจากยี่หร่าใส่ผสมลงในฟิล์มพูลลูแลนเพื่อนำมาเคลือบแครอทเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจนำพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่แยกได้จากโครงการความหลากหลายของยีสต์จากบริเวณพื้นที่ 5 ชายฝั่งของเกาะสีชัง อำเภอเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ปี พ.ศ. 2554 – 2555 ระบุสายพันธุ์ของยีสต์โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในโดเมน D1/D2 ของ 26s rDNA เทียบกับฐานข้อมูล (Thaniyavarn และคณะ, 2013) และนำมาประยุกต์ใช้โดยศึกษาสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์เพื่อสามารถนำมาประยุกต์ใช้เบื้องต้นได้อย่างเหมาะสม

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 และการขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้พอลิแซ็กคาไรด์และทราบลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 และสามารถนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ไปขึ้นรูปแผ่นฟิล์มได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์ เป็นโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายๆโมเลกุลมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก ลักษณะของพอลิเมอร์อาจเป็นแบบสายตรงหรือแตกเป็นกิ่งก้านสาขาหรือทั้งสองแบบ (Cui, 2005; Sutherland, 1994) พอลิแซ็กคาไรด์มีสูตรทั่วไปคือ $C_x(H_2O)_y$ โดยที่ y มีค่าระหว่าง 200-2500 (Kalia และ Sabaa, 2013) ในธรรมชาติส่วนใหญ่พบว่ามอนอแซ็กคาไรด์มีโครงสร้างเป็นวง เนื่องจากเป็นโครงสร้างที่เสถียรกว่าโครงสร้างแบบโซ่เปิด (Sikorski, 2007) โดยโครงสร้างแบบวงของพอลิแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยคาร์บอน 6 อะตอม เรียกว่า ไพราโนส หรืออาจจะอยู่ในรูปของฟูราโนส ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบวงที่ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม (Preston, 1979) น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มักพบอยู่ในโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น D-กลูโคส D-กาแล็กโทส D-แมนโนส L-ฟิวโคส และ L-แรมโนส นอกจากนี้ยังพบอนุพันธุ์ของน้ำตาลชนิดโมเลกุลเดี่ยว เช่น D-กลูโคซามีน D-กาแลกโตซามีน N-อะซิติลนิวรามินิกแอซิด N-อะซิติลมิวรามิกแอซิด กลูคูโรนิก และ ยูโรนิกแอซิด เป็นต้น (Sutherland, 1994; Venugopal, 2011) โครงสร้างที่หลากหลายของพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องมาจากความแตกต่างองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ตำแหน่งของพันธะ จำนวนการแตกกิ่งก้านและความยาวของสาย เป็นตัวบ่งบอกถึงคุณสมบัติทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น การละลาย พฤติกรรมการไหล การก่อเจล เป็นต้น (Cui, 2005) พอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในธรรมชาติจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง สามารถละลายน้ำได้ ไม่มีสีและส่วนใหญ่ไม่มีรสชาติ สามารถดูดน้ำได้ดี เมื่อละลายน้ำจะทำให้มีความหนืดเพิ่มมากขึ้น (Chen และคณะ, 2006) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในทางการค้า เช่น แป้ง เซลลูโลส และอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น เซลลูโลสอะซิเตท คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เมทิลเซลลูโลส โซเดียมอัลจิเนต แซนแทนกัม เดกซ์ทริน คาราจีแนน และกรดไฮโดรฟลูออริก เป็นต้น (Kalia และ Sabaa, 2013)

พอลิแซ็กคาไรด์ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สัตว์ จุลินทรีย์และสาหร่าย แสดงดังตารางที่ 2.1 หน้าที่สำคัญ 2 อย่างของพอลิแซ็กคาไรด์ คือ ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้าง (structural polysaccharide) เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพกทิน เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืช ไคตินเป็นองค์ประกอบของเปลือกในสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง ปู แมลง และยังเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ราียีสต์ และจุลินทรีย์อีกหลายชนิด ส่วนอีกหน้าที่ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงาน (storage polysaccharide) เช่น แป้ง เป็นแหล่งสะสมพลังงานของพืช และไกลโคเจน เป็นแหล่งสะสมพลังงานของสัตว์ (Cui, 2005; Sikorski, 2007)

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ

สิ่งมีชีวิต	พอลิแซ็กคาไรด์
สัตว์	ไคติน (chitin) ไคโตซาน (chitosan) กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid)
พืช	แป้ง (starch) เซลลูโลส (cellulose) กัวกัม (guar gum) อะราบิกกัม (Arabic gum) เพคติน (pectin)
สาหร่าย	วุ้น (agar) คาราจีแนน (carrageenan) อัลจิเนต (alginate)
จุลินทรีย์	แซนแทน (xanthan) เจลแลน (gellan) พูลลูแลน (pullulan) เดกซ์แทรน (dextran) เคอร์ดแลน (curdlan) ลีแวน (levan) เอลซิแนน (elsinan)

ที่มา : (Cui, 2005; Sikorski, 2007)

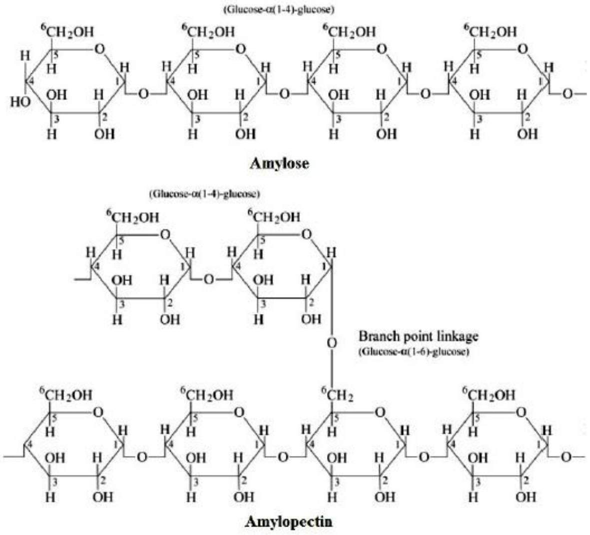
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การจำแนกชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์

1. จำแนกตามหน้าที่ของพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1.1 พอลิแซ็กคาไรด์สะสม (storage polysaccharide)

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารไว้ในเซลล์ เมื่อขาดแคลนอาหารจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์กลายเป็นน้ำตาลหน่วยย่อยเพื่อนำมาใช้ เช่น ไกลโคลเจนเป็นแหล่งสะสมอาหารของสัตว์ พบได้ในตับและกล้ามเนื้อสัตว์ และแป้งเป็นแหล่งสะสมอาหารของพืช โครงสร้างโมเลกุลของแป้ง แสดงดังรูปที่ 2.1



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

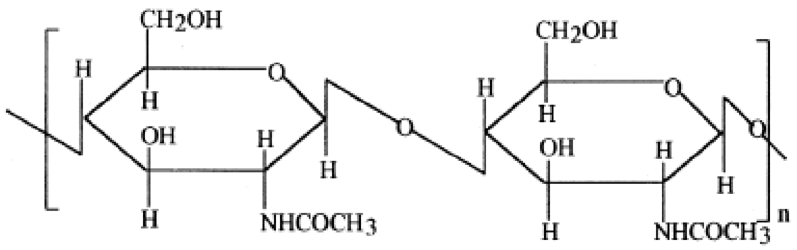
รูปที่ 2.1 โครงสร้างอะไมโลส และอะไมโลเพกติน

ที่มา : Chamy และ Rosenkranz (2013)

แป้งประกอบด้วยโมเลกุล 2 ชนิด ได้แก่ อะไมโลส (amylose) และ อะไมโลเพกติน (amylopectin) โดยทั่วไปในแป้งจะพบอะไมโลส ประมาณ 25% และอะไมโลเพกติน ประมาณ 75% โครงสร้างของอะไมโลส ประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ α-1,4 เป็นสายยาว ส่วนโครงสร้างอะไมโลเพกตินจะประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ α-1,4 และส่วนที่เป็นกิ่งแตกออกมาจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ α-1,6 (Sikorski, 2007)

1.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้าง (structural polysaccharide)

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทำหน้าที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้าง เช่น เพกทิน เซลลูโลส เป็นองค์ประกอบอยู่ในผนังเซลล์ของพืช ไคติน เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น เปลือกหอย ปู กุ้ง เปลือกของแมลง และยังเป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ของเห็ด รา ยีสต์ และสาหร่ายบางชนิด โครงสร้างไคติน แสดงดังรูปที่ 2.2



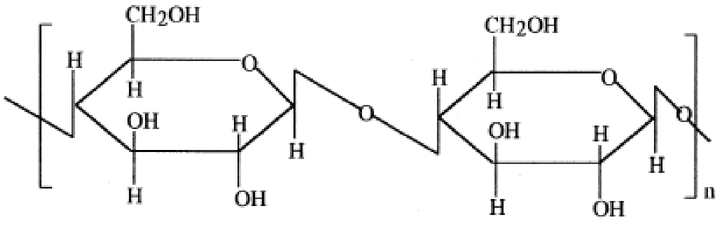
รูปที่ 2.2 โครงสร้างไคติน
ที่มา : Ravi Kumar (2000)

ไคตินเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายยาว ประกอบด้วย N-acetyl-D-glucosamine (N – แอซีติลกลูโคซามีน, NAG) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกลูโคสหลายๆโมเลกุลที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ β-1,4 มีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส แต่จะต่างตรงที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C 2 จะถูกแทนที่ด้วยหมู่อะมิโนแอซีทิล (acetyl amino ($-NHCOCH_3$)) (Ravi Kumar, 2000)

2. จำแนกตามชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ Badel และคณะ (2011) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.1 ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide)

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวมาเชื่อมต่อกัน เช่น เซลลูโลส แป้ง เคอร์ดแลน พูลลูแลน และ เดกซ์แทรน เป็นต้น (Sutherland, 1990) โครงสร้างของเซลลูโลส แสดงดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างเซลลูโลส

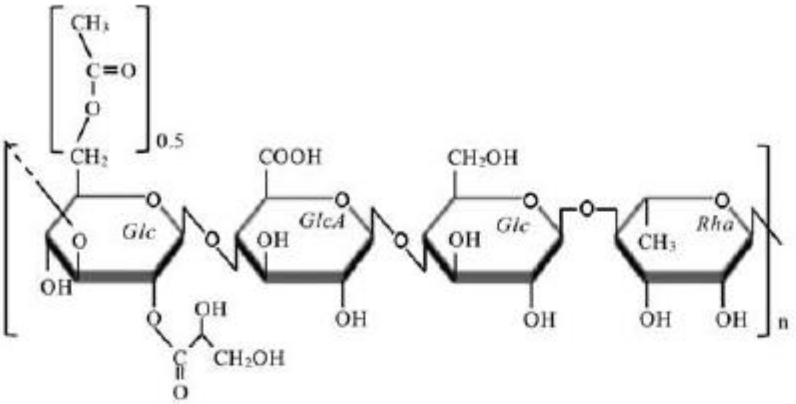
ที่มา : Ravi Kumar (2000)

เซลลูโลสเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์สายยาว โครงสร้างเกิดจากหน่วยย่อยของกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบ β-(1,4) โดยโมเลกุลของเซลลูโลสที่เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์พืชมีประมาณ 13,000-14,000 จะแตกต่างจากเซลลูโลสจากแบคทีเรีย (bacterial cellulose) ซึ่งมีประมาณ 2,000-6,000 โมเลกุล (Khan และคณะ, 2007)

2.2 เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide)

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวต่างชนิดกันมาเชื่อมต่อกัน เช่น แซนแทนกัม เจลแลน เพกทิน เฮมิเซลลูโลส อัลจิเนต เป็นต้น (Sutherland, 1990) แสดงโครงสร้างของเจลแลน แสดงดังรูปที่ 2.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 2.4 โครงสร้างเจลแลน

ที่มา : Freitas และคณะ (2014)

เจลแลนประกอบด้วยหน่วยย่อยของเตตระแซ็กคาไรด์เชื่อมต่อกันเป็นสายยาว มีองค์ประกอบเป็น ดี-กลูโคส (Glc), แอล-แรมโนส (Rha) และ ดี-กลูคิวโรนิก แอซิด (GlcA) โดยมี (1-3)-บี-β-กลูโคส, (1-4)-β-ดี-กลูคิวโรนิก แอซิด, (1-4)-β-ดี-กลูโคส และ (1-4)-a-แอล-แรมโนส เป็น backbone โอ-อะซิทิล และ กลีเซอริล เป็นส่วนแทนที่ (Khan และคณะ, 2007)

3. จำแนกตามประจุบนโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้ (Margaritis และ Pace, 1985)

3.1 พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) ได้แก่ ลีแวน พูลลูแลน เดกซ์แทรน และสเครอโรกลูแคน

3.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุบวก (cationic polysaccharide) ได้แก่ พวกที่มีหมู่ NH_3 ฯลฯ หรือมีหมู่ของกรดอะมิโนบางตัวต่ออยู่

3.3 พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (anionic polysaccharide) หรือบางครั้งเรียกว่า acidic polysaccharides เช่น แซนแทนกัม ที่มีหมู่อะเซทิลกับไพรูเวตอยู่บนโมเลกุล

2.2 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ (microbial polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นไบโอพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สัตว์ จุลินทรีย์และสาหร่าย (Kaur และคณะ, 2013; Venugopal, 2011) โดยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้มีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ (Donot และคณะ, 2012; Kumar และคณะ, 2007) เช่น แซนแทนกัมผลิตจาก *Xanthomonas* sp. เจลแลนผลิตจาก *Sphingomonas* sp. เดกซ์แทรนผลิตจาก *Leuconostoc* sp. และแอลจิเนตผลิตจาก *Azotobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น (Kumar และคณะ, 2007; Rehm, 2010) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 ในปัจจุบันจุลินทรีย์เริ่มมีบทบาทสำคัญมากขึ้นในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เนื่องจาก การใช้จุลินทรีย์มีข้อดีกว่าการใช้สิ่งมีชีวิตอื่นในการผลิต คือ การผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ทำได้ง่าย ผลิตได้เป็นจำนวนมาก และรวดเร็วกว่าการผลิตในพืชและสาหร่าย การเจริญของจุลินทรีย์ไม่ขึ้นกับสภาวะดินฟ้าอากาศและฤดูกาล ขั้นตอนการสกัดสารและการทำให้บริสุทธิ์ทำได้ง่าย สารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีความปลอดภัยและมีส่วนผสมที่ง่าย และสามารถควบคุมคุณภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ในการผลิตได้โดยการควบคุมภาวะต่าง ๆ ให้มีความเหมาะสมต่อการผลิตสารของจุลินทรีย์ นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังสามารถใช้ของเสียที่มาจากอุตสาหกรรมต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตและผลิต

พอลิแซ็กคาไรด์ได้ เช่น กลีเซอรอล สารประกอบไฮโดรคาร์บอน และ คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งถือว่าเป็นการบำบัดสิ่งแวดล้อมด้วย (Donot และคณะ, 2012; Fang, 2013; Khan และคณะ, 2007)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์

สิ่งมีชีวิต	พอลิแซ็กคาไรด์	จุลินทรีย์ที่ผลิต
ราและยีสต์	สเคลอโรกลูแคน (scleroglucan)	*Sclerotium* sp.
	กลูแคน (glucan)	*Rhodoturula* sp. *Tremella fusiformes* *Crytptococcus* sp. *Ganoderma lucidum*
	พูลลูแลน (pullulan)	*Aureobasidium pullulans*
แบคทีเรีย	เซลลูโลส (cellulose)	*Acinetobacter* sp. *Acetobacter xylinum*
	อัลจิเนต (alginate)	*Pseudomonas* *Aerugina* *Azobacter* sp.
	เจลแลน (gellan)	*Alcaligenes faecalis* *Shingomonas*
	ลีแวน (levan)	*Erwinia* sp. *Bacillus* spp.
	แซนแทน (xanthan)	*Xanthomonas campestris*
	เดกซ์แทรนและอนุพันธ์ (dextran)	*Leucomostoc* sp.
	เคอร์ดแลน (curdlan)	*Agrobacterium*

ที่มา : Donot และคณะ (2012)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จุลินทรีย์สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีสมบัติแตกต่างกัน เนื่องจากองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของโครงสร้างที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.3 พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีหน้าที่ที่แตกต่างกัน ดังนี้ (Donot และคณะ, 2012)

1. พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้าง (structural polysaccharide) พอลิแซ็กคาไรด์ประเภทนี้เป็นองค์ประกอบที่อยู่ในผนังเซลล์และอาจอยู่รวมกับส่วนประกอบอื่นๆ เช่น เพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) เกิดจากการรวมกับพอลิเพปไทด์ ลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) เกิดจากรวมกับลิพิด เป็นต้น

2. พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้างภายในเซลล์ (intracellular polysaccharide) พอลิแซ็กคาไรด์ประเภทนี้จะสร้างอยู่ภายในเซลล์ ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมคาร์บอนและพลังงานให้แก่เซลล์

3. พอลิแซ็กคาไรด์ที่สร้างภายนอกเซลล์ (extracellular polysaccharide : EPS) พอลิแซ็กคาไรด์ประเภทนี้จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เพื่อใช้เป็นโครงสร้างในการห่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า แคปซูล (capsule) มีลักษณะเป็นสารเหนียวคล้ายเจลหุ้มอยู่รอบเซลล์ มีรูปร่างไม่แน่นอน ทำให้โคโลนีของแบคทีเรียมีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม (mucoid) นอกจากนี้มีสารที่คล้ายแคปซูลอีกชนิดหนึ่งเรียกว่า เมือก (slime) แต่มีลักษณะโครงสร้างที่เกาะอยู่บนผิวเซลล์กันหลวมๆ จึงทำให้ละลายหลุดออกมาได้ง่ายกว่า (Kumar และคณะ, 2007) เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ช่วยให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความแห้งแล้ง อุณหภูมิ สารเคมี ความเป็นกรดเบส ช่วยปกป้องเซลล์จากไวรัสและโปรโตซัว ช่วยในการเกาะบนพื้นผิว และช่วยในการสร้างไบโอฟิล์ม (Donot และคณะ, 2012; Kumar และคณะ, 2007; Sutherland, 2001) นอกจากนี้พบว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานให้กับจุลินทรีย์ได้ ยกเว้น *Cellulomonas flavigena* ที่พบว่าใช้เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานสำรองได้ ข้อดีของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์คือมีการสร้างและปล่อยออกมานอกเซลล์ ดังนั้นจึงทำให้ง่ายต่อการสกัดและแยกออกจากผนังเซลล์ (Sutherland, 1999)

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์

พอลิแซ็กคาไรด์	องค์ประกอบ	จุลินทรีย์ที่ผลิต
พูลลูแลน	กลูโคส	*Aureobasidium pullulans*
เจลแลน	กลูโคส แรมโนส กลูคิวโรนิกแอซิด อะซีเตท กลีเซอเรท	*Sphingomonas paucimobilis*
ลีแวน	ฟรุกโทส	*Zymomonas mobilis* *Halomonas smyrnensis* *Bacillus subtilis*
เคอร์ดแลน	กลูโคส	*Agrobacterium* sp.
อัลจิเนต	กลูคิวโรนิกแอซิด แมนนูโรนิกแอซิด อะซีเตท	*Azotobacter vinelandii* *Pseudomonas aeruginosa*
เซลลูโลส	กลูโคส	*Gluconacetobacter* sp.
ไฮยาลูโรแนน	กลูคิวโรนิกแอซิด แอเซทิลกลูโคซามีน	*Streptococcus* sp. *Pseudomonas aeruginosa*
แซนแทนกัม	กลูโคส แมนโนส กลูคิวโรนิกแอซิด	*Xanthomonas* sp.
เดกซ์แทรน	กลูโคส	*Leuconostoc mesenteroid*
ซัคซิโนไกลแคน	กลูโคส กาแลกโตส	*Rhizobium* *Alcaligenes* *Pseudomonas* *Agrobacterium*

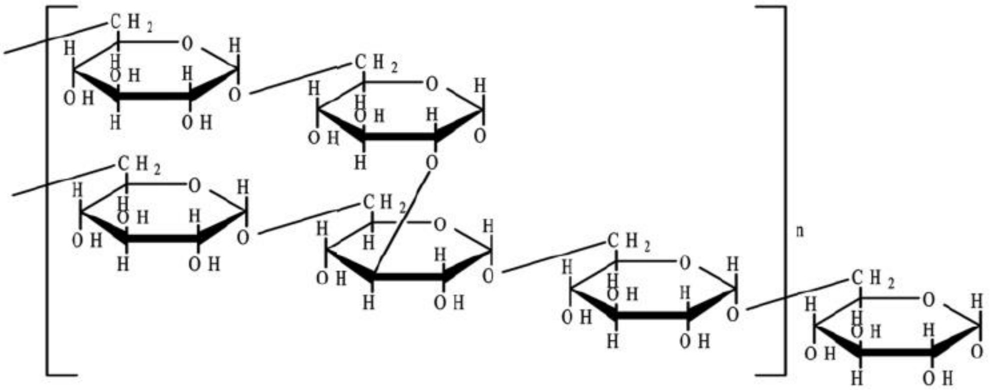
ที่มา : (Freitas และคณะ, 2011; Freitas และคณะ, 2014)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท ตามชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบ ดังนี้

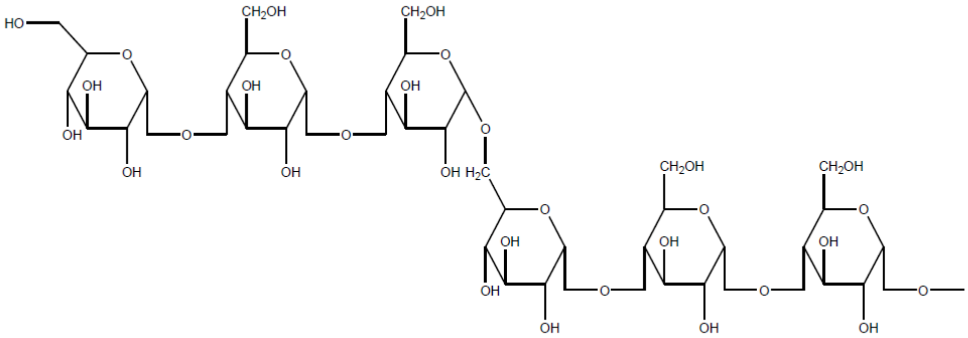
1. ฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียวมาเชื่อมต่อกัน เช่น เดกซ์แทรน (dextran) พูลลูแลน (pullulan) ลีแวน (levan) เซลลูโลส (cellulose) เคอร์ดแลน (curdlan) มิวแทน (mutan) อัลเทอแนน (alternan) (Fang, 2013; Freitas และคณะ, 2014)

1.1 เดกซ์แทรน โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 เป็นสายหลัก (รูปที่ 2.5) และส่วนของกิ่งก้านจะเชื่อมด้วยพันธะแบบ α-1,2 α-1,3 และ α-1,4 ผลิตจากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* และ *Streptococcus mutans* (Rosenberg และคณะ, 2013)



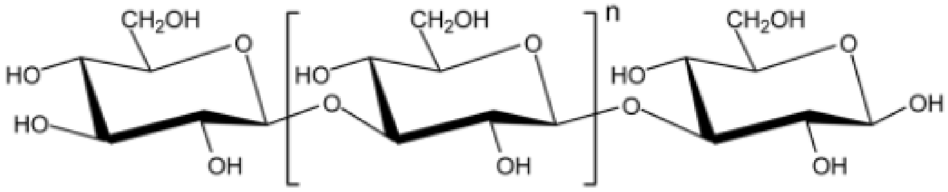
รูปที่ 2.5 โครงสร้างเดกซ์แทรน
ที่มา : Khan และคณะ (2007)

1.2 พูลลูแลน โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตไตรโอส (maltotriose) หลายหน่วยเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,4 และเชื่อมกับตัวอื่นด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α-1,6 (รูปที่ 2.6) ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Aureobasidium pullulans*, *Tremella mesenterica*, *Cyteria* sp., *Teloschistes flavicans* เป็นต้น (Cheng และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างพูลลูแลน
ที่มา : Kumar และคณะ (2012)

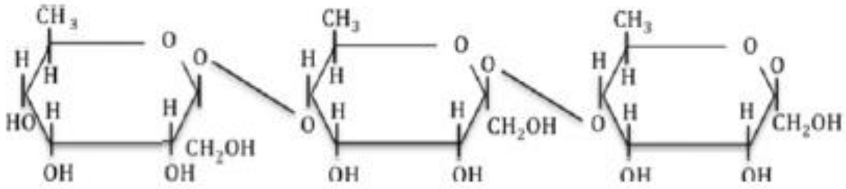
1.3 เคอร์ดแลน โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด β-1,3 (รูปที่ 2.7) ผลิตจาก *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* *Agrobacterium radiobacter* และ *Rhizobium* sp. (Paul และคณะ, 1986; Sutherland, 2001)



รูปที่ 2.7 โครงสร้างเคอร์ดแลน
ที่มา : Khan และคณะ (2007)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.4 ลีแวน โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโทสเชื่อมต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด β-2,6 (รูปที่ 2.8) ผลิตจากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Zymomonas mobilis* *Halomonas smyrnensis* และ *Bacillus subtilis* เป็นต้น (Donot และคณะ, 2012; Freitas และคณะ, 2014)

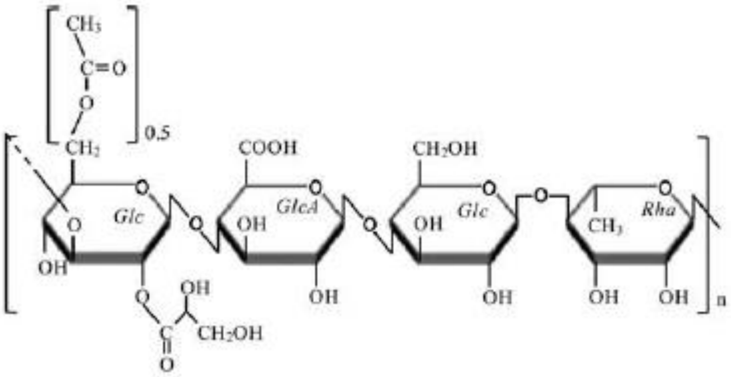


รูปที่ 2.8 โครงสร้างลีแวน

ที่มา : Donot และคณะ (2012)

2. เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ คือ พอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไปมาเชื่อมต่อกัน เช่น แซนแทนกัม และเจลแลน (Fang, 2013)

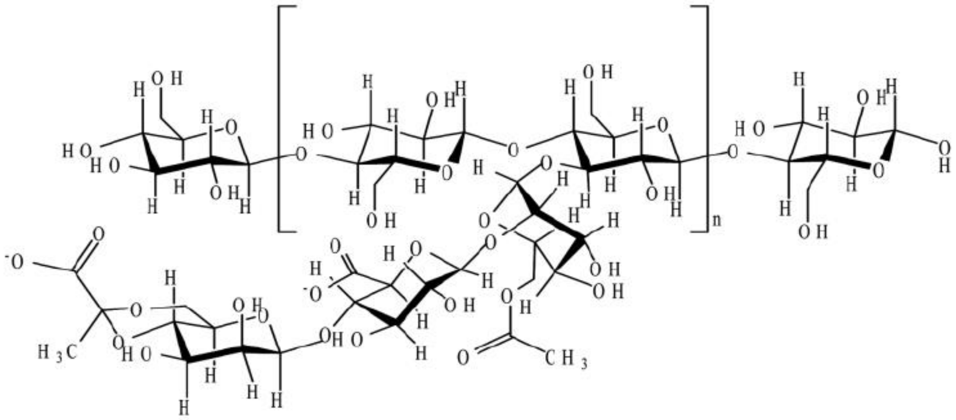
2.1 เจลแลน โครงสร้างประกอบด้วยเททระแซ็กคาไรด์โอส (β - กลูโคส-(1,4)- β-กรดกลูคูโรนิก -(1,4)- β กลูโคส -(1,4)- α-แรมโนส) ซ้ำกันเป็นสายตรงยาว มีหมู่แทนที่ L-กลีเซอริล บนตำแหน่ง C ที่ 2 ของ 1,3-กลูโคส และหมู่แทนที่กลุ่มอะซีติล อยู่บนตำแหน่ง C ที่ 6 ของ 1,3-กลูโคสเช่นกัน (รูปที่ 2.9) (Izydorczyk และคณะ, 2005) ผลิตจากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Aureomonas elodea*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Sphingomonas elodea* เป็นต้น (Rosenberg และคณะ, 2013)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างเจลแลน

ที่มา : Freitas และคณะ (2014)

2.2 แซนแทนกัม โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 เป็นสายหลัก และมีไตรแซ็กคาไรด์ (β-D-แมนโนส-(1,4)-β-D–กรดกลูโคโรนิก-(1,2)-α-D-แมนโนส) (รูปที่ 2.10) ผลิตจาก *Xanthomonas campestris* (Cui, 2005)



รูปที่ 2.10 โครงสร้างแซนแทนกัม
ที่มา : Khan และคณะ (2007)

2.3 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรมต่างๆ

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย ไม่ว่าจะเป็น อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง ด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการขุดเจาะน้ำมัน และการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น (Freitas และคณะ, 2011; Kumar และคณะ, 2004) เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีสมบัติทางกายภาพที่หลากหลาย จึงทำให้นำไปใช้ในงานได้หลายรูปแบบ เช่น สารให้ความข้นหนืด (viscosifying) สารก่ออิมัลชัน (emulsifying) สารให้ความคงตัว (stabilizing) สารก่อเจล (gelling) สารก่อฟิล์ม (film forming) สารอุ้มน้ำ สารก่อการจับกลุ่ม (flocculant) เป็นต้น (Baird และคณะ, 1983; Bajaj และคณะ, 2007; Rinaudo, 2008) การเลือกใช้พอลิแซ็กคาไรด์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆให้เหมาะสมนั้น จะต้องทราบสมบัติทางกายภาพ เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความสามารถของการทำข้น (thickener) ถูกนำไปใช้ เช่น ในแยม ซ๊อส น้ำเชื่อม หรือไส้ขนม (Baird และคณะ, 1983) ความสามารถในการเป็นสารเพิ่มความคงตัว นำไปใช้กับไอศกรีมและผลิตภัณฑ์นม หรือน้ำสลัด (Ramalingam และคณะ, 2014) ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ นำไปใช้ในน้ำสลัด มายองเนส หรือน้ำเครื่องปรุงชนิดต่างๆ (Tomasik, 2003) ความสามารถในการเพิ่มความข้นหนืด นำไปใช้ในอาหารและเครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์ยา และอุตสาหกรรมสีย้อม (De Vuyst และ Degeest, 1999; Freitas และคณะ, 2011) ความสามารถใน

การก่อเจล ถูกนำไปใช้ในขนมหวานต่างๆ เช่น ลูกกวาด เจลลี่ พาย และไส้ขนมต่างๆ (Baird และคณะ, 1983) ความสามารถในการอุ้มน้ำ ซึ่งประยุกต์ใช้ในการก่อสร้างคอนกรีตเพื่อป้องกันการแตกแยกของชั้นคอนกรีต (McIntosh และคณะ, 2005) ใช้ในการลดการสูญเสียน้ำในผลิตภัณฑ์นม (Badel และคณะ, 2011) ความสามารถในการก่อฟิล์ม ถูกนำมาใช้ในการเคลือบผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ลูกกวาด เม็ดยา เมล็ดและรากของพืช (Sutherland, 1990) ส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความสามารถในการเป็นสารก่อการจับกลุ่ม ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตน้ำดื่ม และกระบวนการ downstream ในกระบวนการหมัก (Shih และคณะ, 2001) รวมถึงการนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสีย (Salehizadeh และ Shojaosadati, 2001) โดยพอลิแซ็กคาไรด์จะเป็นตัวจับโลหะหนักและแยกออกมาจากน้ำเสีย (Corzo และคณะ, 1994; Loaec และคณะ, 1997) นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ยังมีประโยชน์ทางด้านการแพทย์อีก เช่น สารต้านการแข็งตัวของเลือด (anti-coagulant) (Sutherland, 1996) ป้องกันการเกิดลิ่มเลือด (Fan และคณะ, 2007) ช่วยเพิ่มปริมาตรของโลหิต (blood-plasma volume expander) ในผู้ป่วย (Uretimi, 2005) ควบคุมการปล่อยยาหรือเป็นตัวนำส่งยาเข้าสู่ระบบ และมีสมบัติต้านมะเร็ง (anti-tumor) ต้านไวรัส (anti-viral) และต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ได้เช่นกัน (Calazans และคณะ, 1997; Kumar และคณะ, 2004) การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรมต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.4 การประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรมต่างๆ

พอลิแซ็กคาไรด์	คุณสมบัติ	การประยุกต์
พูลลูแลน	- ละลายน้ำได้ - ความสามารถในการก่อฟิล์ม ซึ่งมีลักษณะโปร่งใส ทนความร้อนได้ และ ป้องกันการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน	- อาหาร - ยา
เจลแลน	- สารไฮโดรคอลลอยด์ - ทนต่อ pH ในช่วงกว้าง - สารก่อเจล - Thermoreversible gels - ความสามารถในการก่อฟิล์ม	- อาหาร - อาหารสัตว์ - ยา - สารเคลือบบริโภคได้ (edible coating) - การห่อหุ้มสารให้กลิ่นรส (flavour encapsulation) - งานวิจัย (ใช้ใน gel electrophoresis)
ลีแวน	- ความหนืดต่ำ - ละลายน้ำได้ดี - มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง, ต้านการอักเสบ - ความสามารถในการก่อฟิล์ม	- อาหาร (พรีไบโอติกส์) - อาหารสัตว์ - เครื่องสำอาง - การแพทย์ เช่น ใช้ในการเร่งการหายของแผล หรือใช้เป็นวัสดุปิดแผล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เคอร์ดแลน	- สามารถก่อเจลได้ - ไม่ละลายน้ำ - รับประทานได้และไม่เป็นพิษ - มีฤทธิ์ทางชีวภาพ	- อาหาร - กำจัดโลหะหนัก - ส่วนผสมของคอนกรีต - การแพทย์ เช่น ใช้เป็นสารเคลือบเม็ดยาและควบคุมการปลดปล่อยยา - สารเคลือบบริโภคได้
อัลจิเนต	- ละลายน้ำได้ - เป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ - ความสามารถในการก่อเจล - ความสามารถในการก่อฟิล์ม	- อาหาร - การแพทย์ เช่น ใช้เป็นวัสดุปิดแผลและควบคุมการปลดปล่อยยา
เซลลูโลส	- โครงสร้างเป็นผลึกสูง - ไม่ละลายในตัวทำละลาย - แรงต้านทานการดึงสูง (tensile strength)	- อาหาร (เส้นใยที่ย่อยไม่ได้) - การแพทย์ เช่น ใช้ในการเร่งการหายของแผล, เนื้อเยื่อหลอดเลือดเทียม
ไฮยาลูโรแนน	- มีฤทธิ์ทางชีวภาพ - ละลายน้ำได้ดี - เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (biocompatible)	- การแพทย์ เช่น ใช้ในการเร่งการหายของแผล หรือใช้เป็นวัสดุปิดแผล, ควบคุมการปลดปล่อยยา, ใช้ทำคอนแทคเลนส์
เดกซ์แทรน	- ไม่มีประจุ - มีความเสถียรดี -สมบัติการไหลชนิดนิวโตเนียน	- อาหาร - ยา (เพิ่มปริมาณเลือด) - ตัวดูดซับโครมาโตกราฟี
แซนแทนกัม	- เป็นสารไฮโดรคอลลอยด์ - ความหนืดสูงที่ความเข้มข้นต่ำ - ทนต่ออุณหภูมิ pH และความเข้มข้นเกลือในช่วงกว้าง	- อาหารและยา - ปิโตรเลียม - เครื่องสำอาง - การเกษตร

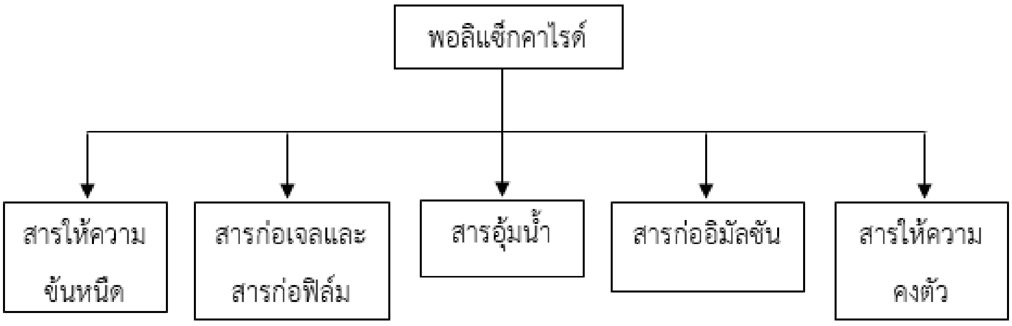
Chulalongkorn University

ซัคซิโนไกลแคน	- สมบัติการไหลชนิด Pseudoplastic fluid - ทนต่อกรด	- อาหาร - อุตสาหกรรมขุดเจาะน้ำมัน เช่น ใช้เพิ่มผลผลิตน้ำมันดิบ

ที่มา : (Freitas และคณะ, 2011; Freitas และคณะ, 2014)

2.4 การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารของพอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์มีบทบาทสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำพอลิแซ็กคาไรด์มาใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร เพื่อปรับปรุงคุณลักษณะต่างๆให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์ที่นำมาใช้มีสมบัติทางกายภาพที่หลากหลาย เช่น เป็นสารให้ความข้นหนืด (viscosifying) สารก่ออิมัลชัน (emulsifying) สารให้ความคงตัว (stabilizing) สารก่อเจล (gelling) และสารก่อฟิล์ม เป็นต้น (Jolly และคณะ, 2002) ดังแสดงในรูปที่ 2.11 จึงนิยมนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารอยู่หลายชนิด การนำพอลิแซ็กคาไรด์มาประยุกต์ใช้ในอาหารต่างๆ มีปัจจัยในการเลือกใช้ เช่น ประเภทของการนำไปประยุกต์ใช้ ความรู้สึกในการบริโภค (mouthfeel) ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ หรือสามารถเข้ากับส่วนผสมอื่นๆที่อยู่ในอาหารได้ เรื่องของราคา คุณภาพ และการยอมรับจากผู้บริโภค เป็นต้น (Sutherland, 1990)



รูปที่ 2.11 คุณสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์
ที่มา : ดัดแปลงจาก Khan และคณะ (2007)

พอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ที่นิยมนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร คือ แซนแทนกัม เจลแลน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า (Baird และคณะ, 1983) โดยแซนแทนกัมได้รับการอนุมัติให้ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารในปี ค.ศ.1969 จากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration (FDA)) ต่อมาในปี ค.ศ.1980 คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) อนุมัติให้แซนแทนกัมสามารถใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารได้เช่นเดียวกัน คือ ใช้เป็นสารให้ความคงตัว และสารให้ความข้นหนืด (Khan และคณะ, 2007) บริษัทที่มีการผลิต แซนแทนกัมทางการค้า เช่น Kelco และ Pfizer บริษัทจากสหรัฐอเมริกา Rhone-Poulenc บริษัทจากฝรั่งเศส เป็นต้น (Paul และคณะ, 1986) สำหรับเจลแลน ในปี ค.ศ. 1992 องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ได้อนุมัติให้เจลแลนใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารได้ (Bajaj และคณะ, 2007) โดยทั่วไปเจลแลนมักนิยมใช้เป็น สารให้ความคงตัว สารก่อเจล และสารให้ความข้นหนืดในอาหาร (Ramalingam และคณะ, 2014) มีหลายประเทศที่นำเจลแลนไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร เช่น ออสเตรเลีย แคนาดา สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และฟิลิปปินส์ เป็นต้น (Cui, 2005) โดยมี Kelco ในประเทศญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกาเป็นบริษัทหลักในการผลิตเจลแลนทางการค้า (Bajaj และคณะ, 2007) นอกจากนี้ เดกซ์แทรน และพูลลูแลน (Ravella และคณะ, 2010) ก็นิยมนำมาใช้ด้วยเช่นกัน เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติที่แตกต่างกัน จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารด้วยลักษณะที่แตกต่างกันได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์และการประยุกต์ใช้ในอาหาร

พอลิแซ็กคาไรด์	ลักษณะสมบัติ	การประยุกต์ใช้
แซนแทนกัม	สารก่ออิมัลชัน	น้ำสลัด
	สารให้ความข้นหนืด	น้ำเชื่อม, ทอปปิ้ง, เครื่องปรุงรส และซอส
	สารให้ความคงตัว	เครื่องดื่ม (น้ำผลไม้, นมผงปราศจากไขมัน (non-fat dry milk)), ผลิตภัณฑ์นม และเบเกอรี่
	สารลดการสูญเสียน้ำ	อาหารแช่แข็ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เจลแลน	สารก่อเจล สารเคลือบ ช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัส	เยลลี่ แยม ลูกกวาด ผลิตภัณฑ์อาหารและเนื้อที่ผ่านกระบวนการ น้ำตาลโรยหน้าขนม (ไอซ์ซิ่ง) ไส้พาย
พูลลูแลน	การก่อฟิล์ม	ลูกกวาด, อาหารขบเขี้ยว
เดกซ์แทรน	สารเพิ่มความหนืด	ไอศกรีม
	การก่อฟิล์ม	อาหารแช่แข็ง
อัลจิเนต	สารให้ความข้นหนืด สารให้ความคงตัว สารก่อเจล	ลูกอม, ผลิตภัณฑ์นม, เครื่องดื่ม.แยม, ซุป, ซอส, เนื้อสัตว์
เคอร์ดแลน	สารก่อเจล	เยลลี่, ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการ
	ช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัส	ผลิตภัณฑ์เนื้อที่ผ่านกระบวนการ
	สารเพิ่มความหนืด	ซอส
	สารลดการสูญเสียน้ำ	อาหารแช่แข็ง

ที่มา : Ramalingam และคณะ (2014)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5 *A. pullulans*

A. pullulans เป็นราคล้ายยีสต์ (yeast-like fungus) มีชื่อสามัญว่า แบล็คยีสต์ เนื่องจากในระหว่างการเจริญจะผลิตเม็ดสีเมลานินจึงทำให้โคโลนีมีสีดำ *A. pullulans* มีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น *Dematium pullulans*, *Pullularia pullulans, Aureobasidium vitis* และ *Pullularia fermentans* เป็นต้น เดิมมีการจัดจำแนกอยู่ใน Class Deuteromycetes (Fungi imperfecti) Order Moniliales Family Dermatiacae (Cooke, 1959) ปัจจุบันมีการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของเชื้อไว้ ดังรูปที่ 2.12 (De Hoog และคณะ, 1999; Thambugala และคณะ, 2014; Yurlova และคณะ, 1999)

Kingdom Fungi

Division Ascomycota

Class Dothideomycetes

Order Dothideales

Family Aureobasidiaceae

Genus *Aureobasidium*

Species *Aureobasidium pullulans*

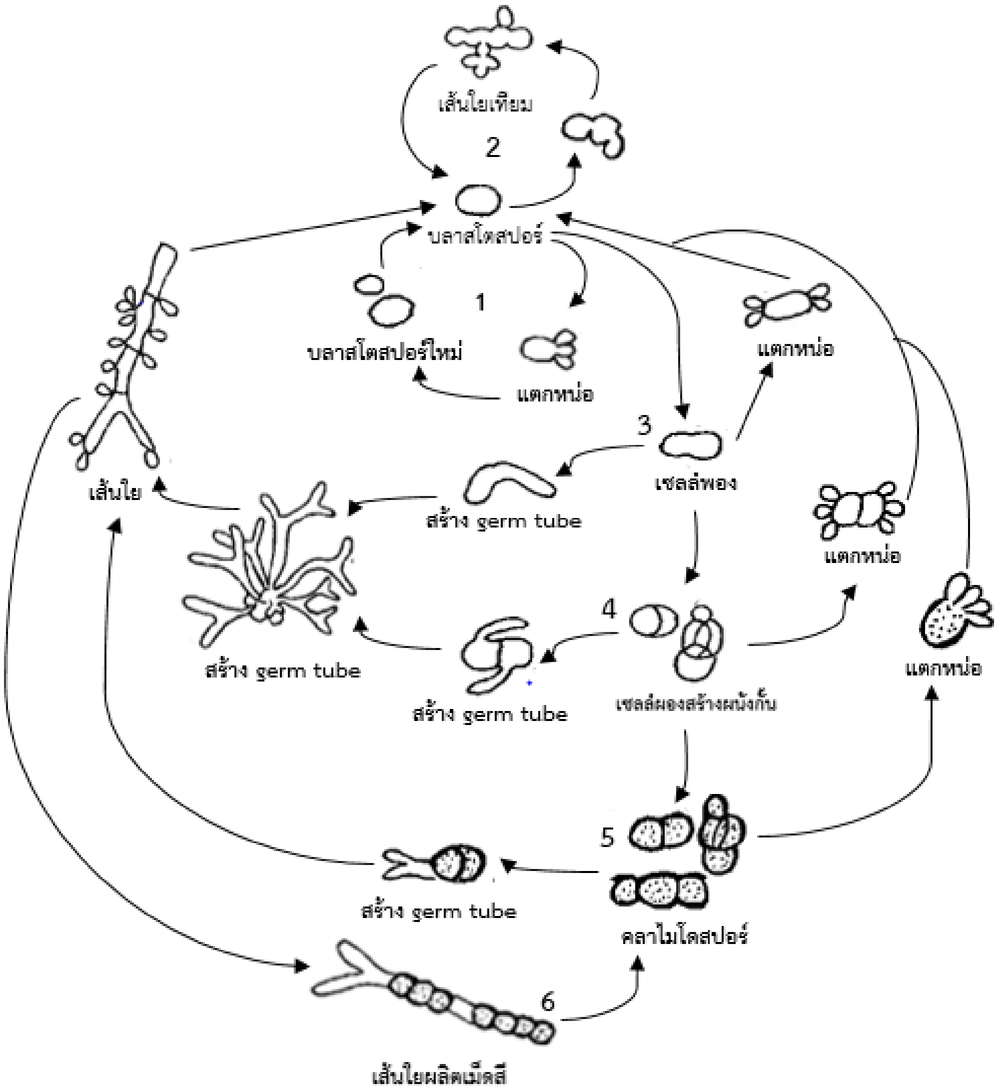
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 2.12 การจัดจำแนกอนุกรมวิธานของ *A. pullulans*
ที่มา : (De Hoog และคณะ, 1999; Thambugala และคณะ, 2014; Yurlova และคณะ, 1999)

A. pullulans เจริญภายใต้ภาวะที่มีอากาศ มีรูปร่างได้หลายลักษณะ (polymorphic form) เช่น บลาสโตสปอร์, เซลล์พอง, คลาไมโดสปอร์, เส้นใยแท้หรือเส้นใยเทียม เป็นต้น (Ramos และ Garcia Acha, 1975) โดยรูปร่างจะขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น (Gaur และคณะ, 2010; Ravella และคณะ, 2010) เชื้อนี้แบ่งออกเป็น 3 varieties คือ *A. pullulans* var. *pullulans*, *A. pullulans* var. *melanogenum* และ *A. pullulans* var. *aubasidani* Yurlova (Yurlova และ De Hoog, 1997)

ในระยะแรก โคโลนีมีลักษณะเรียบ เป็นเมือก มีสีเหลืองและต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีครีม สีชมพู หรือน้ำตาล และสุดท้ายจะกลายเป็นสีดำเนื่องจากคลาไมโดสปอร์ จะมีเส้นใยสั้นๆ ขึ้นอยู่รอบๆโคโลนี ลักษณะของเส้นใยโปร่งใส เรียบ ผนังบาง และมีผนังกั้น มีความกว้างของเส้นใยประมาณ 2-16 ไมโครเมตร เมื่อเลี้ยงนานขึ้นเส้นใยอาจมีสีเข้มขึ้น และมีผนังเซลล์หนาขึ้นเมื่ออยู่ในช่วงคลาไมโดสปอร์ (Ramos และ Garcia Acha, 1975) ได้อธิบายวงจรชีวิตของ *A. pullulans* แบ่งออกเป็น 6 ระยะ (รูปที่ 2.13) ดังนี้ ในระยะที่ 1 บลาสโตสปอร์เกิดการแตกหน่อได้บลาสโตสปอร์ใหม่ ระยะที่ 2 บลาสโตสปอร์สร้างเส้นใยเทียม คือ ลักษณะของเซลล์ใหม่ที่อยู่ติดกับเซลล์เดิม ระยะที่ 3 บลาสโตสปอร์กลายไปเป็นเซลล์พอง โดยเซลล์พองบางเซลล์จะเกิดการแตกหน่อเป็นบลาสโตสปอร์ใหม่ หรือมีการสร้างท่องอก (germ tube) และเปลี่ยนไปเป็นเส้นใย ระยะที่ 4 เซลล์พองจะสร้างผนังกั้นขึ้นมาโดยบางเซลล์อาจจะสร้างบลาสโตสปอร์ หรือ สร้างท่องอก และเปลี่ยนไปเป็นเส้นใยแบบที่มีผนังกั้น หรือบางเซลล์เริ่มมีผนังเซลล์หนาขึ้นและเปลี่ยนไปเป็นคลาไมโดสปอร์ ระยะที่ 5 คลาไมโดสปอร์สร้างท่องอก และเปลี่ยนไปเป็นเส้นใย ในบางกรณีคลาไมโดสปอร์อาจจะสร้างบลาสโตสปอร์ และระยะที่ 6 เส้นใยจะผลิตเม็ดสี และเปลี่ยนไปเป็นคลาไมโดสปอร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 2.13 วงจรชีวิตของ *A. pullulans*

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Ramos และ Garcia Acha (1975)

ราชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยเฉพาะบริเวณผิวของใบพืช (phyllosphere) ซึ่งเชื้อนี้สามารถก่อโรคในพืช นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในบริเวณอื่นๆอีก เช่น ในดิน บริเวณปากแม่น้ำ น้ำทะเล ตะกอนในมหาสมุทร หินปูน หญ้าแห้ง เนื้อไม้ หิน เศษฟาง หรือบริเวณที่มีความชื้นสูง เช่น ผนังห้องน้ำ ม่านห้องน้ำ ห้องครัว ขอบหน้าต่าง เป็นต้น (Deshpande และคณะ, 1992) *A. pullulans* ยังสามารถพบได้ในแถบประเทศเขตอบอุ่น เช่น อังกฤษ อลาสกา แอนตาร์กติกา เดนมาร์ก เยอรมนี เนเธอร์แลนด์ โปแลนด์ ออสเตรีย รัสเซีย และสหรัฐอเมริกา เป็นต้น แถบประเทศในเขตทะเลเมดิเตอร์เรเนียนและเขตแห้งแล้ง เช่น อิตาลี ฝรั่งเศส อียิปต์ อิรัก ปากีสถาน และ อัฟริกาใต้ เป็นต้น หรือในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เช่น บราซิล อินเดีย จีน ไทย มาเลเซีย และจาไมกา เป็นต้น รวมทั้งในเขตขั้วโลกเหนือ เช่น นอร์เวย์ (Gaur และคณะ, 2010; Zalar และคณะ, 2008) ในประเทศไทย Punnapayak และคณะ (2003) คัดแยก *A. pullulans* จากอากาศในเขตกรุงเทพมหานครและป่าสนเขา Prasongsuk และคณะ (2005) แยกเชื้อได้จากบริเวณผิวใบไม้ ผนังทาสีและผนังห้องน้ำ และ Lotrakul และคณะ (2009) แยกเชื้อได้จากบริเวณพื้นผิวห้องน้ำ และพบว่าเชื้อมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* sp.

A. pullulans เป็นเชื้อที่มีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมการเกษตร อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมทางการแพทย์ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น เนื่องจากสามารถผลิตสารได้หลากหลายชนิด เช่น โปรตีนเซลล์เดียว, ซิเดอโรฟอร์ และเอนไซม์ เช่น อะไมเลส, เซลลูเลส, โปรติเอส, เพคติเนส และไลเปส เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2.6 (Chi และคณะ, 2009; Deshpande และคณะ, 1992) นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* ยังมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก พูลลูแลน เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่ง โครงสร้างประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตไตรโอสหลายหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา-1,6- ไกลโคซิดิก (α-1,6-glycosidic bond) (Gniewosz และ Duszkiewicz-Reinhard, 2008) สมบัติของพูลลูแลน คือ ละลายน้ำได้ดี ไม่เป็นพิษ ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือมะเร็ง สามารถรับประทานได้ ไม่มีรสและกลิ่น (Choudhury และคณะ, 2011; Gniewosz และ Synowiec, 2011; Leathers, 2003) ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำพูลลูแลนมาประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มความข้นหนืดในอาหาร เช่น ในซอส ซุป หรือ สารให้ความคงตัวในมายองเนส การเติมสารนี้ลงไปทำให้อาหารมีความเหนียวหนืด นุ่ม คงรูป เหมือนมีแป้งหรือไขมันผสมอยู่ ช่วยลดการเติมไขมันหรือแป้งลงในอุตสาหกรรมอาหาร เหมาะแก่ผู้บริโภคที่ต้องการบริโภคอาหารแคลอรี่ต่ำ (Cheng และคณะ, 2011; Leathers, 2003) นอกจากนี้พูลลูแลนมีสมบัติสามารถขึ้นเป็นรูปฟิล์มได้ จึงมีการนำพูลลูแลนมาทำฟิล์มหรือสารเคลือบที่สามารถบริโภคได้ (edible film and coating) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหาร ช่วยลดการสูญเสียความชื้น ลดการแลกเปลี่ยนแก๊สที่สำคัญ เช่น แก๊สออกซิเจน และแก๊ส

คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของอาหาร (Fajardo และคณะ, 2010) พูลลูแลนถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารที่ประเทศญี่ปุ่นอย่างกว้างขวางเป็นเวลากว่า 20 ปี โดยในปี ค.ศ.1959 บริษัท Hayashibara ของประเทศญี่ปุ่นผลิตพูลลูแลนทางการค้าออกมาขายเป็นครั้งแรกและในปี ค.ศ. 2002 พูลแลนถูกจัดให้เป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) โดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีความปลอดภัยต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Cheng และคณะ, 2011; Oguzhan และ Yangılar, 2013)

ตารางที่ 2.6 การประยุกต์ใช้ *A. pullulans* ในอุตสาหกรรมต่างๆ

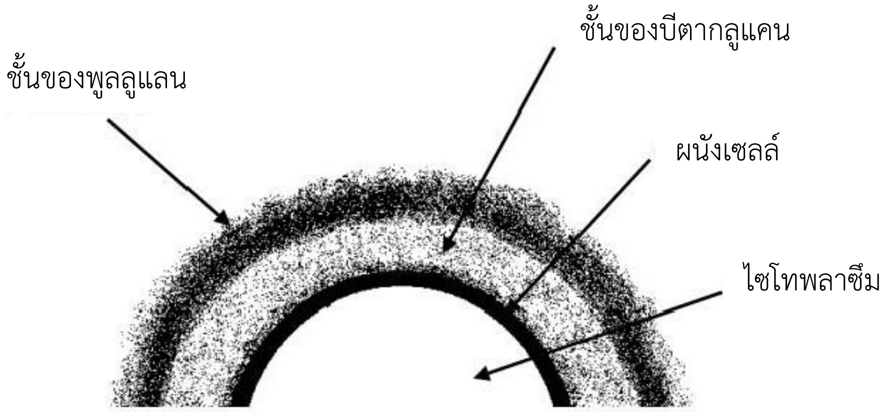
ผลิตภัณฑ์	การประยุกต์ใช้
พูลลูแลน	ฟิล์มที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของออกซิเจน (oxygen-impermeable film) สารเพิ่มความข้นหนืด สารยึดติดหรือสารห่อหุ้ม สารผสมในอาหารที่มีแคลอรี่ต่ำ สารต้านการจับตัวเป็นก้อนของเลือด ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมทางเคมี
อะไมเลส	ใช้ในขั้นตอนการย่อยแป้งให้เป็นของเหลว (starch liquefaction) และเปลี่ยนเป็นน้ำตาล สารลอกแป้งออกในอุตสาหกรรมผ้า เป็นสารเติมในผลิตภัณฑ์ซักล้าง ใช้ในการผลิตเอทานอล ใช้วิเคราะห์ในทางการแพทย์และเคมีคลินิก ใช้ในการผลิตน้ำเชื่อมฟรุกโทส และยังใช้ในการผลิตยีสต์และจุลินทรีย์อื่นๆ
เซลลูเลส	ช่วยปรับปรุงเส้นใยเซลลูเลส อุตสาหกรรมสิ่งทอใช้ในการฟอกผ้า (stone wash) เป็นสารเติมในผลิตภัณฑ์ซักล้าง ใช้ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว และเชื้อเพลิงชีวภาพ ใช้ในการบำบัดของเสีย
ไลเปส	ใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยา เช่น ไฮโดรไลซิส อินเตอร์-เอสเทอร์ริฟิเคชัน แอลกอฮอล์ไลซิส อะติโดไลซิส เอสเทอร์ริฟิเคชันและ อะมิโนไลซิส เป็นต้น ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แอลคาไลน์ โปรติเอส	เป็นสารเติมในผลิตภัณฑ์ซักล้าง ใช้ในการแยกโลหะเงิน ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมเคมี บำบัดของเสีย และใช้ในการย่อยโปรตีน
ไซแลนเนส	ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมอาหาร และใช้ในการบำบัดของเสีย
แมนนาเนส	ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกเยื่อกระดาษ ใช้ในการเปลี่ยนของเหลือทิ้งจากชีวมวลให้กลายเป็นน้ำตาลที่หมักได้ ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหารสัตว์ ใช้ลดความหนืดของสารสกัดจากกาแฟ และใช้ในการผลิตแมนโน – โอลิโกแซ็กคาไรด์
โปรตีนเซลล์เดียว	ใช้เป็นอาหารสัตว์และอาหารมนุษย์ ใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับการผลิต bioactive peptide
การควบคุมโดยวิธีชีวภาพ (biocontrol)	ใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในผลไม้ ธัญพืชและผัก
ซิเดอโรฟอร์	ใช้ในทางการแพทย์ ใช้ในการแยกโลหะและบำบัดของเสีย

ที่มา: Chi และคณะ (2009)

A. pullulans สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นๆได้อีกนอกจากพูลลูแลน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอาหารที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ Yurlova และ De Hoog (1997) พบว่า *A. pullulans* สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่เรียกว่า ออบาซิแดน (aubasidan) ได้ โดยโครงสร้างจะเป็นกลูแคนที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,3, α-1,4 และ β-1,6 ไกลโคซิดิก Kikuchi และคณะ (1973) พบว่า *A. pullulans* ผลิตเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส แมนโนส และกาแลกโตส ผนังเซลล์ของ *A. pullulans* ประกอบด้วย เฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์และบีตากลูแคนเชื่อมต่อกันด้วย β-(1,3) และ β-(1,6) Simon และคณะ (1993) ศึกษาผนังเซลล์ของ *A. pullulans* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าประกอบด้วยพูลลูแลน และเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำอยู่บริเวณพื้นผิวด้านนอกของคลาไมโดสปอร์ โดยด้านนอกจะประกอบด้วยพูลลูแลนอยู่อย่างหนาแน่นและถัดมาเป็นชั้นของบีตากลูแคนชนิด β-1,3 ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสและแมนโนส (รูปที่ 2.14)



รูปที่ 2.14 ชั้นของพอลิแซ็กคาไรด์บนผนังเซลล์ของ *A. pullulans*
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Shingel (2004)

2.6 ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

2.6.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* จากงานวิจัยได้มีการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส แรมโนส กาแลคโตส แลคโตส เซลโลไบโอส และมอลโตส เป็นต้น ในรายงานต่างๆพบว่า น้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ คือ น้ำตาลกลูโคส และซูโครส ดังงานวิจัยของ Punnapayak และคณะ (2003) ได้ศึกษาแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส และซูโครส ต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* ที่แยกได้จากอากาศในเขตกรุงเทพมหานคร พบว่าทั้งสามไอโซเลตที่แยกได้มีแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ กลูโคส เช่นเดียวกับรายงานของ Duan และคณะ (2008) พบว่าน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตพูลลูแลนของ *A. pullulans* Y68 คือ กลูโคส เมื่อเทียบกับน้ำตาลอื่นๆ คือ ซูโครส ฟรุคโทส ไซโลส มอลโทส และเดกซ์ทริน และรายงานของ Ravella และคณะ (2010) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งคาร์บอน 5 แหล่ง คือ ซูโครส กลูโคส ไซโลส ฟรุคโตส และเซลโลไบโอส พบว่า ซูโครสให้ผลผลิตสูงที่สุด คือ 50.9 กรัมต่อลิตร

2.6.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* ก็มีความสำคัญเช่นเดียวกัน ดังในรายงานของ Ravella และคณะ (2010) พบว่าการใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถเพิ่มการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ

corn steep liquor, ยูเรีย และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยได้สูงถึง 54.7 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้แหล่งไนโตรเจนอื่นที่เหมาะสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังงานวิจัยของ Gaur และ Singh (2010) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสำหรับการผลิตพูลลูแลนโดยเปรียบเทียบจาก 5 แหล่ง คือ แอมโมเนียมซัลเฟต สารสกัดจากยีสต์ โซเดียมไนเตรท โซเดียมไนไตรท์ และฮีสทิดีน ที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น และผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด คือ 37.1 ± 0.8 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ระดับของไนโตรเจนส่งผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* โดยพบว่าถ้ามีไนโตรเจนในปริมาณที่จำกัดจะช่วยส่งเสริมในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ เพราะเชื้อจะใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แทนการใช้ในการเจริญเติบโต (Bulmer และคณะ, 1987; Seo และคณะ, 2004)

2.6.3 ความเป็นกรด-เบส (pH)

pH ที่เหมาะสมมีผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* โดยระหว่างการเลี้ยงเชื้อ pH จะมีค่าลดลง (Prasongsuk และคณะ, 2007; Wu และคณะ, 2009) เนื่องจากมีการผลิตกรดอินทรีย์เกิดขึ้นระหว่างการเจริญของเชื้อ (Chi และ Zhao, 2003) โดยระดับ pH เริ่มต้นที่ 2.5 จะมีผลไปยับยั้งการผลิตพูลลูแลน แต่จะไปกระตุ้นการผลิตกลูแคนที่ไม่ละลายแทน (insoluble glucan) (Gaur และ Singh, 2010; Shingel, 2004) Cheng และคณะ (2011) ศึกษาผลกระทบของ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพูลลูแลนของ *A. pullulans* โดยระแยกแรกให้มีระดับ pH เริ่มต้นที่ 2 และเปลี่ยนเป็น 5 ในวันที่ 3 พบว่า ในระยะแรกที่มีค่า pH เป็น 2 พูลลูแลนที่ผลิตได้มีปริมาณน้อยมาก แต่เชื้อจะมีการสะสมชีวมวลแทน และเมื่อเปลี่ยนค่า pH เป็น 5 เชื้อจะมีการผลิตพูลลูแลนได้มากขึ้น ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่า เชื้อจะมีการสะสมชีวมวลที่ระดับ pH ต่ำๆ และผลิตพูลลูแลน เมื่อระดับ pH ที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Sugumaran และคณะ (2013) รายงานผลของ pH ต่างๆ คือ 3 5 6 6.5 7 9 และ 11 ต่อการผลิตพูลลูแลนของ *A. pullulans* พบว่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการผลิตพูลลูแลน คือ 6.5 โดยผลิตได้สูงสุดที่ 16.39 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ pH ยังมีผลต่อรูปร่างของ *A. pullulans* โดยระดับ pH ที่ต่ำๆ เชื้อจะอยู่ในรูปของเส้นใย แต่จะอยู่ในรูปเซลล์เมื่อ pH ที่สูงขึ้น (McNeil และคณะ, 1989) ดังรายงานของ Wu และคณะ (2009) พบว่า ระดับ pH ที่ต่ำกว่า 3 เชื้อจะอยู่ในรูปของเส้นใย และเมื่อ ระดับ pH มากกว่า 5 เชื้อจะอยู่ในรูปของเซลล์เดี่ยวเป็นส่วนใหญ่ เชื้อที่อยู่ในรูปของเซลล์พอง บลาสโตสปอร์และคลาไมโดสปอร์พบว่าจะมีการผลิตพูลลูแลน (Sugumaran และคณะ, 2013) แต่มีบางงานวิจัยรายงานว่าเส้นใยและเซลล์จะพบการผลิตพูลลูแลนเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน (Cheng และคณะ, 2011)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.6.4 อุณหภูมิ

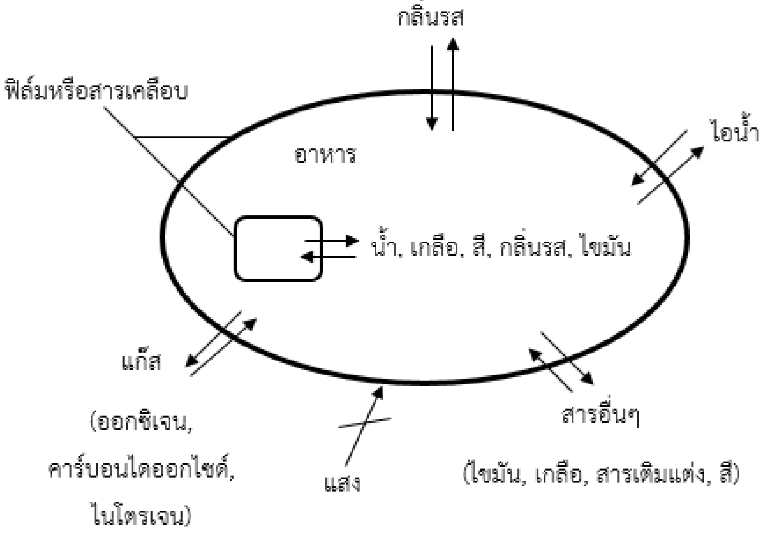
อุณหภูมิเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (McNeil และ Kristiansen, 1990) Wu และคณะ (2010) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* คือ ที่ 26 องศาเซลเซียส ผลิตได้ถึง 27.4 กรัมต่อลิตร ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 32 องศาเซลเซียส โดยน้ำหนักเซลล์อยู่ที่ 10.0 กรัมต่อลิตร Punnapayak และคณะ (2003) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* 3 สายพันธุ์ที่แยกได้จากอากาศในเขตกรุงเทพมหานคร พบว่ามีสองสายพันธุ์ที่ผลิตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนอีกสายพันธุ์สามารถผลิตได้ดีที่ 25 องศาเซลเซียส Cheng และคณะ (2011) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* ที่อุณภูมิต่างๆ คือ 25 28 30 และ 32 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมมากที่สุด คือ 30 องศาเซลเซียส โดยผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด คือ 10.1 กรัมต่อลิตร ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Chi และ Zhao, 2003)

2.6.5 การให้อากาศหรือการกวน

อัตราการให้อากาศหรืออัตราการกวนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เพราะ *A. pullulans* ต้องการออกซิเจนในการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ (Gaur และ Singh, 2010; Lee และคณะ, 2001; Madi และคณะ, 1996) Cheng และคณะ (2011) ได้ศึกษาอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเปรียบเทียบความเร็วรอบ คือ 100 200 และ 500 รอบต่อนาที (rpm) พบว่าผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด คือ 22.6 กรัมต่อลิตร ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อาจเนื่องมาจากถ้ากวนแรงเกินไปจะทำให้เกิดแรงเฉือน (shearing force) สูง จนทำให้จุลินทรีย์เสียหายหรือแตกกระจายได้ และแปรผันอัตราการให้อากาศที่ 0.5 1.0 1.5 และ 2.0 ลิตรอากาศต่อลิตรอาหารต่อนาที (vvm) จากการศึกษาพบว่า การให้อากาศที่ 1.5 vvm ให้พอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 25.8 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับรายงานของ Sheoran และคณะ (2012) พบว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของ *A. pullulans* คือ 1.5 vvm Lee และคณะ (2001) รายงานผลของการแปรผันอัตราการให้อากาศที่ค่าต่างๆ คือ 0.25 0.5 1 และ 1.5 vvm ต่อการเจริญและการผลิตพลอิแซ็กคาไรด์ พบว่า การให้อากาศที่ 0.5 vvm ให้พอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 15 กรัมต่อลิตร ส่วนการเจริญพบว่าการให้อากาศที่ 1.5 vvm สูงที่สุด คือ 14 กรัมต่อลิตร

2.7 ฟิล์มและสารเคลือบที่บริโภคได้ (edible film and coating)

ฟิล์มที่บริโภคได้ คือ แผ่นฟิล์มที่มีลักษณะเป็นชั้นบางๆ ทำจากวัตถุดิบที่สามารถรับประทานได้ ใช้เพื่อเคลือบหรือห่อหุ้มผลิตภัณฑ์อาหารโดยตรง เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และไขมัน (Bourtoom, 2008) ฟิล์มนี้ช่วยควบคุมการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ ช่วยชะลอการซึมผ่านของไอน้ำ แก๊ส เช่น แก๊สออกซิเจน แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ สารป้องกันจุลินทรีย์ หรือสารอื่นๆจากอาหาร ช่วยเก็บรักษากลิ่นรสได้ ป้องกันการเกิดสีน้ำตาล อันเป็นผลให้ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหารได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.15 (Umaraw และ Verma, 2015; Valencia-Chamorro และคณะ, 2011) การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทาด้วยแปรง การพ่นฝอย การห่อหุ้ม และการจุ่ม (Sanchez-Ortega และคณะ, 2014)การใช้ฟิล์มและสารเคลือบที่บริโภคได้มีมานานแล้ว โดยพบว่าในศตวรรษที่ 12 และ13 ประเทศจีนได้ทดลองนำไข (wax) มาเคลือบผิวส้มและมะนาวเพื่อชะลอการระเหยของน้ำ ป้องกันการสูญเสียความชื้น ในศตวรรษที่ 16 ได้มีการนำชิ้นเนื้อสัตว์มาเคลือบด้วยไขมัน (fat) เพื่อป้องกันการหดตัวของชิ้นเนื้อ และในศตวรรษต่อมามีการเก็บรักษาเนื้อสัตว์และอาหารอื่นๆโดยเคลือบด้วยฟิล์มเจลาติน ศตวรรษที่ 19 มีการนำซูโครสมาเคลือบถั่ว อัลมอนด์ และ เฮเซลนัท เป็นครั้งแรก เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น และ การเกิดเหม็นหืน ระหว่างการเก็บ นับตั้งแต่ช่วงทศวรรษที่ 1930 ฟิล์มและสารเคลือบที่บริโภคได้ถูกพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง ได้มีการนำอิมัลชันที่เกิดจากขี้ผึ้งและน้ำมันในน้ำฉีดพ่นลงบนผลไม้เพื่อปรับปรุงลักษณะที่ปรากฏให้ดีขึ้น เช่น ความมันวาว สี หรือใช้เป็นตัวนำสารป้องกันจุลินทรีย์ ช่วยควบคุมการสุกและชะลอการสูญเสียความชื้น นอกจากนี้ยังมีการนำพอลิแซ็กคาไรด์มาเคลือบเนื้อสัตว์ เช่น แอลจิเนต คาราจีแนน เพกติน อนุพันธ์ของแป้ง เพื่อใช้ในการปรับปรุงคุณภาพเนื้อสัตว์ที่เก็บไว้ (Debeaufort และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.15 หน้าที่ของฟิล์ม
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Debeaufort และคณะ (1998)

ฟิล์มเกิดจากโครงสร้างของพอลิเมอร์โดยมีแรง 2 ชนิด เข้ามาเกี่ยวข้อง คือ แรงแอดฮีชัน (adhesion) เป็นแรงระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์กับสารอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมฟิล์ม เช่น แรงระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์กับสารเสริมสภาพพลาสติก และแรงโคฮีชัน (cohesion) เป็นแรงระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยกันเอง จะเกิดขึ้นระหว่างการเกิดฟิล์ม ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันของผิววัตถุเดียวกัน ช่วยป้องกันหรือต้านทานการแยกออกจากกัน (Guilbert และคณะ, 1996) ฟิล์มและสารเคลือบที่บริโภคได้มีข้อดี คือ วัตถุดิบที่ใช้ในการทำฟิล์มมีความปลอดภัยจึงสามารถบริโภคได้ไปพร้อมกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้เคลือบหรือห่อหุ้มสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable) เป็นการช่วยลดปัญหามลพิษทางด้านสิ่งแวดล้อม (Debeaufort และคณะ, 1998) ซึ่งเป็นจุดเด่นของฟิล์มนี้ที่ไม่พบในฟิล์มพลาสติก โดยฟิล์มพลาสติกย่อยสลายได้ยากและใช้ระยะเวลานาน ดังนั้นผู้ผลิตจึงหันมาให้ความสนใจในการผลิตบรรจุภัณฑ์ที่ทำมาจากวัตถุดิบที่มีความปลอดภัยและสามารถย่อยสลายได้กันมากขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้แก่ผลิตภัณฑ์ เช่น ฟิล์มที่ทำมาจากโปรตีน ช่วยเพิ่มคุณค่าทางประสาทสัมผัสของอาหารทำให้น่ารับประทานมากขึ้น ใช้เคลือบหรือห่อหุ้มผลิตภัณฑ์ที่เป็นชิ้นเล็กๆได้ เช่น ถั่ว ลูกแพร์ สตรอเบอรี่ ใช้เป็นตัวป้องกันการถ่ายเทความชื้นระหว่างองค์ประกอบของอาหารที่มีความแตกต่างกัน เช่น พิซซ่า พาย ช่วยชะลอการเสื่อมเสียของอาหารโดยทำหน้าที่เป็นตัวนำสารป้องกันจุลินทรีย์และสารกันหืน และยังสามารถใช้ร่วมกับฟิล์มพลาสติกได้โดย

ให้ฟิล์มบริโภคสัมผัสกับอาหารโดยตรง (Bourtoom, 2008; Dhanapal และคณะ, 2012; Valencia-Chamorro และคณะ, 2011)

ฟิล์มมีองค์ประกอบหลักคือ สารก่อฟิล์ม ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ตัวทำละลาย และพลาสติไซเซอร์ (plasticizer) ซึ่งเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จุดเดือดสูง ระเหยยาก และสามารถรวมเป็นเนื้อเดียวกับสารก่อฟิล์มได้ เช่น กลีเซอรอล ซอร์บิทอล กลูโคส ซูโครส พอลิเอทิลีนไกลคอล พรอพิลีนไกลคอล กรดไขมัน สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ฟอสโฟลิพิด และมอนอกลีเซอไรด์ (Janjarasskul และ Krochta, 2010; Valencia-Chamorro และคณะ, 2011) พลาสติไซเซอร์จะทำหน้าที่ในการช่วยเพิ่มความยืดหยุ่น ทำให้ฟิล์มไม่เปราะหรือแตกหักง่าย โดยจะไปลดแรงยึดเหนี่ยวโมเลกุลระหว่างสายของพอลิเมอร์ ส่งผลทำให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม พลาสติไซเซอร์ที่เติมลงไปอาจไปเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของแก๊สและไอน้ำได้เช่นเดียวกัน (Dhanapal และคณะ, 2012; Skurtys และคณะ, 2010; Valencia-Chamorro และคณะ, 2011)

Laohakunjit และ Noomhorm (2004) ศึกษาผลของพลาสติไซเซอร์ 3 ชนิด คือ กลีเซอรอล ซอร์บิทอล และ พอลิเอธิลีนไกลคอล ต่อสมบัติของฟิล์มจากแป้งข้าว (rice starch) โดยฟิล์มที่ใช้ซอร์บิทอลและกลีเซอรอลเป็นพลาสติไซเซอร์ พบว่าฟิล์มมีลักษณะเป็นเนื้อเดียว (homogeneous) ผิวเรียบ ใส และมีส่วนของอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำหลงเหลือน้อยกว่าเมื่อเทียบกับฟิล์มจากแป้งข้าวที่ไม่เติมพลาสติไซเซอร์ ส่วนฟิล์มที่เติมพอลิเอทิลีนไกลคอลไม่สามารถก่อเป็นฟิล์มได้ ฟิล์มที่เติมกลีเซอรอลมีค่าความต้านทานแรงดึงขาดต่ำกว่าฟิล์มที่เติมซอร์บิทอล แต่มีค่าการยืดตัวสูงกว่า และเมื่อเติมกลีเซอรอลทำให้อัตราการซึมผ่านของไอน้ำและอัตราการซึมผ่านของออกซิเจนเพิ่มขึ้นมากกว่าเมื่อเทียบกับซอร์บิทอล โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลและซอร์บิทอลจะทำให้อัตราการซึมผ่านของไอน้ำและอัตราการซึมผ่านของออกซิเจนเพิ่มขึ้น ส่วนค่าความต้านทานแรงดึงขาดต่ำลง ดังนั้นการเติมซอร์บิทอลที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ลงไปในฟิล์มให้ค่าความต้านทานแรงดึงขาดที่สูงกว่าและอัตราการซึมผ่านของไอน้ำและอัตราการซึมผ่านของออกซิเจนต่ำกว่า จึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้เป็นสารเคลือบผลิตภัณฑ์ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Piermaria และคณะ (2009) ศึกษาการเตรียมฟิล์มจากคีเฟอแรน (kefiran) และผลของพลาสติไซเซอร์ คือ กลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อสมบัติของฟิล์ม พบว่าฟิล์มที่เติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 25 กรัม ต่อ 100 กรัม ของคีเฟอแรน ให้ค่าการซึมผ่านของไอน้ำที่เหมาะสม คือ 4.09×10^{-11} g/m s Pa ส่วนฟิล์มที่ไม่เติมกลีเซอรอลมีลักษณะเปราะและแข็ง โดยมีค่ามอดูลัสยืดหยุ่น (elastic modulus) และค่าการต้านทานแรงดึงขาดสูง การเติมกลีเซอรอลช่วยให้ฟิล์มที่ได้มีค่าการยืดตัวสูงขึ้น โดยมีความยืดหยุ่นใกล้เคียงกับฟิล์มจากพอลิเมอร์สังเคราะห์

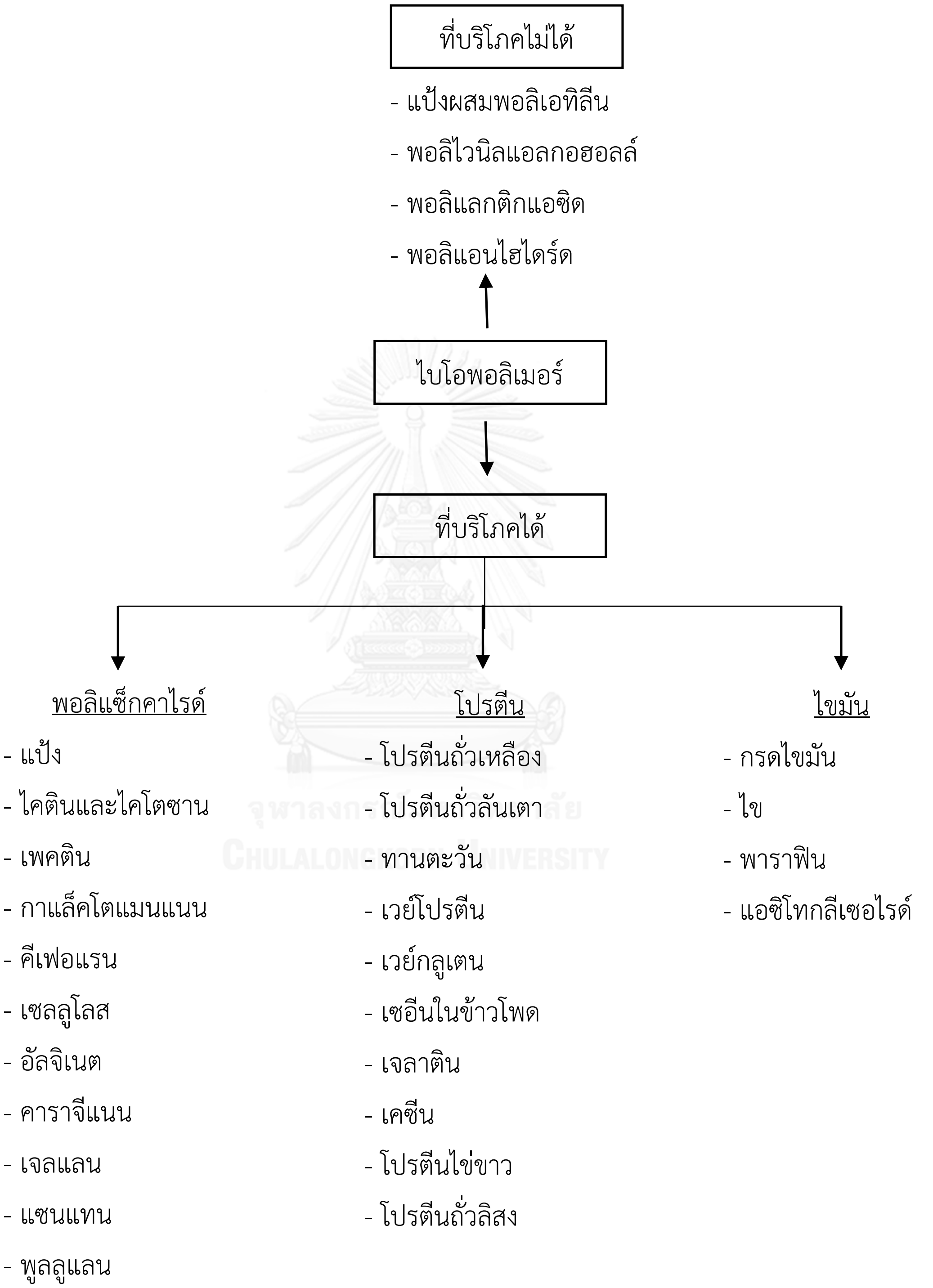
ชนิดของฟิล์มและสารเคลือบที่บริโภคได้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท (Khan และคณะ, 2013) (รูปที่ 2.16) ดังนี้

1. ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ เช่น แซนแทนกัม แคร์ราจีแนน แอลจิเนต ไคติน ไคโตซาน เพกทิน แป้ง เจลแลนพูลลูแลน อนุพันธ์ของเซลลูโลส พอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติชอบรวมตัวกับน้ำ (hydrophillic) จึงไม่เหมาะสำหรับการนำมาใช้ป้องกันการซึมผ่านความชื้น แต่มีสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของแก๊สได้ดี (Janjarasskul และ Krochta, 2010) ดังนั้นจึงนำมาใช้ในการช่วยยืดอายุการเก็บรักษาพวกผัก ผลไม้ และป้องกันการเกิดสีน้ำตาล นอกจากนี้ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดยังช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid oxidation) และองค์ประกอบอื่นในอาหารที่ทำให้เกิดการเหม็นหืนได้อีกด้วย (Dhanapal และคณะ, 2012) มีการนำไคโตซานมาเคลือบผักและผลไม้ เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษา เช่น ลำไย มะม่วง และลิ้นจี่ที่ปอกเปลือกแล้ว พบว่าไคโตซานสามารถป้องกันการสูญเสียความชื้น (Chien และคณะ, 2007; Dong และคณะ, 2004; Jiang และ Li, 2001) Lee และคณะ (2003) รายงานว่าแอปเปิ้ลที่เคลือบด้วยคาราจีแนน วิตามินซี กรดซิตริก และกรดออกซาลิก ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่ทำการทดสอบ ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส

2. ฟิล์มโปรตีน เช่น เจลาติน โปรตีนจากข้าวโพด คอลลาเจน เคซีน กลูเตน โปรตีนจากถั่วเหลือง เคราติน เจลาติน ไข่ขาว มีคุณสมบัติในการป้องกันการแพร่ผ่านของแก๊สได้ดี แต่เป็นตัวกั้นไอน้ำที่ไม่ดี เนื่องจากมีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) เช่นเดียวกับฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ (Khan และคณะ, 2013) Baldwin และคณะ (1996) รายงานว่าการเติมโปรตีนจากถั่วเหลืองลงไปใน nature seal 1020 ช่วยลดการสูญเสียน้ำและการซึมผ่านของออกซิเจนในแอปเปิ้ลและมันฝรั่งหั่นชิ้นที่ถูกเคลือบไว้ Bai และคณะ (2003) ศึกษาการเคลือบแอปเปิ้ลด้วยโปรตีนข้าวโพดและโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) พบว่าระดับความเข้มข้นของโปรตีนและโพรพิลีนไกลคอลที่ยอมรับได้ คือ 10 % โดยน้ำหนัก และเมื่อเทียบกับการเคลือบด้วยเชลแล็ก (shellac) พบว่าการเคลือบด้วยวิธีนี้ช่วยรักษาคุณภาพได้ใกล้เคียงกัน

3. ฟิล์มไขมัน เช่น กรดไขมัน ไข (wax) แอซิโทกลีเซอไรด์ (Valencia-Chamorro และคณะ, 2011) มีสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำและแก๊สที่ดี เนื่องจากมีสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) (Suput และคณะ, 2015; Valencia-Chamorro และคณะ, 2011) จึงมีการนำมาใช้กับผักและผลไม้ เพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้นและชะลอการเสื่อมเสียอันเนื่องมาจากการหายใจที่จะทำให้ผลไม้สุกงอม ฟิล์มไขมันถูกนำมาใช้เป็นสารเคลือบมากกว่าจะนำมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม เนื่องจากจำนวนโมเลกุลของไขมันที่เชื่อมต่อกันไม่ได้มีจำนวนมากเหมือนพอลิแซ็กคาไรด์ หรือ โปรตีน จึงทำให้ฟิล์มที่ได้มีความเปราะบาง แตกง่าย ไม่สามารถขึ้นรูปฟิล์มได้ และยังมีกลิ่นเหม็นหืน ดังนั้นจึง

นิยมนำไขมันมาใช้ร่วมกับพอลิเมอร์อื่นๆ เพื่อปรับปรุงสมบัติการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มให้ดีขึ้น (Janjarasskul และ Krochta, 2010) หรือที่เรียกว่า ฟิล์มประกอบ (composite films)



รูปที่ 2.16 ชนิดของฟิล์มและสารเคลือบที่บริโภคได้

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Suput และคณะ (2015)

ฟิล์มประกอบ เกิดจากการนำพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน หรือไขมันมาใช้ร่วมกัน โดยใช้ลักษณะเด่นของสารแต่ละชนิดในการช่วยปรับปรุงสมบัติของฟิล์มให้ดีขึ้น คือ พอลิแซ็กคาไรด์และโปรตีนมีคุณสมบัติชอบน้ำทำให้รวมตัวกับน้ำได้ดี ทำให้ป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำต่ำ (water vapor transmission) จึงไม่เหมาะในการนำมาใช้ป้องกันการซึมผ่านความชื้น แต่มีคุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของแก๊สได้ดี ส่วนไขมันมีสมบัติที่ไม่ชอบน้ำจึงทำหน้าที่ช่วยกันการซึมผ่านของไอน้ำแทน (Janjarasskul และ Krochta, 2010)

Gounga และคณะ (2007) ศึกษาลักษณะทางกลและทางกายภาพของฟิล์มที่เตรียมจากเวย์โปรตีน และกลีเซอรอล โดยความเข้มข้นของเวย์โปรตีนที่ใช้ในการทดสอบคือ 5 7 และ 9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และอัตราส่วนของเวย์โปรตีนและกลีเซอรอล คือ 3.6:1 3:1 และ 2:1 พบว่าเวย์โปรตีนที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อัตราส่วนของเวย์โปรตีนและกลีเซอรอลที่ 3.6:1 ให้ความหนาของฟิล์มและการซึมผ่านของไอน้ำได้ดีที่สุด ส่วนที่ความเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่ามีการซึมผ่านของออกซิเจนดี ต่อมามีการปรับปรุงคุณภาพของฟิล์มโดยการผสมของเวย์โปรตีนและพูลลูแลนที่อัตราส่วนต่างๆ โดยใช้ความเข้มข้นของเวย์โปรตีน 7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อัตราส่วนของเวย์โปรตีนและกลีเซอรอลที่ 3.6:1 พบว่าอัตราส่วนของเวย์โปรตีนและพูลลูแลนที่ 1:1 ให้ค่าการซึมผ่านของไอน้ำและการซึมผ่านของออกซิเจนได้ดีที่สุด

Rojas-Grau และคณะ (2007) ศึกษาการนำชิ้นแอปเปิ้ลฟูจิมาเคลือบด้วยฟิล์มที่เตรียมจากแอลจิเนต และเจลแลน ที่มีการเติมไขมันลงไป คือ น้ำมันทานตะวัน พบว่า น้ำมันทานตะวันช่วยเพิ่มคุณสมบัติการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำได้ดีเมื่อเทียบกับฟิล์มที่ไม่มีการเติมน้ำมันทานตะวัน โดยฟิล์มที่ผสมเจลแลนกับน้ำมันทานตะวันให้ค่าป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำดีกว่าฟิล์มที่ผสมแอลจิเนตกับน้ำมันทานตะวัน

Trinetta และคณะ (2011) ศึกษาสมบัติของฟิล์มที่เตรียมจากพูลลูแลน กลีเซอรีน แซนแทนกัม และ โลคัสบีนกัม (locust bean gum) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการขึ้นรูปฟิล์ม คือ พูลลูแลน 100 กรัมต่อลิตร กลีเซอรีน 10 กรัมต่อลิตร แซนแทนกัม 1 กรัมต่อลิตร และโลคัสบีนกัม 1 กรัมต่อลิตร โดยกลีเซอรีนที่เติมลงไปส่งผลต่อสมบัติของฟิล์มพูลลูแลน เนื่องจากทำให้เกิดการสร้างพันธะที่แข็งแรงระหว่าง พูลลูแลนกับกลีเซอรีน และแซนแทนกัมกับกลีเซอรีน ดังนั้นฟิล์มพูลลูแลนนี้จึงสามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ในอาหารได้

นอกจากนี้ฟิล์มอาจจะใช้ร่วมกับสารเติมแต่งอื่นๆ เช่น สารต้านการออกซิเดชัน (antioxidant agent) หรือ สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) เช่น แบคเทอริโอซิน เอนไซม์ น้ำมันหอมระเหย และกรดไขมัน เป็นต้น (Seydim และ Sarikus, 2006) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของฟิล์มให้ดี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ขึ้น การใช้ฟิล์มทำหน้าที่เป็นตัวนำสารต้านจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าการเติมลงไปในอาหารโดยตรง คือ ฟิล์มที่ผสมสารต้านจุลินทรีย์จะค่อยๆปล่อยสารออกมาสู่พื้นผิวของผลิตภัณฑ์ทำให้สารมีความเข้มข้นคงที่ในระหว่างการขนส่งและการเก็บรักษา แต่ถ้าเติมสารต้านจุลินทรีย์ลงไปโดยตรงที่ผิวหน้าอาหาร สารจะแพร่ลงในผลิตภัณฑ์อย่างรวดเร็วทำให้ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ไม่นาน หมดฤทธิ์ไว (Hanusova และคณะ, 2009; Nonsee และคณะ, 2011) เมื่อเคลือบชิ้นอกไก่งวงด้วยฟิล์มที่ประกอบด้วยพูลลูแลน 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) กลีเซอรอล 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) แซนแทนกัม 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ โลคัสบีนกัม 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมกับ sakacin A ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ผลิตจาก *Lactobacillus sakei* DSMZ 6333 เพื่อยับยั้ง *Listeria monocytogenes* พบว่าฟิล์มพูลลูแลนที่ผสม sakacin A สามารถทำให้ *L. monocytogenes* ลดลง 3 log หลังจากเก็บเป็นเวลา 3 อาทิตย์ ที่อุณหภูมิตู้เย็น ดังนั้นการผสม sakacin A ลงไปในฟิล์มช่วยเพิ่มคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งเป็นการช่วยยืดอายุการเก็บรักษาชิ้นอกไก่งวงได้ (Trinetta และคณะ, 2010)

Gniewosz และคณะ (2014) ศึกษาการเตรียมฟิล์มจากพูลลูแลน ผสมสารสกัดจากดอก meadowsweet (*Filipendulae ulmariae* flos) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่าราที่ใช้ทดสอบ จากนั้นนำฟิล์มพูลลูแลนที่ผสมกับสารสกัดจากดอก meadowsweet ที่ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มาเคลือบแอปเปิ้ล พบว่าสามารถยับยั้ง แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) ลดลงไป 2 log นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้ง *Rhizopus arrhizus* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้แอปเปิ้ลเน่า โดยแอปเปิ้ลที่มีการเคลือบด้วยฟิล์มพูลลูแลนและสารสกัดจากดอก meadowsweet นอกจากจะช่วยทำให้ฟิล์มมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์แล้ว ยังช่วยลดการสูญเสียน้ำหนัก และสารสกัดที่เติมลงไปไม่ส่งผลกระทบต่อสีของผลไม้ระหว่างการเก็บรักษาอีกด้วย

Maqbool และคณะ (2010) ศึกษาการเตรียมฟิล์มจากอะราบิกกัม (arabic gum) และไคโตซานที่ความเข้นข้นต่างๆ เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Colletotrichum musae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส (anthracnose) ในกล้วยที่เกิดขึ้นระหว่างการขนส่งหรือการเก็บรักษา พบว่าไคโตซานที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *C. musae* และเมื่อนำกล้วยมาเคลือบด้วยฟิล์มอะราบิกกัมความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และไคโตซานความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. musae* และยังช่วยชะลอการสุกของผลไม้ โดยดูจากความแน่นเนื้อ (firmness) ของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (total soluble solid) ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (titratable acidity) และร้อยละของน้ำหนักที่สูญเสีย (percentage weight loss)

คุณสมบัติที่สำคัญของฟิล์ม (Janjarasskul และ Krochta, 2010; Valencia-Chamorro และคณะ, 2011) ดังนี้

1. คุณสมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์

1.1 ความหนา (thickness)

ระยะตั้งฉากระหว่างผิวหน้าทั้งสองของฟิล์ม มีหน่วยเป็นไมโครเมตร (ไมครอน) หรือมิลลิเมตร ความหนาของฟิล์มจะมีส่วนสัมพันธ์กับคุณสมบัติอื่นๆของฟิล์ม เช่น การต้านทานแรงดึงขาด การต้านทานการซึมผ่านของไอน้ำ และการต้านทานการซึมผ่านของแก๊สออกซิเจน เป็นต้น

1.2 การซึมผ่านไอน้ำ (water vapor transmission)

ปริมาณไอน้ำที่ซึมผ่านจากผิวหน้าหนึ่งไปยังอีกผิวหน้าหนึ่งต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวต่อหนึ่งหน่วยความหนาของฟิล์มในระยะเวลาที่กำหนดและภายใต้ภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในการวิเคราะห์ มีหน่วยเป็นกรัมน้ำต่อเมตรต่อวินาทีต่อหน่วยความดัน (ปาสคาล) (g.m/m2.s.Pa)

1.3 การซึมผ่านแก๊ส (gas transmission)

ปริมาณของแก๊สที่ซึมผ่านจากผิวหน้าหนึ่งไปยังอีกผิวหน้าหนึ่งต่อหนึ่งหน่วยความหนาของฟิล์มในระยะเวลาที่กำหนด และภายใต้ผลต่างของความดันหนึ่งหน่วยในภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ มีหน่วยเป็นโมลต่อเมตรต่อวินาทีต่อหน่วยความดัน (ปาสคาล) (mol.m/m^2.s.Pa)

2. สมบัติทางกล

2.1 ความต้านทานแรงดึงขาด (tensile strength)

ค่าความเครียดที่ใช้ในการดึงฟิล์มที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของแผ่นทดสอบที่มีความกว้างคงที่จนแผ่นฟิล์มนั้นขาดภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด มีหน่วยเป็นนิวตันต่อตารางเมตร (N/m^2) โดยการเติมพลาสติไซเซอร์ลงไปในฟิล์มจะทำให้ความต้านทานแรงดึงขาดลดลงเมื่อเทียบกับที่ไม่ได้เติม เพราะจะไปลดปฏิกิริยาระหว่างพอลิเมอร์ด้วยกันเอง ทำให้ความแข็งแรงของสายโซ่โมเลกุลลดลง

2.2 ค่าความยืดตัว (elongation)

ร้อยละของระยะทางที่ฟิล์มถูกยืดออกด้วยแรงดึงจนขาดต่อความยาวเดิม ถ้ามีการเติมพลาสติไซเซอร์ลงไปจะส่งผลให้ความแข็งแรงระหว่างสายโซ่โมเลกุลลดลง ทำให้ฟิล์มที่ได้มีความยืดหยุ่นมากขึ้น ไม่เปราะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.8 เทคนิคการวิเคราะห์สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์

2.7.1 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromato graphy, HPLC)

ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี หรือ HPLC เป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับวิเคราะห์กลุ่มของสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ระเหย (non-volatile organic compound) หรือ กลุ่มสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถระเหยได้ปานกลาง (semi-volatile organic compound) ประกอบด้วย 2 เฟส ได้แก่ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) หรือ คอลัมน์ และ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยสารประกอบจะถูกพาเข้าสู่คอลัมน์ โดยมีเฟสเคลื่อนที่เป็นตัวพาไป เพื่อให้เกิดการแยกสาร โดยอาศัยหลักการความแตกต่างการเคลื่อนที่ของสาร ซึ่งจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน โดยจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดซับของสารกับเฟสอยู่กับที่ ถ้าสารชนิดใดสามารถดูดซับได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ ก็จะเคลื่อนที่ได้ช้า สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง ส่วนสารที่ดูดซับกับเฟสอยู่กับที่ได้ต่ำ ก็จะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้รวดเร็ว จึงถูกแยกออกมาได้เร็ว จากนั้นสารที่แยกออกมาจะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัววัดสัญญาณ (detector) และแปรผลออกมาเป็นพีก เรียกว่าโครมาโทแกรม (Lindsay, 1991)

HPLC สามารถตรวจวัดได้ทั้งเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) โดยเปรียบเทียบ retention time (RT) กับสารมาตรฐาน เพื่อทราบว่าเป็นสารชนิดใด และเชิงปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) โดยวัดความสูงของพีกกับสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว หรือ วัดพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับพื้นที่ของสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณ ลักษณะตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ เช่น สารอินทรีย์ สารประกอบชีวภาพ พอลิเมอร์ และไอออนขนาดเล็ก เป็นต้น เทคนิค HPLC ถูกนำไปใช้วิเคราะห์ตัวอย่างในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยา อาหาร ปิโตรเคมี และสิ่งแวดล้อม (Skoog และคณะ, 2007)

2.7.2 เทอร์โมกราวิเมทริกแอนาไลซิส (Thermogravimetric analysis: TGA)

เทอร์โมกราวิเมทริกแอนาไลซิส เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ความเสถียรของวัตถุเมื่อได้รับความร้อน โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของวัตถุ เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้นเรื่อยๆ ภายใต้บรรยากาศที่กำหนด โดยน้ำหนักของตัวอย่างที่เปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิเฉพาะของสารแต่ละชนิด เครื่องมือนี้สามารถใช้วิเคราะห์ตัวอย่างได้หลากหลายชนิด เช่น พอลิเมอร์ สารอินทรีย์ ยา เครื่องสำอาง สี และสารประกอบในอาหาร เป็นต้น ผลการวิเคราะห์ทดสอบสามารถทำให้ทราบความเสถียรทางความร้อนของสาร ความร้อนที่วัตถุดูดหรือคาย น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลง

และน้ำหนักที่หายไปของสารเมื่อได้รับความร้อน และปริมาณความชื้นหรือสารระเหยของวัตถุ เป็นต้น (Craig และ Reading, 2006)

TGA ประกอบด้วย สองส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ ตัววัดสัญญาณน้ำหนัก (mass detector) และ ตัววัดสัญญาณความร้อน (temperature detector) ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักจะขึ้นกับอุณหภูมิ เวลา และบรรยากาศ โดยการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักวัดด้วยเครื่องชั่งที่มีความละเอียดและความไวสูง (thermobalance) ข้อมูลการวิเคราะห์จะถูกบันทึกออกมาเป็น โครมาโทแกรม ที่แสดงการเปลี่ยนแปลงระหว่างน้ำหนักกับเวลา หรือ น้ำหนักที่หายไปกับเวลา (Tracton, 2005)

2.9 สมบัติการไหล (rheological properties)

ความหนืด (viscosity) คือ ความสามารถในการต้านการไหลของของไหล เมื่อมีแรงมากระทำ ส่วนของไหล หมายถึง สสารที่สามารถไหลได้ เช่น ของเหลว และแก๊ส ของไหลที่มีความหนืดสูง จะมีการต้านทานต่อการไหลสูง ขณะที่ของไหลที่มีความหนืดต่ำ ก็จะมีการต้านทานต่อการไหลต่ำ การวัดความหนืด จะเป็นการวัดแรงต้านทานการไหลภายในของของไหล เมื่อมีแรงมากระทำ ในแนวขนานกับพื้นผิว เรียกว่า แรงเฉือน (shear force) เมื่อพิจารณาก้อนของไหลสี่เหลี่ยมที่ประกอบด้วยแผ่นโมเลกุลหลายแผ่นขนานกันอยู่ โดยแผ่นล่างสุดถูกยึดไว้อยู่ เมื่อแผ่นบนได้รับแรงกระทำคงที่ แผ่นด้านล่างถัดไปจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระยะทางจากแผ่นล่างสุดที่ไม่เคลื่อนที่ ความแตกต่างของความเร็ว (dv) ระหว่างของไหลสองแผ่นกับระยะทางที่เปลี่ยนไป (dx) คืออัตราเฉือน (shear rate) ส่วนค่าแรงต่อหน่วยพื้นที่ที่ทำให้เกิดการไหล เรียกว่า แรงเค้นเฉือน (shear stress) (Grassi และคณะ, 2006)

ลักษณะการไหลของของเหลวสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่

1. ของไหลแบบนิวโตเนียน (newtonian fluid) คือของเหลวที่มีความหนืดไม่ขึ้นกับอัตราเฉือนหรือความเร็วในการกวน จะขึ้นกับอุณหภูมิและองค์ประกอบของของเหลว ตัวอย่างเช่น น้ำ น้ำเชื่อม น้ำมัน น้ำผลไม้ นม กาแฟ แอลกอฮอล์ เป็นต้น (Tracton, 2005)

2. ของไหลแบบนอนนิวโตเนียน (non newtonian fluid) คือของเหลวที่มีความหนืดขึ้นอยู่กับอัตราเฉือนหรือ ความเร็วในการกวน ณ อุณหภูมิหนึ่งๆค่าความหนืดไม่คงที่ ของไหลนอนนิวโตเนียนที่มีความหนืดไม่แปรตามเวลาในการให้แรงเฉือน (Farid, 2010) แบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด (รูปที่ 2.17) ได้แก่

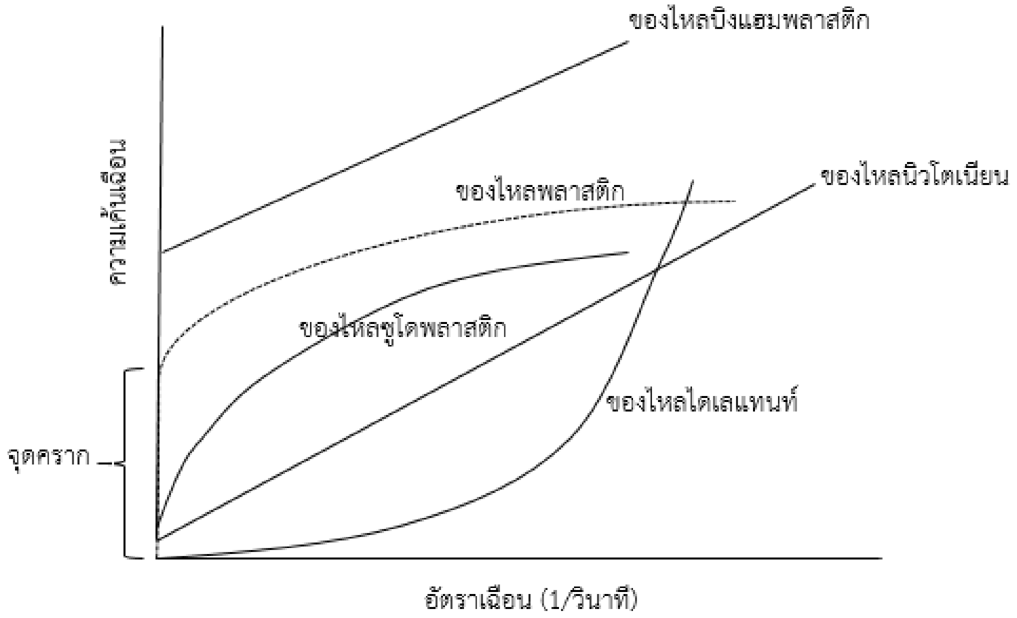
2.1 ของไหลแบบซูโดพลาสติก (pseudoplastic fluid) ของไหลที่มีความหนืดลดลง เมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น หรือความเร็วการกวนมาก ยิ่งกวน ยิ่งไหลง่ายขึ้น พฤติกรรมนี้แสดงสมบัติที่เรียกว่า

“shear thinning” เช่น สารละลายพอลิเมอร์ที่ได้จากธรรมชาติ สารละลายพอลิเมอร์สังเคราะห์ น้ำผลไม้เข้มข้น น้ำผึ้ง และเนย เป็นต้น

2.2 ของไหลแบบไดเลแทนท์ (dilatant fluid) ของไหลที่มีความหนืดเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้นในระหว่างการให้แรงเฉือน หรือ ความเร็วในการกวนมาก ยิ่งกวน ยิ่งมีความหนืดมากขึ้น พฤติกรรมนี้แสดงสมบัติที่เรียกว่า “shear thickening” เช่น น้ำแป้ง และ น้ำดินข้น เป็นต้น

2.3 ของไหลแบบบิงแฮมพลาสติก (bingham plastic) ของไหลที่เมื่อมีแรงมากระทำสูงพอ จะทำให้เกิดลักษณะการไหลแบบนิวโตเนียน เช่น นมช็อกโกแลต ยาสีฟัน และน้ำสลิปของเซรามิก เป็นต้น

2.4 ของไหลแบบพลาสติก (plastic) ของไหลที่เมื่อมีแรงกระทำสูงพอเพื่อเอาชนะค่าความเค้น ณ จุดคราก (yield stress) ถึงจะเริ่มไหลได้ และจะไหลแบบซูโดพลาติก หรือ ตามโมเดลของ Herschel-Buckley ตัวอย่างเช่น ซอสมะเขือเทศ สี ดินเหนียว มายองเนส เป็นต้น (Farid, 2010)



รูปที่ 2.17 ลักษณะการไหลของของเหลว
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Tracton (2005)

ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาปัจจัยการผลิตและลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 และการขึ้นรูปฟิล์ม

บทที่ 3
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan

2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R บริษัท Amerex Instruments, Inc., USA

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง รุ่น Spectronic 20 Genesys บริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 บริษัท Thermo Spectronic, USA

4. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมความเย็น รุ่น 6500 บริษัท Kubota, Japan

5. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland

6. เครื่องระเหิดแห้งแบบสุญญากาศ รุ่น N-100 บริษัท Eyela, Japan

7. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -80 องศาเซลเซียส บริษัท Forma Scientific, USA

8. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Forma Scientific, USA

9. ตู้แช่เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของบริษัท Sanyo, Japan

10. ตู้อบความร้อนแห้ง รุ่น UE 600 บริษัท Memmert, Germany

11. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Memmert, Germany

12. ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, บริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 บริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S บริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand

13. โถดูดความชื้น

14. เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland

15. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 บริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland

16. เครื่องผสมสาร (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., USA

17. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก รุ่น Spectrafuge บริษัท National Labnet, Co., Edison, USA

18. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ รุ่น Mikro20 บริษัท Hettich zentrifugen, Germany

19. ไมโครปิเปต รุ่น P20, P100, P200, P1000 และ P5000 บริษัท Gilson, France

20. ปิเปตทิป ขนาด 1-200 ไมโครลิตร, 1 ml, 5 ml และ 10 ml บริษัท Axygen Scientific, USA

21. กระบอกปั่นเหวี่ยง บริษัท NALGENE, USA

22. หัวกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างของรูกรอง 0.20 ไมครอน รุ่น SF-W13 บริษัท Gat Asia, Ltd., Hongkong

23. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท นิโปร (ประเทศไทย) จำกัด

24. กระดาษกรอง Whatman บริษัท General Electric (GE), China

25. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus, Japan

26. ปิเปตต์แก้วขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร บริษัท HBG, Germany

27. ฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร บริษัทเทสโก้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Biospringer, France

2. สารสกัดจากข้าวมอลต์ (malt extract) บริษัท Difco Laboratories, USA

3. แบคโตเพปโตน (bactopeptone) บริษัท Difco Laboratories, USA

4. แอมโมเนียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany

5. ซูโครส (น้ำตาลทรายขาว) บริษัท น้ำตาลมิตรผล ประเทศไทย

6. กลูโคส บริษัท Merck, Germany

7. แลกโทส บริษัท Difco Laboratories, USA

8. มอลโทส บริษัท Difco Laboratories, USA

9. แมกนีเซียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany

10. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany

11. กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck, Germany

12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck, Germany

13. กรดไตรคลอโรอะซิติก บริษัท Merck, Germany

14. เอทานอล บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Thailand

15. กรดซัลฟูริก บริษัท Merck, Germany

16. กรดฟอสฟอริก บริษัท Mallinckrodt chemicals, USA

17. ฟีนอล บริษัท Merck, Germany

18 คูแมสซีบลู บริษัท Fluka, Switzerland

19. โบวีนซีรัมอัลบูมิน บริษัท Sigma Chemical Co., USA

20. เมทานอล บริษัท Merck, Germany

21. อะซีโตน บริษัท Merck, Germany

22. ไอโซโพรพานอล บริษัท Merck, Germany

23. n-บิวทานอล บริษัท Merck, Germany

24. แซนแทนกัม บริษัท Sigma Chemical Co., USA

25. กัวกัม บริษัท Success chemical, Thailand

26. น้ำมันถั่วเหลือง ตรากุ๊ก บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช ประเทศไทย

27. น้ำมันมะกอก บริษัท Sabroso, Spain

28. น้ำมันทานตะวัน บริษัท ธนากรณ์ผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช กำจัด

29. โซเดียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany

30. โพแทสเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany

31. แคลเซียมคลอไรด์ บริษัท Merck, Germany

32. คอปเปอร์ซัลเฟต บริษัท Carlo Erba, Italy

33. พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ บริษัท Fluka, Switzerland

34. ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd, Australia

35. น้ำส้มสายชูกลั่น 5% ตราภูเขาทอง บริษัท ไทยเทพรส ประเทศไทย

36. โซเดียมเบนโซเอต บริษัท Merck, Germany

37. เกลือ ตราปรุงทิพย์ บริษัท อุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์ จำกัด ประเทศไทย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1.1 การเก็บรักษาเชื้อในระยะสั้น

ขีดเชื้อ *A. pullulans* YTP6-14 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งแบบเอียง YM (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 4 วัน นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และถ่ายเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแบบเอียงใหม่ทุก 1 สัปดาห์

3.3.1.2 การเก็บรักษาเชื้อในระยะยาว

เขี่ยเชื้อ *A. pullulans* YTP6-14 ลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Yeast Malt (YM) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 0.8 – 1.0 นำสารละลายเซลล์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว YM ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 10% และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.2 ผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.2.1 เตรียมหัวเชื้อสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 - 4 วัน (Ravella และคณะ, 2010) จากนั้นนำลูปเขี่ยเชื้อข้างต้นใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวชนิดเดียวกัน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 4.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่อวงเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Duan และคณะ, 2008) อยู่ในช่วงระหว่าง 0.8 - 1.0 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ

3.3.2.2 ผลิตและสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (Ravella และคณะ, 2010) หลังจากนั้นสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ ตามวิธีดัดแปลงของ (Gniewosz และ Synowiec, 2011) โดยตกตะกอนโปรตีนและเซลล์ด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกเซลล์

ออกด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอลที่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มาละลายน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ตกตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์อีกครั้งด้วย 95% เอทานอลที่เย็น ปริมาตร 3 เท่าของส่วนใส ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่เก็บไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้งที่อุณหภูมิต่ำ หลังจากนั้นเก็บในเดซิเคเตอร์เพื่อให้น้ำหนักคงที่ นำพอลิแซ็กคาไรด์ไปชั่งน้ำหนักแห้ง รายงานเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร

3.3.3 ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.3.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวชนิดเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที จนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วงระหว่าง 0.8-1.0 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2 สูตรที่จะใช้เปรียบเทียบ ดังนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แทนกลูโคสความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่มีอยู่ในสูตรเดิมของ YM และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากสูตรอาหารของ (Youssef และคณะ, 1999) (ภาคผนวก ก) ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง รายงานหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร และ วิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้เปรียบเทียบกันระหว่างอาหาร 2 สูตร รายงานเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร

3.3.3.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากข้อ 3.3.3.1 ที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยจะแปรผันชนิดของคาร์บอน ดังนี้ กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแลกโทส ที่ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Duan และคณะ, 2008) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์

แห้ง รายงานหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร และวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยการตกตะกอนด้วย เอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ รายงานหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.3.3.3 ปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว จากข้อ 3.3.3.2 ที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ โดยจะแปรผันปริมาณของคาร์บอน ดังนี้ 3, 6, 9 ,12 และ 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Cheng และคณะ, 2011) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง รายงานหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร และวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยการตกตะกอนด้วย เอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ รายงานหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.3.3.4 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่คัดเลือกสูตรอาหาร ชนิด และปริมาณของคาร์บอนที่เหมาะสม จากข้อ 3.3.3.1 3.3.3.2 และ 3.3.3.3 โดยจะแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น ดังนี้ 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 (Youssef และคณะ, 1999) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง รายงานหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร และ วิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ รายงานเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร

Chulalongkorn University

3.3.3.5 ปริมาณไนโตรเจน (เปปโทน) ที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่คัดเลือกสูตรอาหาร ชนิด ปริมาณของคาร์บอน และค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสม จากข้อ 3.3.3.1, 3.3.3.2, 3.3.3.3 และ 3.3.3.4 โดยจะแปรผันปริมาณของไนโตรเจน ดังนี้ 0.1 0.3 0.5 0.7 และ 0.9 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Lin และ Chen, 2007) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง รายงานหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร และ วิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ รายงานหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.3.3.6 เวลาผลิตที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่คัดเลือกสูตรอาหาร ชนิด ปริมาณของแหล่งคาร์บอน ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น และปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม จากข้อ 3.3.3.1, 3.3.3.2, 3.3.3.3, 3.3.3.4 และ 3.3.3.5 โดยจะแปรผันช่วงเวลาที่ใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนี้ 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ168 ชั่วโมง (Singh และคณะ, 2012) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง รายงานหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร และ วิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์โดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำ ชั่งน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ รายงานหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.3.4 ลักษณะสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.4.1.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี phenol-sulfuric acid ตามวิธีของ (Dubois และคณะ, 1956)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง โดยใช้น้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเป็น blank จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 % (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.4.1.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี protein dye binding ตามวิธีของ (Bradford, 1976)

นำสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank จากนั้นเติมสารละลายคูแมสซีบลู (Coomassie blue) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

โดยเปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

3.3.4.2 ความสามารถในการละลาย (solubility test)

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล n-บิวทานอล ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (vortex) ที่อุณหภูมิห้อง โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สังเกตการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์ (Collins และคณะ, 1973)

3.3.4.4 ความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นใช้กระดาษกรอง (filter paper) จุ่มลงในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนอีกชุดทำเหมือนข้างต้นแต่ใช้น้ำกลั่นแทน วัดระยะทางของเหลวที่เคลื่อนที่ได้ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) คือ ระยะทางของเหลวในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ที่เคลื่อนที่ได้ ต่อระยะทางของน้ำกลั่นที่เคลื่อนที่ได้ ถ้ามีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง เปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์จะต่ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม คาราจีแนน และกัวกัม (Tako และคณะ, 1982)

3.3.5 ลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์

3.3.5.1 ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์ปริมาณ 10 มิลลิกรัม มาย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดฝาเกลียว จากนั้นนำไปผ่านความร้อนในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Kambourova และคณะ, 2009) เพื่อสลายพอลิแซ็กคาไรด์เป็นมอโนแซ็กคาไรด์ รอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับค่าความเป็นกรดเบสให้มีค่าเท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ 1 โมลาร์ และ 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ตามลำดับ จากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองส่วนน้ำใสที่ได้ผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน เก็บสารละลายใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายใสที่เก็บไว้ไปส่งวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ Sugar SZ5532 ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ (acetonitrile) 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา (mobile phase) และใช้อัตราการไหล 1.0

มิลลิลิตรต่อนาที ประมวลผลโดย evaporative light scattering detectors โดยฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐาน จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ (retention time)

3.3.5.2 ความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาผสมกับน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ในอัตราส่วน 1:1 ดังนี้ น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว และน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsion index) หลังจาก 24 ชั่วโมง (E24) โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของอิมัลชันต่อระดับความสูงทั้งหมด (% emulsifying activity) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับแซนแทนกัม สำหรับชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ (Yadav และคณะ, 2014)

3.3.5.3 ความสามารถการเกิดเจล (gelation)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2 M NaOH ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ เกลือของโลหะ (metal salts) ได้แก่ NaCl, KCl, $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ และ $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ ตามลำดับ ปริมาณ 2 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นตรวจสอบการเกิดเจล ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม (Prasertsan และคณะ, 2006)

3.3.5.4 ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 N (ภาคผนวก ข) จากนั้นเติมสารละลายเซทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ (CPC) (ภาคผนวก ข) ที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) จะพบตะกอนในสารละลาย แต่ถ้าไม่พบตะกอนให้นำมาทดสอบว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ประเภทที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) โดยตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์อีกครั้ง (Ueda และคณะ, 1981)

3.3.5.5 วิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ ปริมาณ 10–20 มิลลิกรัม ส่งวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer TGA 7 thermogravimetric analyzer ที่วิทยาลัย

ปิโตรเลียมและปิโตรเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาวะที่ใช้ในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที โดยทำการทดสอบภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน (Zhu และคณะ, 2014)

3.3.5.6 การวัดความหนืด

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 0.5 2 3 4 และ 5% โดยมวลต่อปริมาตร วัดสมบัติการไหลและความหนืดด้วยเครื่อง Rheometer Bohlin รุ่น C-VOR ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยประมวลผลด้วยโปรแกรม Bohlin software CVOR15 ที่อัตราเฉือนระหว่าง 0.04 - 400 วินาที$^{-1}$ เปรียบเทียบกับแซนแทนกัม (Wu และคณะ, 2013)

3.3.6 ขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 และทดสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีของฟิล์มที่ได้

3.3.6.1 นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Zhu และคณะ, 2014) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (magnetic stirrer) จากนั้นเทสารละลายที่ได้ลงในเพลทแก้ว (เส้นผ่านศูนย์กลาง 9.5 เซนติเมตร) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร รอให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นำแผ่นฟิล์มที่แห้งแล้วเก็บใส่เดซิเคเตอร์ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 53% ด้วยสารละลายอิ่มตัวแมกนีเซียมไนเตรทเฮกซะไฮเดรต ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Xu และคณะ, 2001) นำฟิล์มที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆเทียบกับฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหารยี่ห้อเทสโก้ซึ่งเป็นฟิล์มทางการค้า

3.3.6.2 ทดสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีของฟิล์มที่ได้

3.3.6.2.1 วัดความหนา โดยใช้เครื่องดิจิตอลไมโครมิเตอร์ (Wu และคณะ, 2013) ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.6.2.2 วัดสี โดยใช้เครื่องโครมามิเตอร์วัดสีของฟิล์ม ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในระบบ CIE ที่จะแสดงค่าของสีเป็น L* a* และ b* โดยที่ค่าสี L* จะบ่งบอกถึงความสว่าง (Lightness) โดยมีค่าตั้งแต่ 0 (สีดำ) ถึง 100 (สีขาว) ส่วนค่าสี a* (redness/greenness) จะแสดงความเป็นสีแดงและสีเขียว โดยถ้าค่าเป็นบวกก็จะมีความเป็นสีแดงมากขึ้น และถ้าค่าเป็นลบก็จะมีความเป็นสีเขียวมากขึ้น และค่าสี b* จะแสดงถึงสีเหลืองและสีน้ำเงิน (yellowness/blueness) โดยถ้าค่าเป็นบวกก็จะมีความเป็นเหลืองมากขึ้น และ

ถ้าค่าเป็นลบก็จะมีความเป็นสีน้ำเงินมากขึ้น จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหา ΔE (Ahmad และคณะ, 2012)

$$\Delta E* = \sqrt{(\Delta L*)^2 + (\Delta a*)^2 + (\Delta b*)^2}$$

เมื่อ ΔL^* Δa^* และ Δb^* เป็นค่าความแตกต่างของสีของฟิล์มตัวอย่างกับแผ่นมาตรฐานสีขาวที่ใช้เป็นพื้นหลัง (แผ่นมาตรฐานสีขาวมีค่าสี L* เท่ากับ 87.82 a* เท่ากับ -1.28 และ b* เท่ากับ 1.25)

3.3.6.2.3 การละลายของฟิล์ม นำฟิล์มที่ชั่งน้ำหนักเรียบร้อยแล้วแช่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง นำส่วนที่กรองได้ไปอบให้แห้งและคำนวณหาการละลายเป็นเปอร์เซ็นต์ (Wu และคณะ, 2013)

3.3.6.2.4 ความต้านทานแรงดึง (Tensile strength) และความยืดที่จุดขาด (Elongation at break) โดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyzer) ที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ยึดปลายทั้งสองด้านของฟิล์มเข้ากับหัวหนีบ โดยให้ระยะตัวหนีบทั้งสองตัวห่างกัน 20 มิลลิเมตร และใช้ความเร็ว 1 มิลลิเมตรต่อวินาที จากนั้นคำนวณหาความต้านทานแรงดึงและความยืดที่จุดขาด (Tong และคณะ, 2008)

$$Ts\ (MPa) = \frac{Fmax}{A}$$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อ Fmax คือ แรงสูงสุดที่ทำให้ฟิล์มขาด (นิวตัน)
A คือ พื้นที่หน้าตัดของฟิล์ม (ตารางเมตร)

$$E\ (\%) = \frac{\Delta l}{lo} \times 100$$

เมื่อ l_o คือ ความยาวเริ่มต้นของฟิล์ม (เซนติเมตร)
Δl คือ ความยาวที่เปลี่ยนแปลงไปของฟิล์ม (เซนติเมตร)

3.3.6.2.5 การซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor transmission rate) ส่งวิเคราะห์ที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยทำตามมาตรฐาน (ASTM, 1995) นำฟิล์มที่ได้มาขึงด้วยพาราฟินเหลวบนปากภาชนะที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร โดยภายในบรรจุซิลิกาเจลเอาไว้ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ 25 องซาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ ชั่งน้ำหนักจนน้ำหนักคงที่ คำนวณการซึมผ่านของไอน้ำ

$$WVTR = \frac{(G/t)}{A}$$

เมื่อ G/t คือ ความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำที่ถูกดูดซึมกับเวลา (กรัมต่อชั่วโมง)

A คือ พื้นที่ของฟิล์ม (ตารางเมตร)

$$WVP = \frac{WVTR}{S(R1 - R2)} \times d$$

เมื่อ d คือ ความหนาของฟิล์ม (มิลลิเมตร)

S คือ ความดันไออิ่มตัวของน้ำที่อุณหภูมิที่ทดสอบ (ปาสคาล)

R1 คือ ความชื้นสัมพัทธ์ภายในตู้ควบคุมความชื้น

R2 คือ ความชื้นสัมพัทธ์ภายในภาชนะที่มีตัวดูดความชื้น

3.3.7. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* YTP6-14 (morphological characteristics)

นำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเตรียมสไลด์เชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน นำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อสังเกตรูปร่างและลักษณะของเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้ออ้างอิง (Barnett และ Hunter, 1972; De Hoog และ Yurlova, 1994; Zalar และคณะ, 2008)

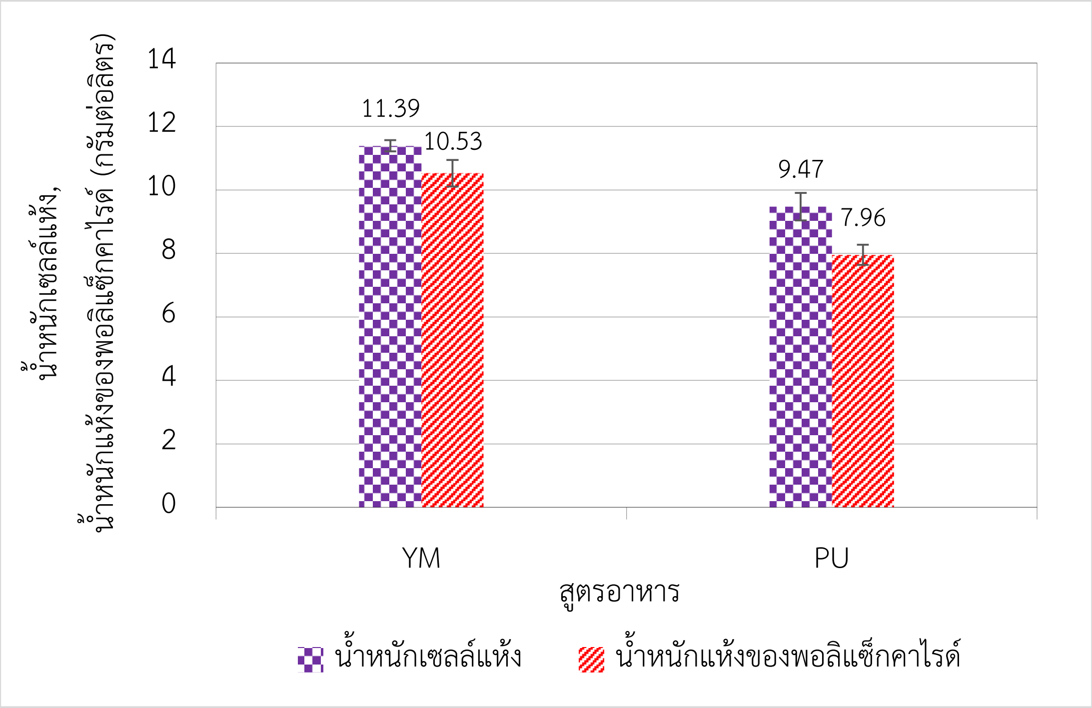
บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

4.1.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 โดยใช้หัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2 สูตรที่ใช้เปรียบเทียบ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากสูตรอาหารของ Youssef และคณะ (1999) ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และนำมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอล ตามวิธีในข้อ 3.3.3.1 จากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ น้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้เปรียบเทียบกันระหว่างอาหาร 2 สูตร รายงานเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากสูตรของของ Youssef และคณะ (1999) คือ เท่ากับ 10.53 ± 0.42 กรัมต่อลิตร ส่วนสูตรของ ของ Youssef และคณะ (1999) ได้เท่ากับ 7.96 ± 0.32 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งก็สูงกว่าเช่นเดียวกัน เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ดังผลในรูปที่ 4.1 ดังนั้นจึงคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ใช้สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการทดลองต่อไป

Chulalongkorn University

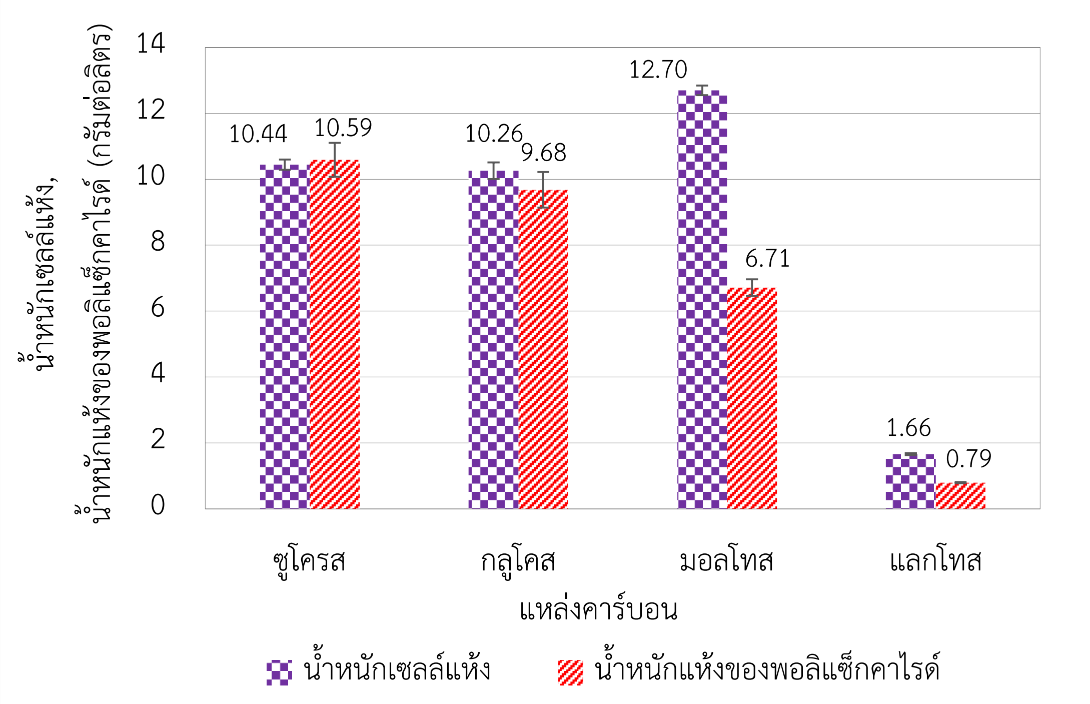


รูปที่ 4.1 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 2 สูตรที่ใช้เปรียบเทียบ ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากสูตรอาหารของ Youssef และคณะ (1999) ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4.1.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 โดยใช้หัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM โดยจะแปรผันชนิดของคาร์บอน ดังนี้ กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแลกโทส ที่ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และนำมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอล ตามวิธีในข้อ 3.3.3.2 จากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ น้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้เปรียบเทียบกันรายงานเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด คือ เท่ากับ 10.59 ± 0.52 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือกลูโคส ได้เท่ากับ 9.68 ± 0.54 กรัมต่อลิตร ส่วนมอลโทสและแลกโทส ได้

เท่ากับ 6.71 ± 0.25 และ 0.79 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า มอลโทส ให้ค่าสูงกว่าซูโครส กลูโคส และแลกโทส ตามลำดับ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ดังผลในรูปที่ 4.2 ดังนั้นจึงคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการทดลองต่อไป



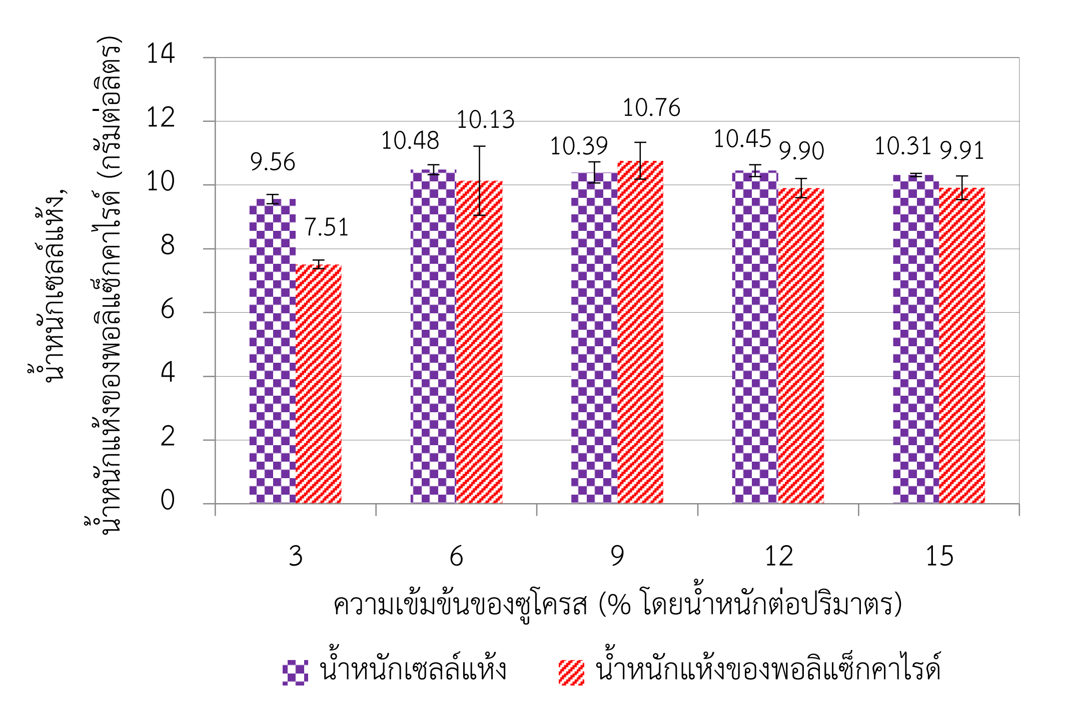
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีการแปรผันชนิดของคาร์บอน ดังนี้ กลูโคส ซูโครส มอลโทส และแลกโทส ที่ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4.1.3 ปริมาณคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 โดยใช้หัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่ใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยจะแปรผันความเข้มข้นของซูโครสดังนี้ 3, 6, 9 ,12 และ 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และนำมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอล ตามวิธีในข้อ 3.3.3.3 จากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ น้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้เปรียบเทียบกัน รายงานเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 9.0 %

โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด คือ เท่ากับ 10.76 ± 0.57 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือที่ความเข้มข้นซูโครส 6.0 % คือ 10.13 ± 1.09 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้นซูโครสที่ความเข้มข้น 3.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ดังผลในรูปที่ 4.3 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้น 6.0 และ 9.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของซูโครสให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกซูโครสที่ความเข้มข้น 6.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อใช้สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการทดลองต่อไป

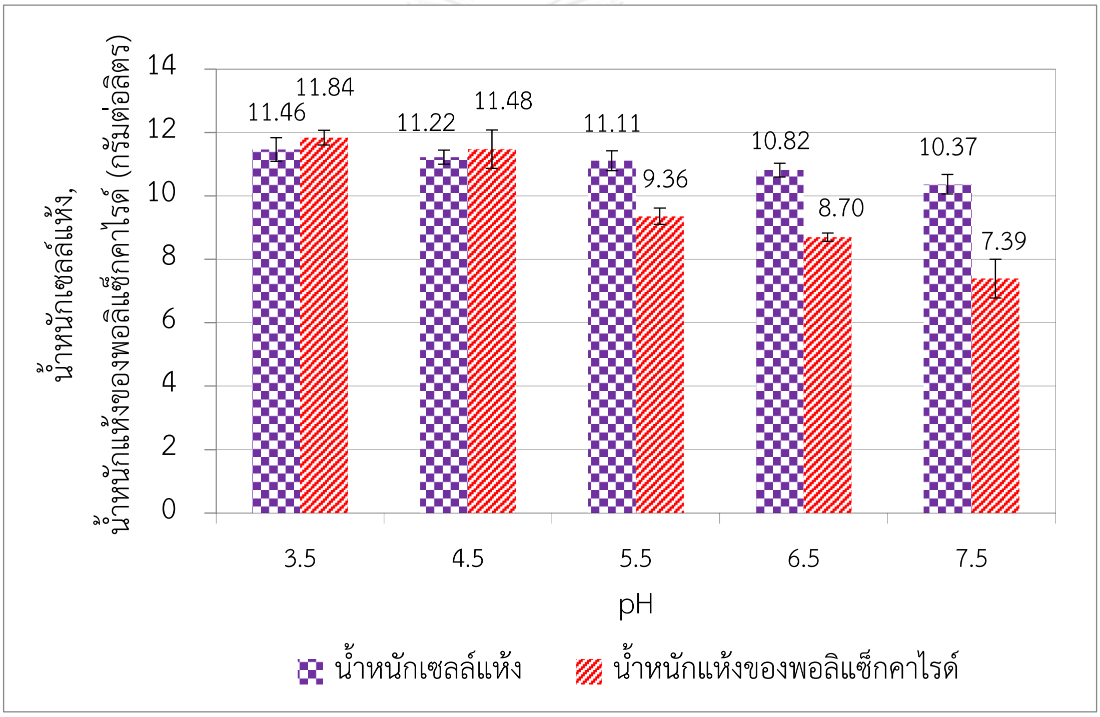


รูปที่ 4.3 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของซูโครส ดังนี้ 3, 6, 9 ,12 และ 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4.1.4 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 โดยใช้หัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยจะแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น ดังนี้ 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200

รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และนำมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอล ตามวิธีในข้อ 3.3.3.4 จากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ น้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้เปรียบเทียบกัน รายงานเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดเบสต่ำจะให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าค่าความเป็นกรดเบสที่สูงกว่า โดยที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3.5 สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด คือ เท่ากับ 11.84 ± 0.24 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.5 ได้เท่ากับ 11.48 ± 0.61 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3.5 มีค่าสูงสุด คือ 11.46 ± 0.37 กรัมต่อลิตร เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ดังผลในรูปที่ 4.4 ดังนั้นจึงคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3.5 ใช้สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการทดลองต่อไป

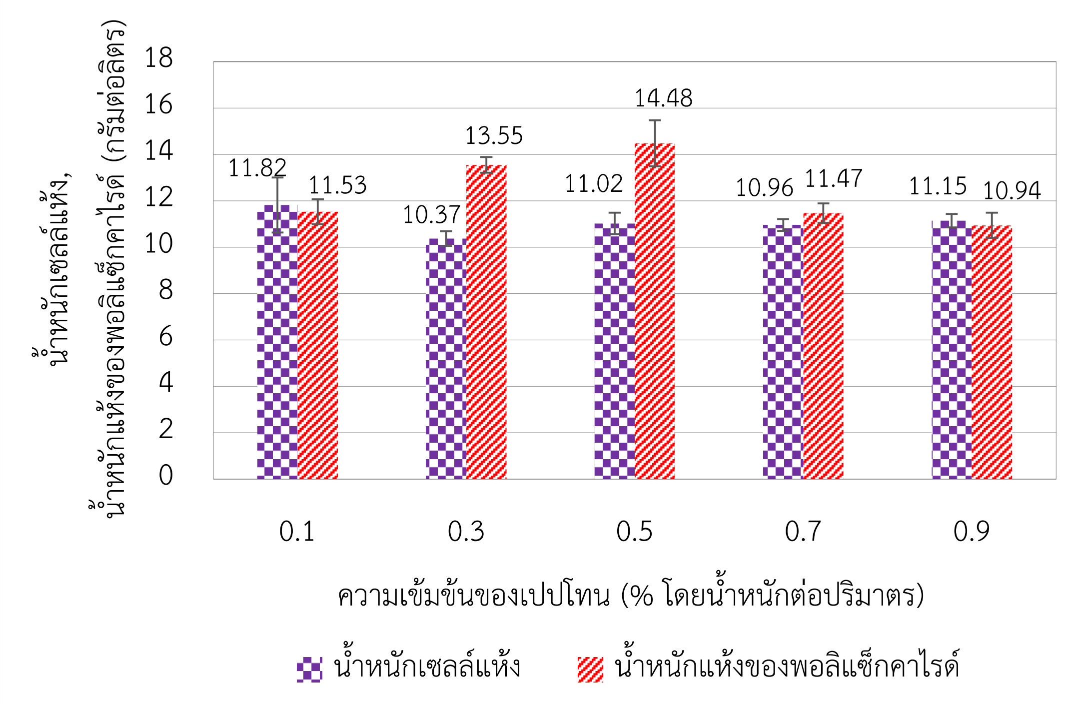


รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีการแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น ดังนี้ 3.5, 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5

4.1.5 ปริมาณไนโตรเจน (เปปโทน) ที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 โดยใช้หัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น 3.5 ที่แปรผันปริมาณของไนโตรเจน (เปปโทน) ดังนี้ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 0.9% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และนำมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอล ตามวิธีในข้อ 3.3.3.5 จากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ น้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้เปรียบเทียบกัน รายงานเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าเปปโทนที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด คือ เท่ากับ 14.48 ± 0.99 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือเปปโทนที่ความเข้มข้น 0.3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้เท่ากับ 13.55 ± 0.34 กรัมต่อลิตร และปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์จะลดลงเมื่อใช้ความเข้นข้นของเปปโทนที่สูงขึ้น ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าเปปโทนที่ความเข้มข้น 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรมีค่าสูงสุดเท่ากับ 11.82 ± 1.19 กรัมต่อลิตร เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ดังผลในรูปที่ 4.5 ดังนั้น จึงคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดเบส 3.5 และเปปโทนที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้สำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ในการทดลองต่อไป

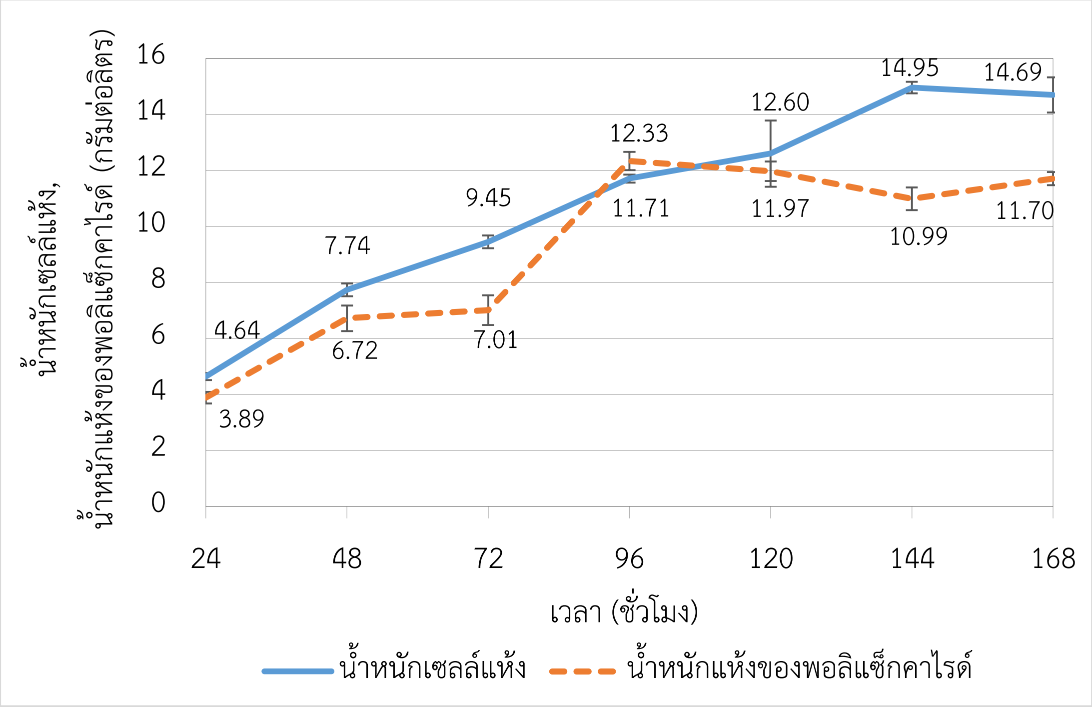
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดเบส 3.5 ที่มีการแปรผันความเข้มข้นของเปปโทน ดังนี้ 0.1 0.3 0.5 0.7 และ 0.9 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4.1.6 เวลาผลิตที่เหมาะสม

จากการเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 โดยใช้หัวเชื้อปริมาณ 10% โดยปริมาตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น 3.5 ความเข้มข้นเปปโทน 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที และแปรผันช่วงเวลาที่ใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนี้ 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ168 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดแยกพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย 95% เอทานอล ตามวิธีในข้อ 3.3.3.6 จากนั้นชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และ น้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้เปรียบเทียบกันรายงานเป็นหน่วยกรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด คือ ที่เวลา 96 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 12.33 ± 0.32 กรัมต่อลิตร และเริ่มลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่ามีปริมาณมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังผลในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 การเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งและน้ำหนักแห้งของพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่มีความเข้มข้นของซูโครส 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่าความเป็นกรดเบส 3.5 ความเข้มข้นเปปโทน 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีการแปรผันช่วงเวลาที่ใช้ในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนี้ 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.2 ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์

4.4.1 วิเคราะห์องค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

4.4.1.1 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี phenol-sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956) โดยเปรียบเทียบค่าปริมาณน้ำตาลกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 78.92 ± 0.15 % (w/w)

4.4.1.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี Protein Dye Binding

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์โดยวิธี protein dye binding ตามวิธีของ Bradford (1976) โดยเปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีนกับกราฟมาตรฐานที่ใช้โบวีนซีรัมแอลบูมิน (BSA) ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.24 ± 0.83 % (w/w)

4.4.2 ความสามารถในการละลาย (solubility test)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มาทดสอบการละลายในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ได้แก่ เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล n-บิวทานอล ที่อุณหภูมิห้อง โดยเปรียบเทียบความสามารถในการละลายกับแซนแทนกัม ผลการทดลองได้แสดงไว้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์จากวันที่ 1-2 ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่นและสารละลายต่างๆ ณ อุณหภูมิห้อง

พอลิแซ็กคาไรด์	ความสามารถในการละลายที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ อุณหภูมิห้อง	
	น้ำกลั่น	เมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล
พอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14	++	-
แซนแทนกัม	+++	-

หมายเหตุ : ความสามารถการละลายของพอลิแซ็กคาไรด์แทนด้วยเครื่องหมาย (+)

- ไม่ละลาย เป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด

\+ ละลายได้ต่ำ (ละลายได้เล็กน้อย ยังมีตะกอนอยู่มาก)

++ ละลายได้ปานกลาง (ละลายได้บางส่วน ยังมีตะกอนอยู่)

+++ ละลายได้ดี (ละลายได้หมด)

จากตารางที่ 4.1 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ในวันที่ 1 และ 2 มีความสามารถในการละลายในน้ำได้ปานกลาง ยังมีตะกอนอยู่เล็กน้อย แต่หลังจากวันที่ 2 มีความสามารถในการละลายลดลง ส่วนในเมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ไม่ละลาย ในขณะที่แซนแทนกัมสามารถละลายในน้ำได้ดี แต่ไม่ละลายในเมทานอล อะซีโตน ไอโซโพรพานอล และ n-บิวทานอล เช่นเดียวกัน

4.4.4 ความสามารถในการอุ้มน้ำโดยวิธี paper chromatography

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทดสอบความสามารถในการอุ้มน้ำ โดยใช้กระดาษกรอง (filter paper) จุ่มลงในสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ส่วนอีกชุดทำเหมือนข้างต้นแต่ใช้น้ำกลั่นแทน จากนั้นคำนวณเปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (% syneresis) ถ้ามีความสามารถในการอุ้มน้ำสูง เปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์จะต่ำ โดยเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม คาราจีแนน และกัวกัม ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า ผลการทดลองแสดงไว้ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์อัตราการสกัดของเหลวออกจากสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์ความเข้มข้น 0.5% ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14

พอลิแซ็กคาไรด์	เปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์ (%)
พอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14	36.97 ± 0.60[c]
แซนแทนกัม	6.96 ± 0.69[a]
คาราจีแนน	36.47 ± 0.62[c]
กัวกัม	10.73 ± 0.60[b]

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

* ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี one-way ANOVA

จากตารางที่ 4.2 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มีเปอร์เซ็นต์การสกัดของเหลวออกจากพอลิแซ็กคาไรด์สูงกว่าแซนแทนกัมและกัวกัม แต่เมื่อเทียบกับคาราจีแนน พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แสดงว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มีความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำกว่าแซนแทนกัม และกัวกัม แต่ใกล้เคียงกับคาราจีแนน

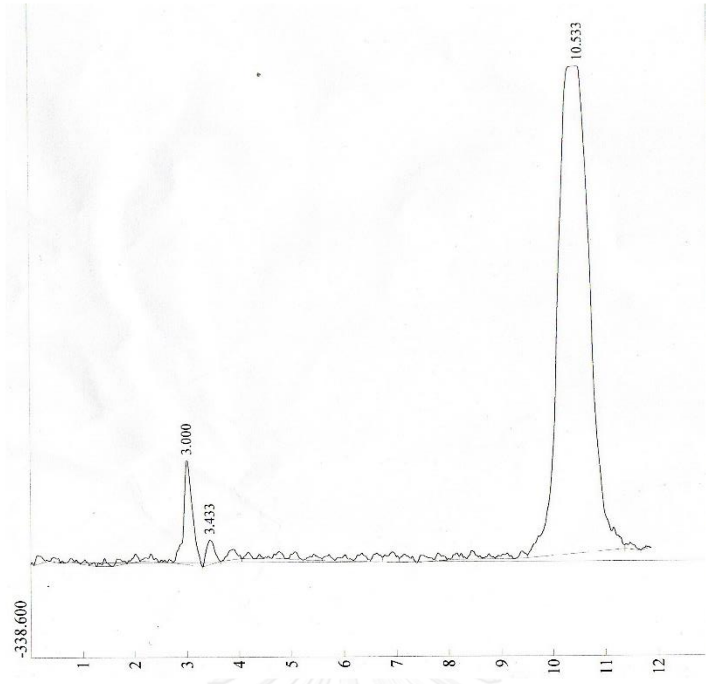
4.3 ลักษณะสมบัติเพิ่มเติมของพอลิแซ็กคาไรด์

4.3.1 ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์

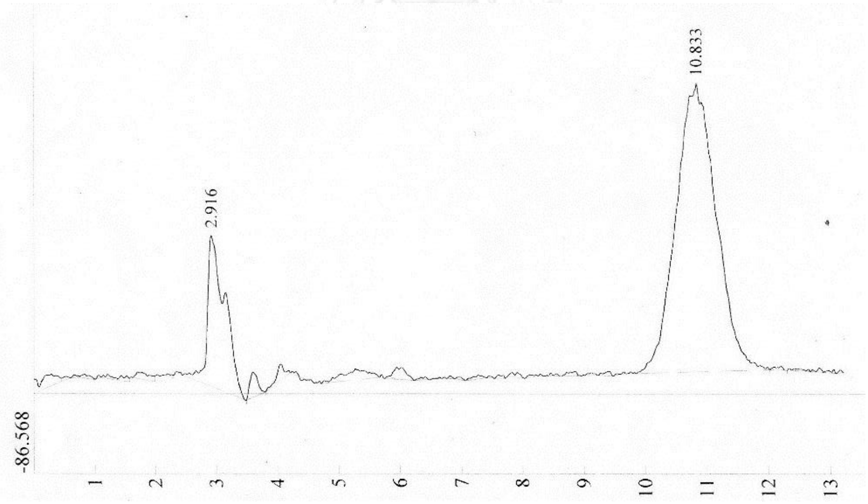
นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มาย่อยด้วยสารละลายกรดซัลฟูริก แล้วปรับค่าความเป็นกรดเบสให้มีค่าเท่ากับ 7 กรองส่วนน้ำใสที่ได้ผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นนำสารละลายใสที่เก็บไว้ไปส่งวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) ภาวะตามข้อ 3.3.4.1 นำโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบชนิดน้ำตาลจากสารละลายมาตรฐาน จากเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์ ดังแสดงในรูปที่ 4.7 ที่เปรียบเทียบโครมาโทแกรมของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน กับ โครมาโทแกรมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14

จากผลการวิเคราะห์ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มีองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว หรือเรียกว่ากลูแคน (Freitas และคณะ, 2011) เป็นชนิดฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.7 โครมาโทแกรมแสดง (ก) สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส และ (ข) ชนิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ภายหลังการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้สารละลายอะซิโตไนไทรล์ 80% โดยปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

4.3.2 ความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับน้ำมันพืช ได้แก่ น้ำมันมะกอก และ น้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 1:1 ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.4.2 แล้ววัดค่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ โดยแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับความสูงของการแยกชั้นต่อระดับความสูงทั้งหมด (% emulsifying activity; E_{24}) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับน้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ชนิดน้ำมัน	emulsifying activity (%) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	
	พอลิแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14	แซนแทนกัม
น้ำมันมะกอก	46.89 ± 0.44 ^{ab}	50.23 ± 0.40 ^{d}
น้ำมันถั่วเหลือง	47.85 ± 0.03 ^{bc}	49.27 ± 0.74 ^{cd}
น้ำมันรำข้าว	45.41 ± 0.42 ^{a}	52.40 ± 0.40 ^{e}
น้ำมันข้าวโพด	46.86 ± 0.42 ^{ab}	49.03 ± 0.84 ^{cd}
น้ำมันทานตะวัน	45.71 ± 0.00 ^{a}	47.09± 0.05 ^{ab}

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

: ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี one-way ANOVA

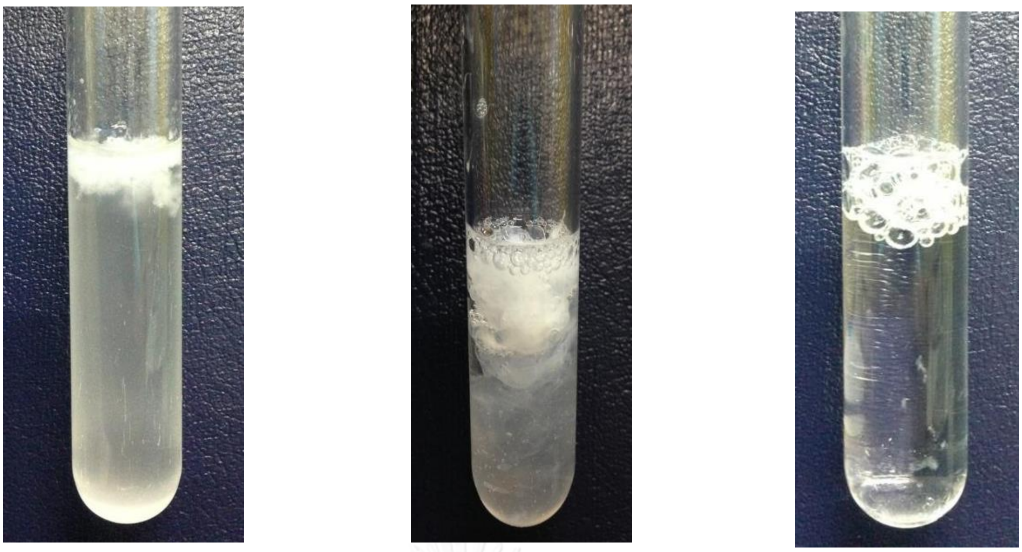
จากตารางที่ 4.3 พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 โดยรวมมีค่า emulsifying activity (E_{24}) ใกล้เคียงกันจากน้ำมันทั้งหมดที่ทำการทดสอบ คือน้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันทานตะวัน เมื่อเปรียบเทียบกับแซนแทนกัม พบว่าค่า emulsifying activity (E_{24}) ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 กับแซนแทนกัม มีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ในน้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันทานตะวัน เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนในน้ำมันมะกอก น้ำมันรำข้าว และน้ำมันข้าวโพด พบว่า ค่า emulsifying activity (E_{24}) ของพอลิแซ็กคาไรด์น้อยกว่าแซนแทนกัมอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq 0.05$) แสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อนี้มีความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้ดีเทียบเท่ากับแซนแทนกัมในน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันทานตะวัน

4.3.3 ความสามารถการเกิดเจล (gelation)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มาละลายให้มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับเกลือของโลหะ ได้แก่ NaCl, KCl, $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ และ $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบการเกิดเจล ตามวิธีข้อ 3.3.4.3 เปรียบเทียบกับแซนแทนกัม พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ไม่มีความสามารถในการเกิดเจลได้ ส่วนแซนแทนกัมมีความสามารถเกิดเจลได้เมื่อผสมกับ $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ และ $CuSO_4{\cdot}5H_2O$

4.3.4 ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์

เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มาวิเคราะห์ชนิดประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อเติมสารละลายซิทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ลงไป พบว่าไม่มีตะกอนของสารละลายพอลิแซ็กคาไรด์เกิดขึ้น ดังนั้นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อนี้ เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral polysaccharide) ส่วนแซนแทนกัมเกิดเป็นตะกอนสีขาวแสดงว่าเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (acidic polysaccharide) แสดงดังในรูปที่ 4.8



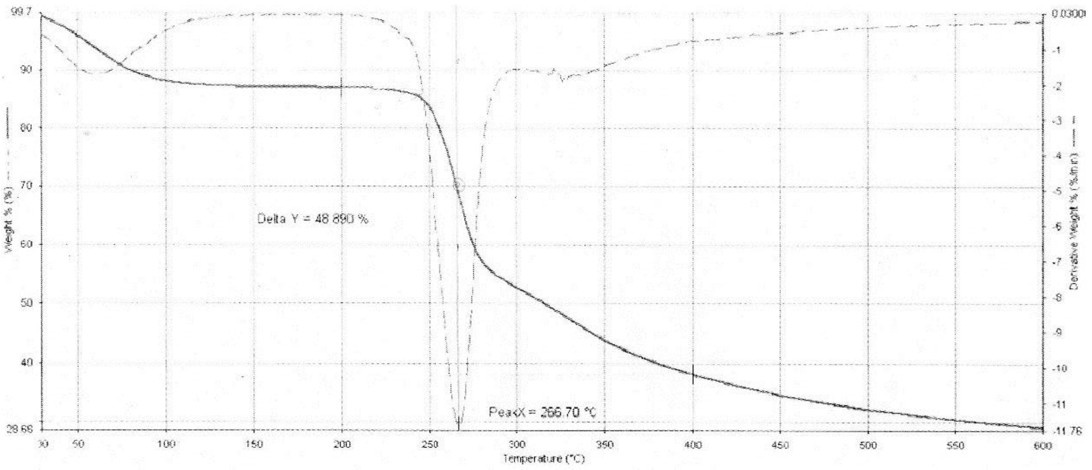
(ก) (ข) (ค)

รูปที่ 4.8 ผลวิเคราะห์ชนิดประจุของ (ก) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 (ข) แซนแทนกัม (ชุดควบคุมที่มีประจุลบ) และ (ค) สารละลาย CPC และโซเดียมคลอไรด์ (ชุดควบคุมที่มีประจุบวก)

4.3.5 วิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมทริกแอนนาไลซิส (TGA)

นำพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ปริมาณ 10 - 20 มิลลิกรัม มาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเทคนิค TGA ด้วยเครื่อง Perkin-Elmer TGA 7 thermogravimetric analyzer ภาวะที่ใช้ในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส อัตราการเพิ่มความร้อน 10 องศาเซลเซียส/นาที โดยทดสอบภายใต้บรรยากาศของแก๊สไนโตรเจน ผลดังแสดงในรูปที่ 4.9

จากรูปที่ 4.9 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มีอุณหภูมิย่อยสลาย (degradation temperature) เท่ากับ 266.70 องศาเซลเซียส โดยน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์ เริ่มลดลงตั้งแต่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเวลาลดลงอย่างรวดเร็วที่ประมาณอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส

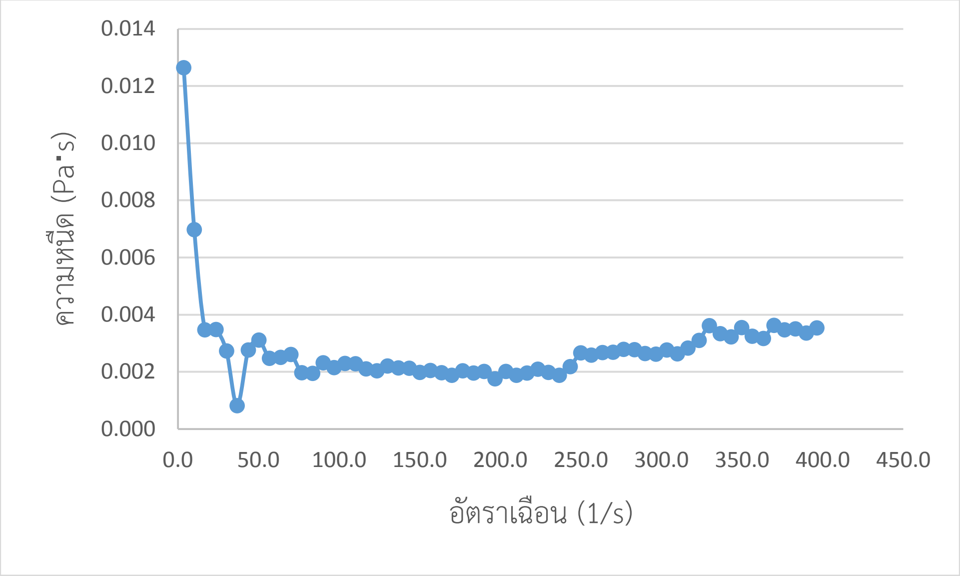


รูปที่ 4.9 โครมาโทแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่สลายตัวและการสูญเสียน้ำหนักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 โดยใช้ภาวะในการทดสอบเริ่มจากอุณหภูมิ 30 ถึง 600 องศาเซลเซียส

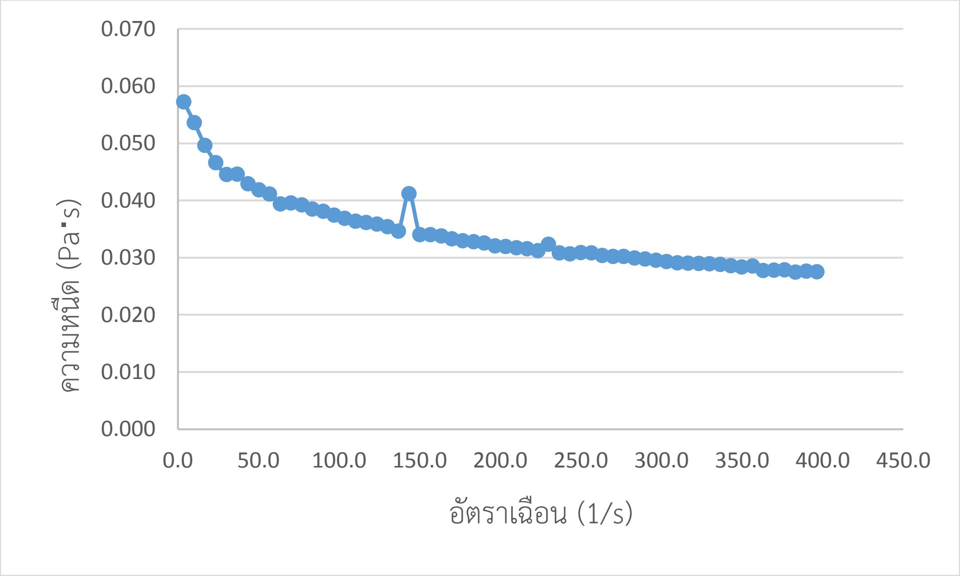
4.3.6 การวัดความหนืด

นำพอลิแซ็กคาไรด์มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้น 0.5 2 3 4 และ5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นวัดสมบัติการไหลและความหนืดด้วยเครื่อง Rheometer Bohlin รุ่น C-VOR ที่อัตราเฉือนระหว่าง 0.04 -400 วินาที$^{-1}$ เปรียบเทียบกับแซนแทนกัม ผลแสดงดังรูปที่ 4.10-4.15

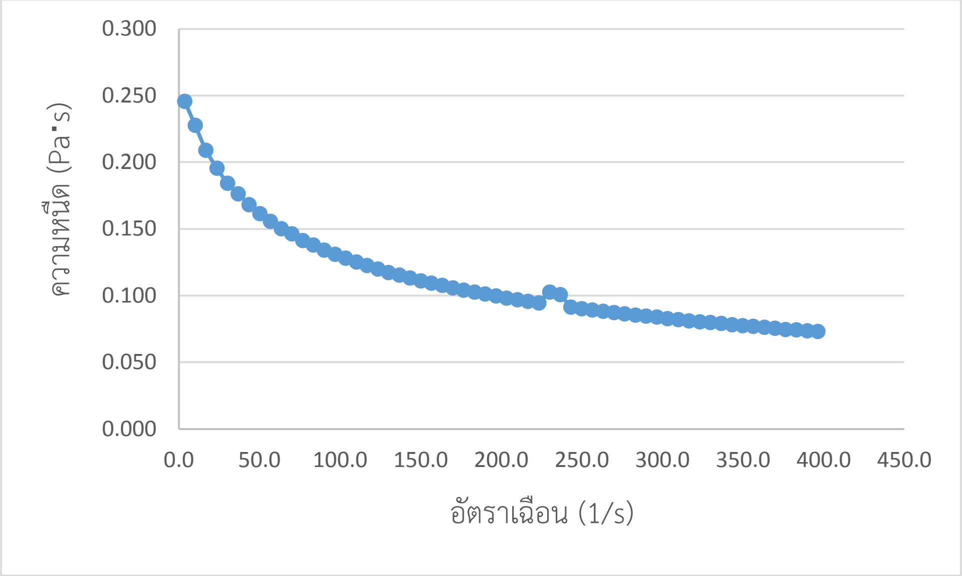
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



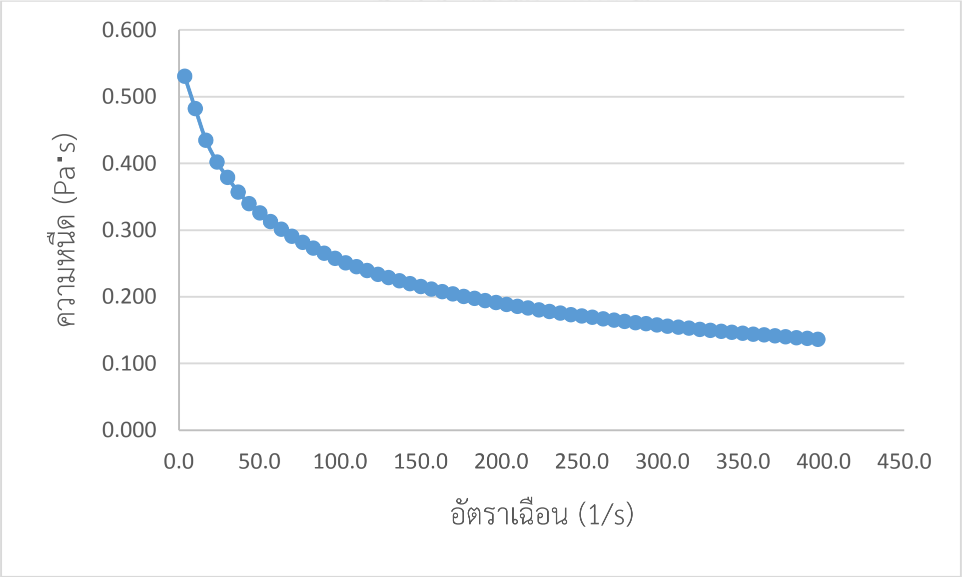
รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



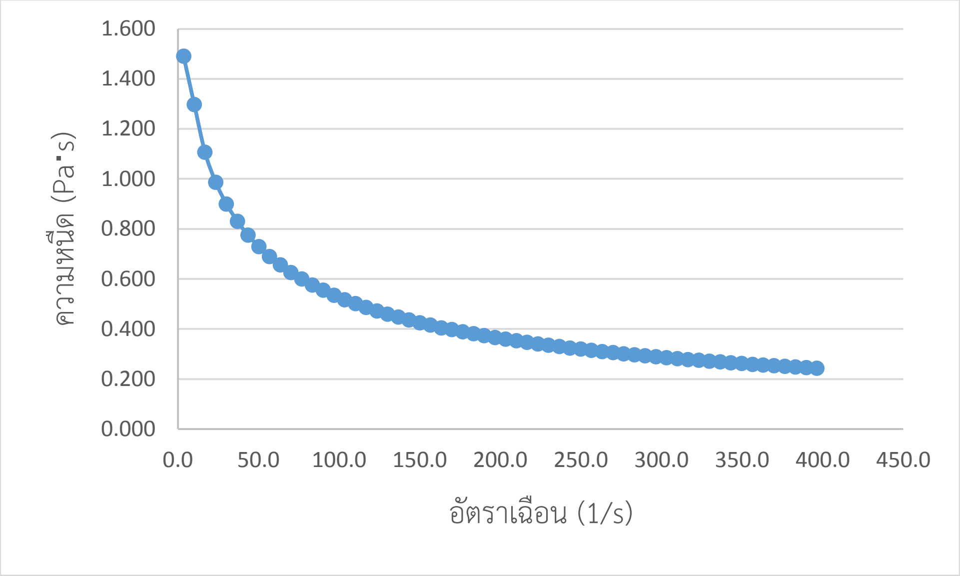
รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 2.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



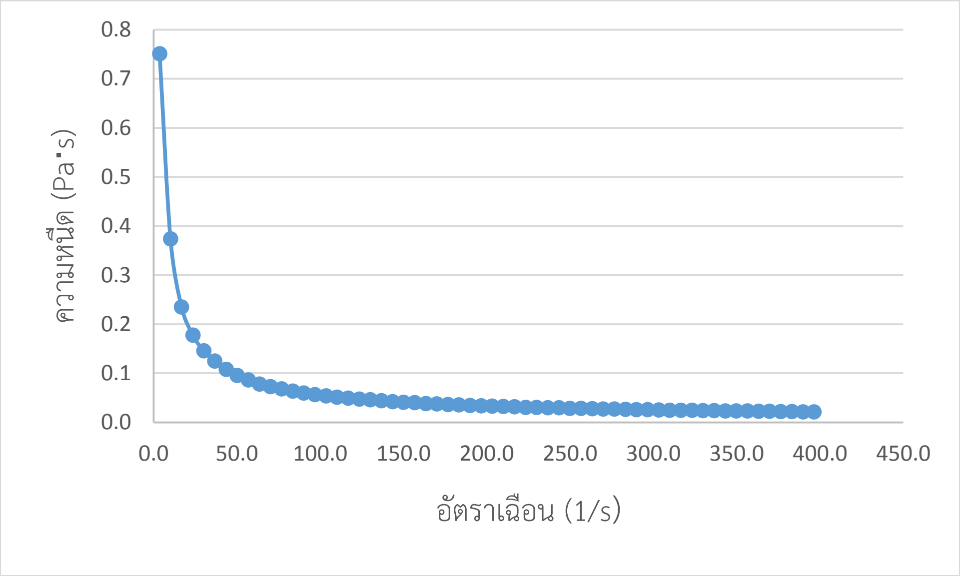
รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 3.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 4.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



รูปที่ 4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 5.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างความหนืดและอัตราเฉือนระหว่าง 0.04–400 วินาที$^{-1}$ของแซนแทนกัมที่ความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

จากรูปที่ 4.10 – 4.15 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 และแซนแทนกัม ลักษณะกราฟมีแนวโน้มไปทางเดียวกันคือ เมื่อเพิ่มอัตราเฉือน ความหนืดจะลดลง ซึ่งเป็นลักษณะของของไหลประเภทนอนนิวโตเนียน ชนิดซูโดพลาสติก โดยความหนืดสูงสุดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 0.5, 2, 3 และ 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร คือ 12.6, 57.3, 246 และ 530 mPa•s ที่อัตราเฉือน 3.65 วินาที$^{-1}$ ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร คือ 1490 mPa•s ที่อัตราเฉือน 3.58 วินาที$^{-1}$ โดยแซนแทนกัม มีความหนืดสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร คือ 751 mPa•s ที่อัตราเฉือน 3.65 วินาที$^{-1}$

4.4 ขึ้นรูปแผ่นฟิล์มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 และทดสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีของฟิล์มที่ได้

จากการผลิตฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอลซึ่งใช้เป็นพลาสติไซเซอร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และที่ไม่เติมกลีเซอรอล จากนั้นทำให้แห้งที่ 70 องศาเซลเซียส และนำฟิล์มที่แห้งแล้วเก็บใส่ในเดซิเตอร์ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 53% ที่อุณหภูมิห้อง จากการทดลองพบว่า ลักษณะทั่วไปของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ทุกชุดมีลักษณะเป็นแผ่นต่อเนื่องกันตลอดทั้งแผ่น ไม่มีรอยแตกหรือรูพรุนเมื่อมองด้วยตาเปล่า แต่ฟิล์มที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอลพบว่ามีลักษณะเปราะและแข็ง ทำให้ลอกออกจากเพลทได้ยาก จึงไม่สามารถนำฟิล์มที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอลมาทดสอบคุณสมบัติต่างๆได้ (รูปที่ 4.16) เมื่อวัดความหนาของฟิล์มด้วยเครื่องดิจิตอลไมโครมิเตอร์ พบว่าฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีความหนาของฟิล์มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือ 0.11 ± 0.00, 0.13 ± 0.00 และ 0.14 ± 0.01 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนความหนาของฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ คือ 0.009 ± 0.00 ดังแสดงผลในรูปที่ 4.17

(ก)

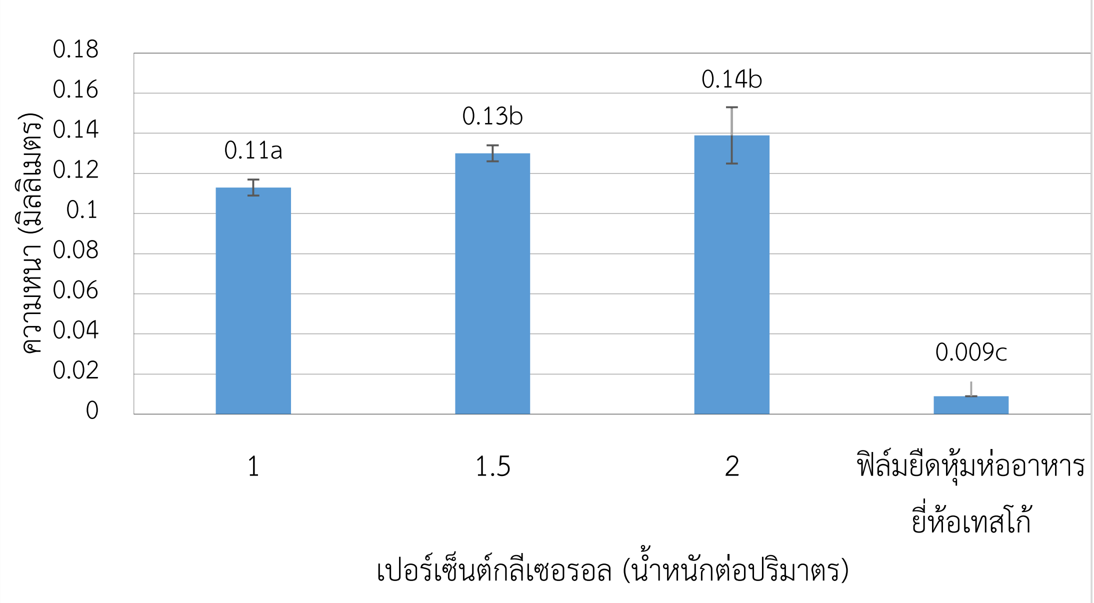
(ข)

(ค)

(ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.16 ลักษณะของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ (ก) ไม่เติมกลีเซอรอล (ข) 1% (ค) 1.5% และ (ง) 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



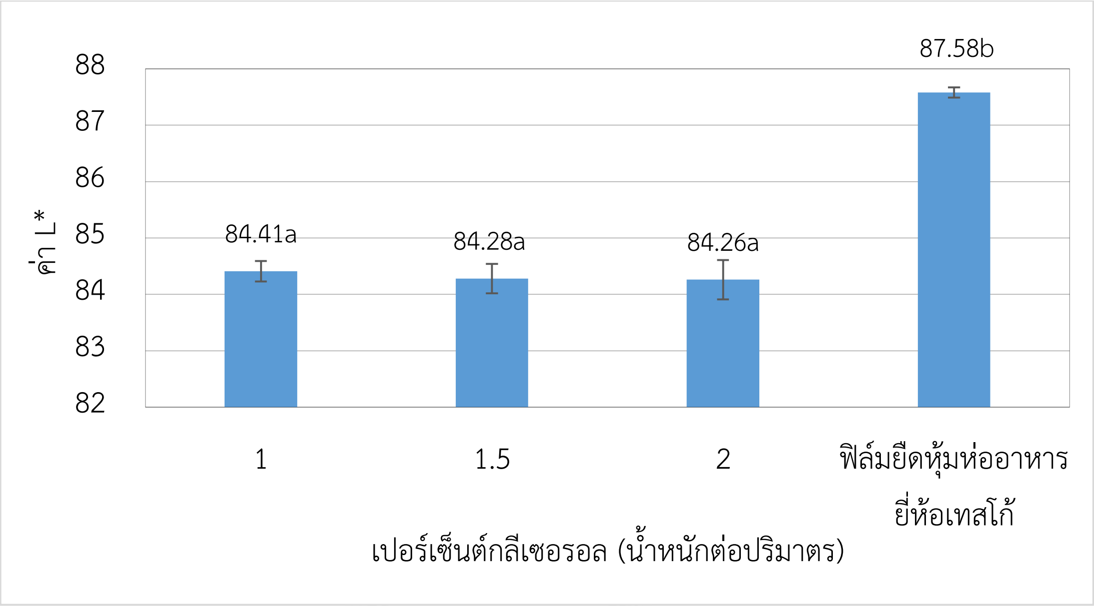
รูปที่ 4.17 ความหนาของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี one-way ANOVA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

เมื่อวัดสีด้วยเครื่องโครมามิเตอร์ในระบบ CIE ที่แสดงสีค่าเป็น L* a* และ b* โดยที่ค่าสี L* จะบ่งบอกถึงความสว่าง (Lightness) โดยมีค่าตั้งแต่ 0 (สีดำ) ถึง 100 (สีขาว) ส่วนค่าสี a* (redness/greenness) จะแสดงความเป็นสีแดงและสีเขียว โดยถ้าค่าเป็นบวกก็จะมีความเป็นสีแดงมากขึ้น และถ้าค่าเป็นลบก็จะมีความเป็นสีเขียวมากขึ้น และ และค่าสี b* จะแสดงถึงสีเหลืองและสีน้ำเงิน (yellowness/blueness) โดยถ้าค่าเป็นบวกก็จะมีความเป็นสีเหลืองมากขึ้น และถ้าค่าเป็นลบก็จะมีความเป็นสีน้ำเงินมากขึ้น จากการทดลองพบว่าฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ทุกชุดมีค่าเฉลี่ยของ L* a* และ b* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดย ค่า L* ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ผสมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าเท่ากับ 84.41 ± 0.18, 84.28 ± 0.26 และ 84.26 ± 0.35 ตามลำดับ ส่วนค่า a* มีค่าเท่ากับ -1.14 ± 0.03, -1.16 ± 0.03 และ -1.17 ± 0.04 ตามลำดับ และค่า b* มีค่าเท่ากับ 2.77 ± 0.29, 2.82 ± 0.25 และ 2.78 ± 0.16 ตามลำดับ ส่วนฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้มีค่า L* a* และ b* เท่ากับ 87.58 ± 0.09, -1.31 ± 0.00 และ 1.35 ± 0.02 สำหรับค่า ΔE^* ซึ่งเป็นค่า

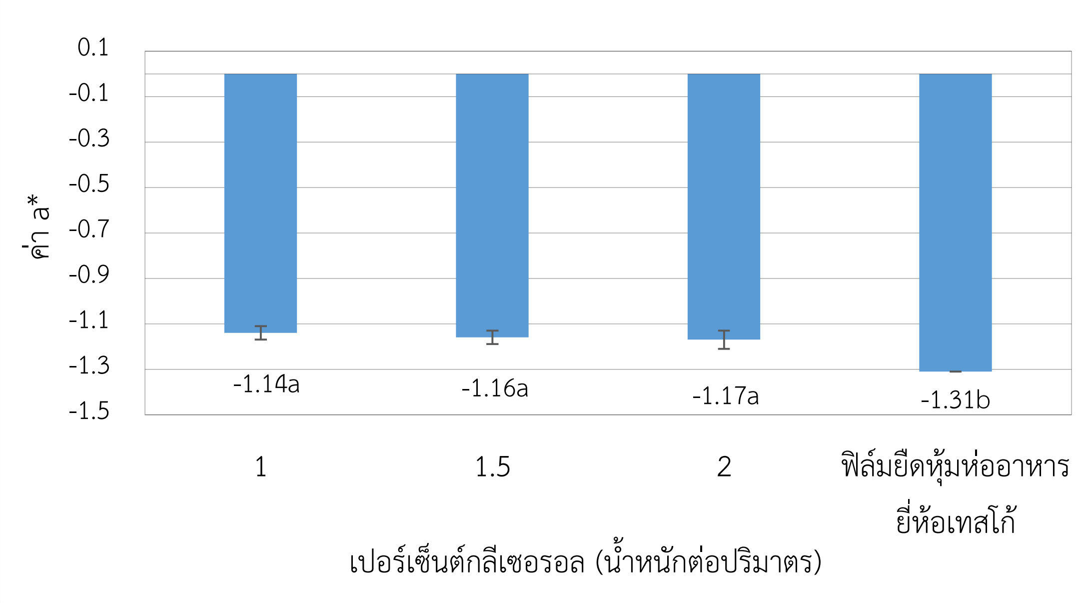
ความแตกต่างของสีของฟิล์มตัวอย่างกับแผ่นมาตรฐานสีขาวที่ใช้เป็นพื้นหลังของฟิล์มตัวอย่าง พบว่าฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ผสมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่า ΔE^* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) คือ 3.75 ± 0.29, 3.88 ± 0.25 และ 3.88 ± 0.36 ตามลำดับ ส่วนฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้มีค่าเท่ากับ 0.27 ± 0.08 ดังแสดงผลในรูปที่ 4.18 - 4.21



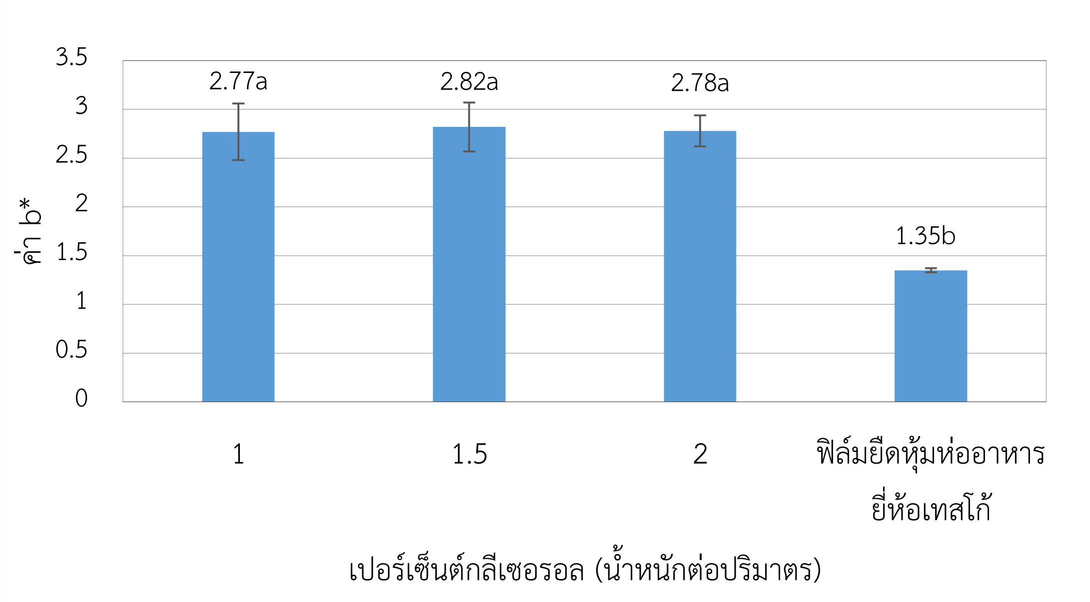
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4.18 ค่าสี L* ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี one-way ANOVA

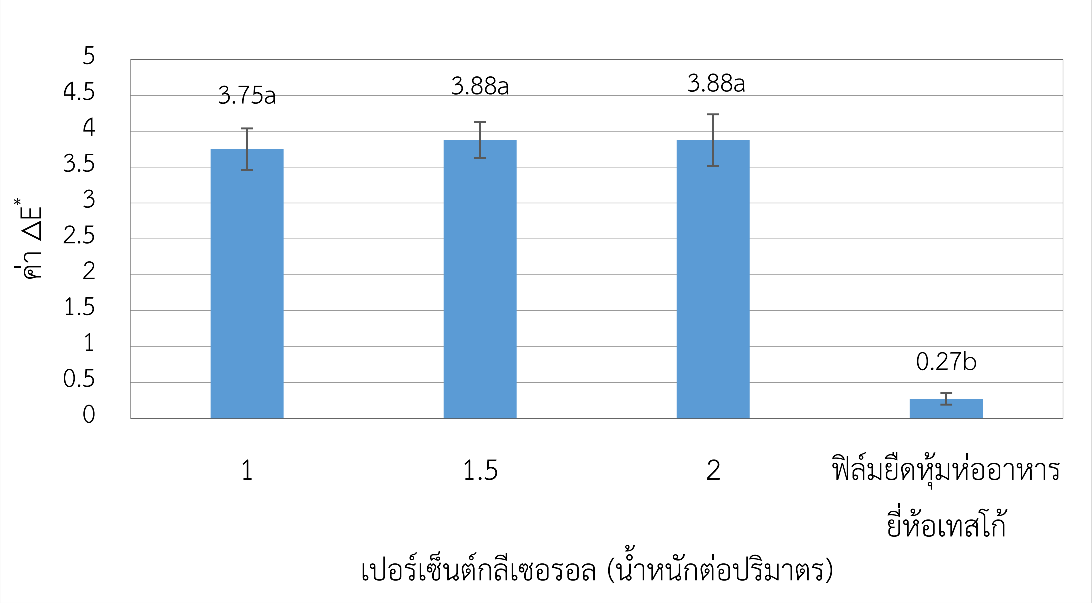


รูปที่ 4.19 ค่าสี a* ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



รูปที่ 4.20 ค่าสี b* ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

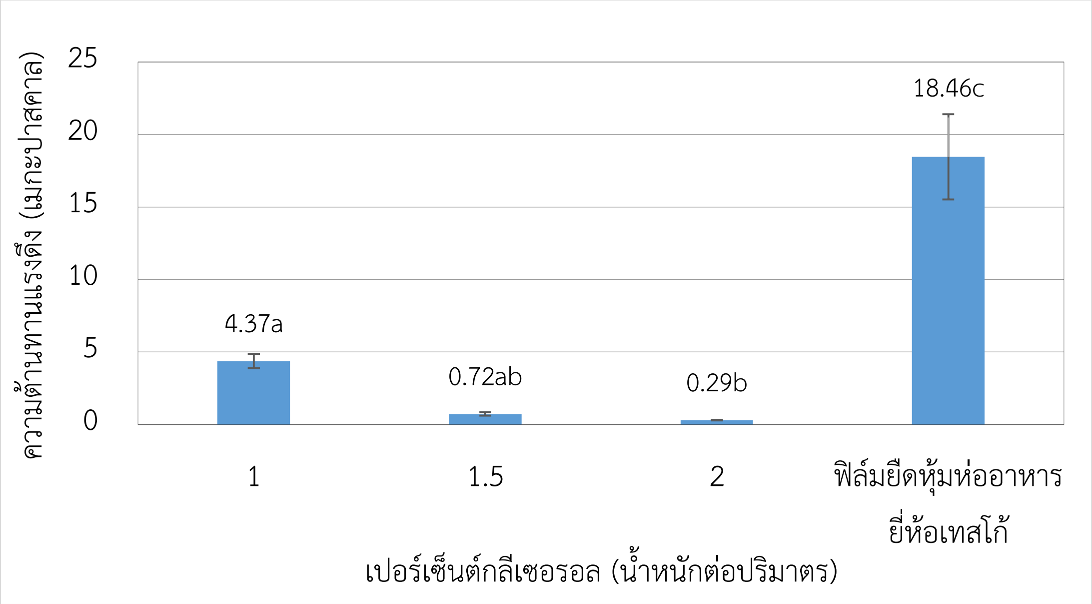
หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี one-way ANOVA



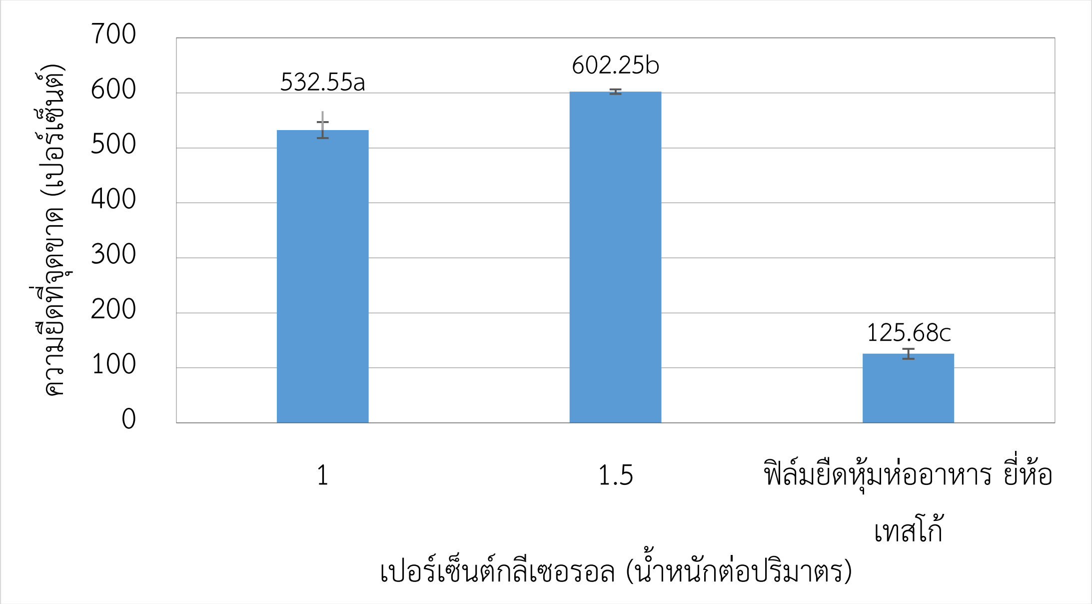
รูปที่ 4.21 ค่า ΔE^* ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี one-way ANOVA

เมื่อศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของฟิล์ม คือ ความต้านทานแรงดึงและความยืดที่จุดขาด โดยใช้เครื่องวัดเนื้อสัมผัส พบว่า ความต้านทานแรงดึงของฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้และฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าเท่ากับ 18.46 ± 2.93, 4.37 ± 0.50, 0.72 ± 0.12 และ 0.29 ± 0.02 เมกะปาสคาล ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.22 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลในสารละลายฟิล์ม จะทำให้ฟิล์มมีค่าความต้านทานแรงดึงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ส่วนความยืดที่จุดขาดของฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้และฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 1 และ 1.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 125.68 ± 8.98, 532.55 ± 14.5 และ 602.25 ± 4.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.23 สำหรับฟิล์มที่ผสมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อฟิล์มยืดไปจนสุดความยาวของเครื่องวัด พบว่าฟิล์มยังคงไม่ขาด เนื่องจากฟิล์มมีความยืดหยุ่นมาก คือมีค่าความยืดที่จุดขาดมากกว่า 1050 เปอร์เซ็นต์



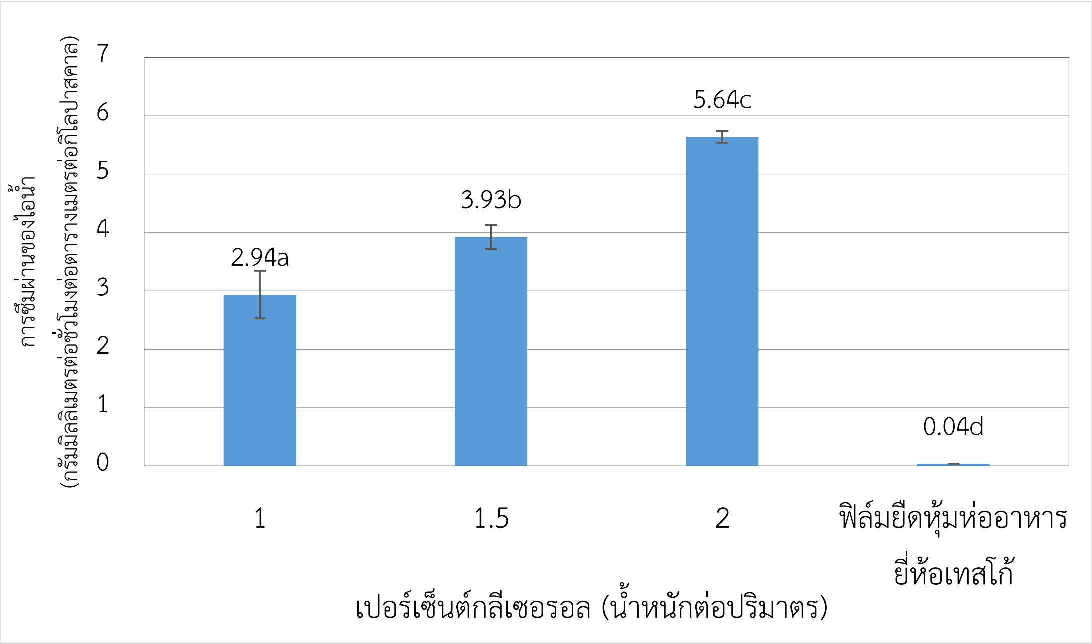
รูปที่ 4.22 ความต้านทานแรงดึง ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้



รูปที่ 4.23 ความยืดที่จุดขาดของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1 และ 1.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี one-way ANOVA

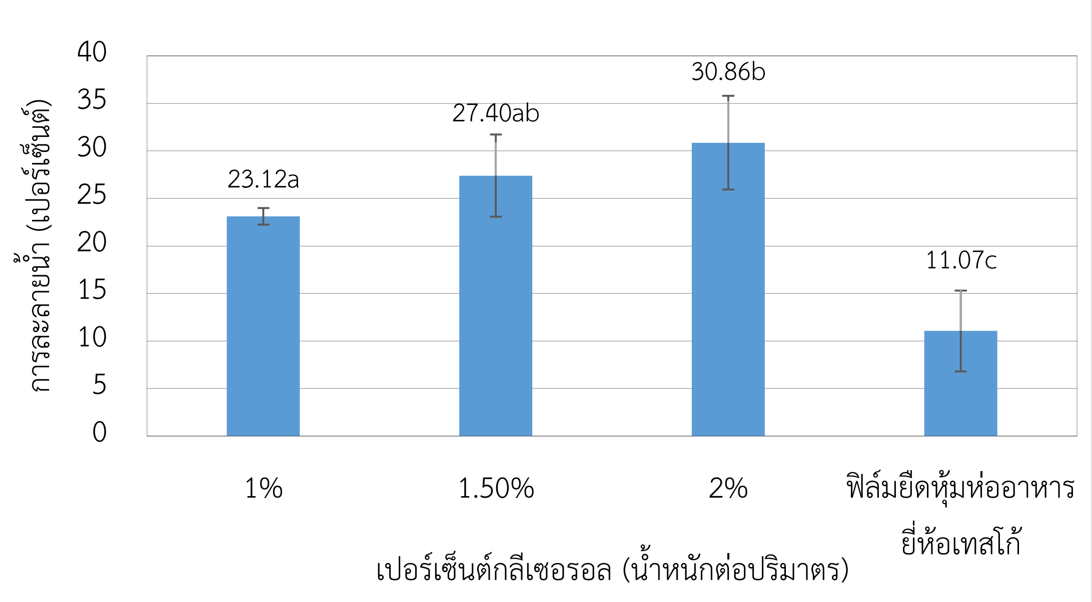
จากการศึกษาการซึมผ่านของไอน้ำของแผ่นฟิล์ม โดยขึงฟิล์มบนปากภาชนะที่ภายในบรรจุซิลิกาเจลไว้ด้วยพาราฟินเหลว จากนั้นนำไปไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 เปอร์เซ็นต์ ชั่งน้ำหนักทุกๆ 1 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ พบว่า ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 1, 1.5 และ 2 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าเท่ากับ 2.94 ± 0.41, 3.93 ± 0.21 และ 5.64 ± 0.10 กรัมมิลลิเมตรต่อชั่วโมงต่อตารางเมตรต่อกิโลปาสคาล ตามลำดับ ส่วนฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้มีค่าเท่ากับ 0.04 ± 0.00 กรัมมิลลิเมตรต่อชั่วโมงต่อตารางเมตรต่อกิโลปาสคาล ดังแสดงในรูปที่ 4.24



รูปที่ 4.24 การซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี one-way ANOVA

การละลายน้ำของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผสมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าปริมาณของพลาสติไซเซอร์มีผลต่อการละลายน้ำของฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยที่ความเข้มข้นกลีเซอรอล 1, 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าเท่ากับ 23.12 ± 0.88, 27.40 ± 4.33 และ 30.86 ± 4.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหารยี่ห้อเทสโก้มีค่าเท่ากับ 11.07 ± 4.26 ดังแสดงในรูปที่ 4.25

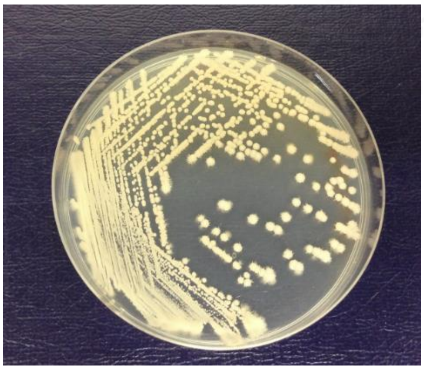


รูปที่ 4.25 การละลายน้ำของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 ที่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผสมกับกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 1, 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้

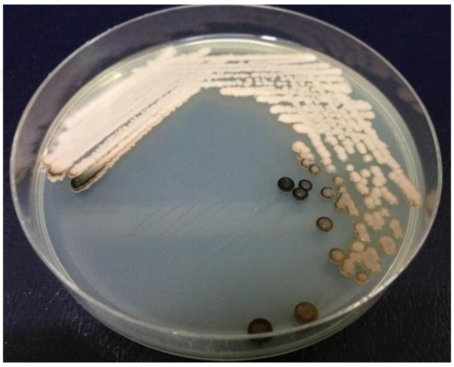
หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงค่าความแตกต่างกันของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี one-way ANOVA

4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* YTP6-14

A. pullulans สายพันธุ์ YTP6-14 เป็นเชื้อราคล้ายยีสต์ ที่แยกได้จากโครงการศึกษาความหลายหลายของยีสต์ บริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ปี พ.ศ. 2554-2555 (Thaniyavarn และคณะ, 2013) ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ทางอนุกรมวิธาน ระดับโมเลกุล โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในโดเมน D1/D2 ของ 26S rDNA จำนวน 579 bp โดยใช้ primer คือ NL1 (5’-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG- 3’) และNL2 (5’–GGTCCGTGTTTCAAGACG- 3’) เมื่อนำ *A. pullulans* YTP6-14 มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 4 วัน จากนั้น สังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และ เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน นำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะรูปร่างของเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้ออ้างอิง (Barnett และ Hunter, 1972; De Hoog และ Yurlova, 1994; Zalar และคณะ, 2008) จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* YTP6-14 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ดังแสดงผลในรูปที่ 4.26 พบว่าโคโลนีเริ่มแรกมีลักษณะเรียบ มีสีเหลืองอ่อน ในวันที่ 3 รอบๆโคโลนีจะปรากฏเส้นใยสั้นๆ และต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมชมพู และเมื่อเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 เดือนขึ้นไป โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีดำ เมื่อศึกษาลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM เป็นเวลา 1-7 วัน พบบลาสโตสปอร์ เซลล์พอง เส้นใยเทียม และ การแตกหน่อ ดังแสดงผลในรูปที่ 4.27



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.26 ลักษณะโคโลนีของ *A. pullulans* YTP6-14 (ก.) เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน และ (ข.) เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน

(ก.)

(ข.)

(ค.)

(ง.)

(จ.)

(ฉ.)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

(ช.)

รูปที่ 4.27 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า เมื่อเลี้ยง *A. pullulans* YTP6-14 ในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 24-168 ชั่วโมง พบ (ก.) บลาสโตสปอร์ และ การแตกหน่อ (ลูกศรชี้) (ข.) เส้นใยเทียม (ค.) เส้นใยเทียมและเซลล์พอง (ลูกศรชี้) (ง.) เส้นใยเทียมและมีการสร้างท่องอก (ลูกศรชี้) (จ.) เซลล์พองและมีการสร้างท่องอก (ลูกศรชี้) (ฉ.) เซลล์พองและ การแตกหน่อ (ช.) เส้นใยเทียมและโคนิเดียติดอยู่บริเวณปลายและด้านข้างของเส้นใยเทียม (ลูกศรชี้)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทวีความสำคัญมากขึ้นต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารที่มีการนำพอลิแซ็กคาไรด์มาปรับปรุงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ให้ดีขึ้น ในงานวิจัยนี้ได้นำ *A. pullulans* YTP6-14 ที่แยกได้จากโครงการศึกษาความหลายหลายของยีสต์ บริเวณชายฝั่งเกาะสีชัง อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี (Thaniyavarn และคณะ, 2013) มาศึกษาการผลิต สมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์และการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มที่บริโภคได้

การนำพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรม ปัจจัยอย่างหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ ความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ให้ได้ปริมาณสูง ดังนั้นจึงได้หาสูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงจุลินทรีย์และให้มีผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูง ในงานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบสูตรอาหาร YM เทียบกับสูตรอาหารของ Youssef และคณะ (1999) ผลการทดลองพบว่าสูตรอาหาร YM นั้นให้การเจริญและผลผลิตพอลิแซคคาไรด์สูงกว่าสูตรของ Youssef และคณะ (1999) ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากอาหาร YM นั้นเป็น complex media ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์ วิตามิน เกลือแร่ และยังมีสารช่วยเร่งการเจริญอื่นๆรวมอยู่ในสูตรอาหารด้วย (Cheng และคณะ, 2011; Seo และคณะ, 2004) แต่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรของ Youssef และคณะ (1999) เป็น synthetic media ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารแบบง่ายๆ มีน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีเกลือแร่อยู่ในส่วนประกอบของอาหาร (Gniewosz และ Duszkiewicz-Reinhard, 2008) ดังนั้นสูตร complex media จึงทำให้เชื้อเจริญเร็วและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ได้ดีกว่าสูตร synthetic media

แหล่งคาร์บอนก็เป็นปัจจัยหลักอีกข้อหนึ่ง ในการทดลองนี้ได้เปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนอันได้แก่ คือ ซูโครส กลูโคส มอลโทส และแลกโทส ต่อการเจริญและการให้ผลผลิตของเชื้อทดสอบ พบว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะที่สุดสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์อันสอดคล้องกับรายงานของ Ravella และคณะ (2010) และ Gibson และ Coughlin (2002) ในขณะที่มีบางรายงานพบว่ากลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเช่นเดียวกัน (Choudhury และคณะ, 2011; Duan และคณะ, 2008; Punnapayak และคณะ, 2003) จากการผันแปรปริมาณซูโครสพบว่าซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ คือที่ 6% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรซึ่งแตกต่างกับรายงานของ Cheng และคณะ (2011) ที่พบว่าซูโครสที่ความเข้มข้น 7.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรให้ผลผลิต พอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุด แต่ก็เป็นที่พบเช่นกันว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสำหรับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์มีความแตกต่างได้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ (Choudhury และคณะ, 2011)

เมื่อศึกษา pH เริ่มต้นของอาหาร พบว่า ค่า pH ที่ 3.5 และ 4.5 ให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และน้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกัน แต่เมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น การเจริญและผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงคล้ายกับผลที่ รายงานของ Sheoran และคณะ (2012) ในขณะที่ Wu และคณะ (2009) พบว่า pH ที่เหมาะสำหรับการผลิตและการเจริญของพอลิแซ็กคาไรด์ คือ 5.5 และ 3.5 ตามลำดับ และระดับ pH ที่ 2.5 มีผลยับยั้งการผลิตพูลลูแลน แต่กระตุ้นการผลิตกลูแคนที่ไม่ละลายแทน (Gaur และคณะ, 2010)

สำหรับความเข้มข้นที่เหมาะสมของไนโตรเจนนั้น ในงานวิจัยนี้เลือกแปรผันความเข้มข้นของเปปโทนในสูตรอาหาร YM เพราะเปปโทนมีราคาถูกและสัดส่วนที่ใช้ในสูตรอาหารมากสุด พบว่าที่ความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรให้ผลผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Prasongsuk และคณะ (2007) แต่ที่ความเข้มข้นที่สูงจะให้ปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์มีค่าลดลง Cheng และคณะ (2011) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์ทำให้ผลผลิตของพูลลูแลนลดลง เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนที่ต่ำๆ จะจำกัดการเจริญของเชื้อแต่เชื้อจะใช้คาร์บอนในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์แทน (Badr-Eldin และคณะ, 1994; Gaur และ Singh, 2010)

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าเชื้อมีการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 มีค่าเท่ากับ 12.33 ± 0.32 กรัมต่อลิตรในช่วง mid log phase ถึง stationary phase ของเชื้อ สอดคล้องกับรายงานของ Chen และคณะ (2012) และ Wu และคณะ (2009) และผลิตลดลงเล็กน้อย ซึ่งเชื้ออาจผลิตเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ออกมา (Campbell และคณะ, 2003) ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จัดอยู่ในช่วงที่รายงานโดย Donot และคณะ (2012) คือ ในช่วง 1.3 – 52.5 กรัมต่อลิตร

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จึงนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้หลากหลายขึ้นอยู่กับสมบัติเฉพาะตัวนั้นๆของพอลิแซ็กคาไรด์ ดังนั้น ลักษณะสมบัติทางเคมีและกายภาพของพอลิแซ็กคาไรด์จึงเป็นปัจจัยที่กำหนดชนิดของงานที่จะประยุกต์ใช้พอลิแซ็กคาไรด์นั้น ๆ สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตนี้ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 78.92 ± 0.15 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณโปรตีนปนเปื้อนอยู่เล็กน้อย คือ 1.24 ± 0.83 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ วิชชุดา วิไลรัศมี (2555) พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของพอลิแซ็กคาไรด์อยู่ในช่วง 65-99 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและมีปริมาณโปรตีนต่ำ คืออยู่ในช่วง 0.15-3.95 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

ความสามารถในการละลายเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ในงานวิจัยนี้ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์สามารถละลายในน้ำได้ปานกลาง ซึ่งการ

ละลายน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับการมีอยู่ของหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ (Kumar และคณะ, 2004) ส่วนการที่พอลิแซ็กคาไรด์ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เนื่องจาก ตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้จำนวนหมู่ไฮดรอกซิลของพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดการตกผลึกของพอลิแซ็กคาไรด์ในตัวทำละลายอินทรีย์ (James, 1986)

สมบัติการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของการใช้งานพอลิแซ็กคาไรด์เช่นเดียวกัน จากงานวิจัยนี้ พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการอุ้มน้ำปานกลาง คือเทียบเท่ากับคาราจีแนน แต่ยังต่ำกว่าแซนแทนกัมและกัวกัม ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า ดังนั้นคุณสมบัติการอุ้มน้ำของพอลิแซ็กคาไรด์นี้อาจนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่น ช่วยลดการสูญเสียน้ำในผลิตภัณฑ์นม (Badel และคณะ, 2011)

สำหรับส่วนประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์จากการทำ total acid hydrolysis และวิเคราะห์โดยใช้ HPLC พบว่า มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียวจึงจัดเป็นฮอมอพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งเหมือนกับรายงานของ Mishra และ Vuppu (2013) ที่ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* SB-01 เป็นพูลลูแลน

ในการประยุกต์ใช้กับอาหารนอกจากความสามารถในการละลายและความสามารถในการอุ้มน้ำความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ก็เป็นอีกอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารโดยเฉพาะอาหารที่มีเฟสน้ำและน้ำมันที่แยกจากกันถ้าพอลิแซ็กคาไรด์มีแอคทิวิตีการอิมัลซิไฟด์ที่ดีจะทำให้อาหารนั้นเป็นอิมัลชันและคงลักษณะได้นาน เช่น ในโยเกิร์ตหรือมายองเนส โดยอิมัลซิไฟเออร์ที่มีการใช้มากในอุตสาหกรรม ได้แก่ แซนแทนกัม (Gutierrez และคณะ, 2008) จึงได้ทดสอบความสามารถในการอิมัลซิไฟด์ของพอลิแซ็กคาไรด์นี้กับน้ำมันชนิดต่างๆ พบว่าสามารถก่ออิมัลชันในน้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันทานตะวัน ได้ดีเทียบเท่ากับแซนแทนกัม แตกต่างจากรายงานของ Yadav และคณะ (2014) พบว่าความสามารถการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* RYLF10 เกิดขึ้นกับน้ำมันมะกอกได้ดีที่สุด แต่ยังต่ำกว่ากัวกัมซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้าแสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่นในน้ำสลัด มายองเนส ที่มีส่วนผสมของน้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันทานตะวันได้

ความสามารถในการก่อเจลกับเกลือของโลหะของพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าไม่มีความสามารถในการก่อเจลกับเกลือของโลหะได้ ส่วนแซนแทนกัมสามารถเกิดเจลได้กับ $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ และ $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ กลไกการก่อเจลนั้นนอกจากเกิดจากการจับกันระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์และไอออนของเกลือโลหะ แล้วยังขึ้นกับโครงสร้าง ชนิดประจุ ปริมาณประจุของพอลิแซ็กคาไรด์ความสามารถในการเข้าถึงและจับกันอย่างจำเพาะระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์และไอออนเกลือของโลหะ

(Sutherland, 1994) จากการที่พอลิแซ็กคาไรด์นี้มีประจุสุทธิเป็นกลาง จึงไม่สามารถจับกับเกลือของโลหะได้ ทำให้ไม่สามารถก่อเจลได้ (Margaritis และ Pace, 1985) Cui (2005) รายงานเช่นกันว่าพูลลูแลนไม่มีคุณสมบัติในการก่อเจลดังกล่าวและมีประจุเป็นกลาง

สมบัติทางความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากในบางอุตสาหกรรมอาหารมีขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการใช้ความร้อน ดังนั้นความเสถียรต่อความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง โดยสมบัติทางความร้อนของพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างและองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ (Wang และคณะ, 2010) ถ้าพอลิแซ็กคาไรด์มีหมู่ฟังก์ชันหลายหมู่ ก็จะถูกความร้อนทำลายทีละหมู่ ดังนั้นจะปรากฏรูปแบบการสลายด้วยความร้อนมากกว่า 1 แบบ ในงานวิจัยนี้ พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีรูปแบบการสลายด้วยอุณหภูมิ 2 พีค (peak) โดยน้ำหนักพอลิแซ็กคาไรด์เริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเริ่มลดลงอีกครั้งที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส อธิบายได้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์นี้มีหมู่ฟังก์ชันที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อความร้อนสองชุดในชุดแรกหมู่ฟังก์ชันสูญเสียความสามารถที่ 30 องศาเซลเซียสและหมู่ฟังก์ชันที่สองที่สูญเสียความสามารถที่ 250 องศาเซลเซียส และสลายตัวโดยสมบูรณ์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 266.70 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับรายงานของ Ahmed และคณะ (2013) ที่พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์มีการสลายที่ 2 อุณหภูมิ คือ 40 องศาเซลเซียส และ 261.40 องศาเซลเซียส แสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิสูง จึงสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารที่มีขั้นตอนการใช้ความร้อนได้ ในกระบวนการย่อยสลายของพอลิแซ็กคาไรด์จะประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้ 1) การทำลายการดูดซับของน้ำกับพอลิแซ็กคาไรด์ 2) การกำจัดโมเลกุลของน้ำ 3) การย่อยสลายพอลิเมอร์ โดยการแตกพันธะ C–O และ C–C ในวงแหวนน้ำตาล ทำให้เกิด CO, CO_2 และ H_2O 4) การเกิดโครงสร้างของ polynuclear aromatic และ graphitic carbon (Zamora และคณะ, 2002)

จากการศึกษาสมบัติการไหลและความหนืดของพอลิแซ็กคาไรด์ เปรียบเทียบกับแซนแทนกัม พบว่า พอลิแซ็กคาไรด์มีสมบัติการไหลประเภทนอนนิวโตเนียน ชนิดซูโดพลาสติก เช่นเดียวกับแซนแทนกัม โดยลักษณะการไหลประเภทนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ เช่น สารก่อเจล สารเพิ่มความคงตัว และสารให้ความข้นหนืด (Paul และคณะ, 1986) และที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีความหนืดต่ำกว่าแซนแทนกัมอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์จนถึง 4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่ามี ความหนืดใกล้เคียงกับแซนแทนกัม ดังนั้นการขึ้นรูปฟิล์มจึงเลือกที่ความเข้มข้นนี้ ซึ่งความเข้มข้นของสารละลายส่งผลต่อการเกิดโครงสร้างตาข่ายของสายพอลิเมอร์ ถ้าความเข้มข้นของพอลิ

เมอร์ต่ำไปส่งผลให้คุณสมบัติของฟิล์มไม่สม่ำเสมอ โครงสร้างตาข่ายของฟิล์มที่ได้จึงไม่แข็งแรงและทำให้ได้ฟิล์มที่บางเกินไป (Piermaria และคณะ, 2009; ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์, 2545) แต่ถ้าความเข้มข้นของ พอลิเมอร์สูงเกินไปทำให้สายโซ่พอลิเมอร์เคลื่อนที่ได้น้อย ทำให้เกิดโครงสร้างตาข่ายระหว่างสายของพอลิเมอร์น้อย ฟิล์มที่ได้จึงไม่แข็งแรงเช่นเดียวกัน (ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์, 2545) และยังยากต่อการทำให้ฟิล์มมีพื้นผิวหน้าสม่ำเสมอ (Li และคณะ, 2015)

เมื่อนำพอลิแซ็กคาไรด์มาขึ้นรูปฟิล์ม พบว่าฟิล์มที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอล มีลักษณะเปราะและแข็ง ทำให้ลอกออกจากเพลทได้ยาก แต่ฟิล์มที่มีการเติมกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ (1-2 % น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถลอกออกจากเพลทได้ง่ายกว่า สามารถนำมาขึ้นรูปฟิล์มได้ แสดงว่าการเติมกลีเซอรอลช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นและลดความเปราะให้กับฟิล์ม เนื่องจากกลีเซอรอลจะแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างสายของพอลิเมอร์ ทำให้ความแข็งแรงของพันธะระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์ลดลง ฟิล์มที่ได้จึงมีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น (Tong และคณะ, 2008) เมื่อศึกษาคุณสมบัติต่างๆของฟิล์มพบว่าฟิล์มมีความหนาอยู่ในช่วง 0.11 - 0.14 มิลลิเมตร ซึ่งมีความหนามากกว่าฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ แต่อย่างไรก็ตามฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของ มอก. 1027-2553 (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2553) ที่ระบุไว้ว่าฟิล์มที่มีความหนาอยู่ในช่วง 0.010-0.100 (± 0.015) มิลลิเมตร สามารถนำไปใช้ทำเป็นถุงพลาสติกสำหรับบรรจุอาหารได้ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลส่งผลให้ความหนาของฟิล์มเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Thakhiew และคณะ (2010) เนื่องจากกลีเซอรอลมีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic plasticizer) ทำให้ฟิล์มดูดความชื้นมากขึ้นเกิดการขยายตัวของฟิล์ม ส่งผลให้ฟิล์มมีความหนาเพิ่มขึ้น หรืออาจเกิดจากการจัดเรียงตัวใหม่ของสายพอลิเมอร์ ทำให้มีปริมาตรอิสระมากขึ้น (free volume) (Ahmadi และคณะ, 2012; Jouki และคณะ, 2013) นอกจากนั้นวิธีและสภาวะในการขึ้นรูปฟิล์มมีผลต่อความหนาอีกด้วย (Kanmani และ Lim, 2013)

สีเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการยอมรับของผู้บริโภค (Wu และคณะ, 2013) จากงานวิจัยพบว่า สีของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ มีค่า L* a* และ b* เท่ากับ 84.32 -1.16 และ 2.79 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Wu และคณะ (2013) เมื่อวัดสีฟิล์มพูลลูแลน พบว่าค่า L* a* และ b* คือ 85.3 - 0.83 และ 0.75 แต่เมื่อเทียบกับฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้พบว่า มีสีทึบค่อนไปทางสีเหลืองและสว่างน้อยกว่า เนื่องจาก ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์เป็นผลผลิตที่มาจากทางชีวภาพ ดังนั้นโดยธรรมชาติจึงมีสีและทึบกว่าฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ (พอลิไวนิลคลอไรด์) ซึ่งเป็นพลาสติกสังเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของฟิล์มสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอาหารได้แตกต่างกัน โดยคุณสมบัติของฟิล์มที่เลือกใช้สำหรับป้องกันการเกิดออกซิเดชันของอาหารที่มีไขมันเนื่องมาจากการสัมผัสกับแสง ทำได้โดยการเลือกใช้ฟิล์มที่มีสี (Akhtar และคณะ, 2010)

การศึกษาคุณสมบัติเชิงกลของฟิล์ม คือ ความต้านทานแรงดึงและความยืดที่จุดขาด พบว่าปริมาณของกลีเซอรอล ส่งผลทำให้ความต้านทานแรงดึงลดลงและความยืดที่จุดขาดเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Bourtoom (2008) เนื่องจากกลีเซอรอล ซึ่งเป็นพลาสติไซเซอร์มีหมู่ไฮดรอกซิล สามารถเข้าไปสร้างพันธะไฮโดรเจนแทรกจับระหว่างสายโมเลกุลของพอลิเมอร์ได้ ส่งผลให้โมเลกุลของพอลิเมอร์จับกันเองได้น้อยลง มีปริมาตรอิสระ (free volume) เพิ่มขึ้น ทำให้การเคลื่อนที่ของสายโมเลกุลเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ความแข็งแรงของฟิล์มจึงลดลง (Piermaria และคณะ, 2009; Rodriguez และคณะ, 2006) และเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ซึ่งทำมาจากพอลิไวนิลคลอไรด์ พบว่า ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์มีความต้านทานแรงดึงน้อยกว่าแต่ความยืดที่จุดขาดมากกว่าฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้อย่างเห็นได้ชัด โดยความเข้มข้นของพลาสติไซเซอร์ ประเภทของสารละลาย ความเข้มข้นของสารละลาย และความหนา ส่งผลต่อคุณสมบัติของฟิล์ม (Galdeano และคณะ, 2013; ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์, 2545)

ฟิล์มที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้คนละวัตถุประสงค์ จากการวิจัยนี้พบว่าฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์มีค่าการซึมผ่านไอน้ำอยู่ในช่วง 2.94 - 5.64 กรัมมิลลิเมตรต่อชั่วโมงต่อตารางเมตรต่อกิโลปาสคาลและการละลายอยู่ในช่วง 23.12 - 30.86 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากรายงานของ Wu และคณะ (2013) พบว่าการซึมผ่านไอน้ำและการละลายของฟิล์มพูลลูแลนมีค่าเท่ากับ 0.38 กรัมมิลลิเมตรต่อชั่วโมงต่อตารางเมตรต่อกิโลปาสคาล และละลายได้ดี และเมื่อเทียบกับฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้พบว่า ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์มีค่าอัตราการซึมผ่านไอน้ำและการละลายน้ำสูงกว่าอย่างชัดเจน โดยปัจจัยที่ทำให้ฟิล์มมีคุณสมบัติแตกต่างกัน คือ เปอร์เซ็นต์กลีแซอรอล เนื่องจากกลีเซอรอลมีคุณสมบัติชอบน้ำ ดูดซึมน้ำได้ดี และสามารถแทรกตัวในโครงสร้างของพอลิเมอร์ ทำให้ไอน้ำผ่านเข้าไปในโครงสร้างของฟิล์มได้มากขึ้น (Bourtoom, 2008; Rachtanapun และ Tongdeesoontorn, 2009) นอกจากนี้คุณสมบัติของฟิล์ม เช่น การมีหมู่ไฮดรอกซิลมาก ทำให้ฟิล์มมีคุณสมบัติชอบน้ำ จึงทำให้การซึมผ่านไอน้ำและการละลายน้ำสูง (Gounga และคณะ, 2007) ฟิล์มที่มีคุณสมบัติการซึมผ่านไอน้ำและการละลายน้ำที่ต่ำ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารได้ เช่น อาหารแห้ง (Gounga และคณะ, 2007) และป้องกันการสูญเสียความชื้นของอาหาร (Janjarasskul และ Krochta, 2010) ส่วนฟิล์มที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีเหมาะสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้กับการเคลือบอาหารที่บริโภคได้โดยตรง (Ghasemlou และคณะ, 2011; Wu และคณะ, 2013) และเมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์กับฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้และฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ (ตารางที่ 5.1) พบว่า ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์จาก A. *pullulans* YTP6-14 มีคุณสมบัติความยืดที่จุดขาดสูงกว่ารายงานวิจัยอื่นๆ แสดงว่าฟิล์มมีความเหนียว สามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหารได้ แต่อย่างไรก็ตามยังต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติของฟิล์ม

ต่อไป เช่น เพิ่มคุณสมบัติป้องกันการซึมผ่านไอน้ำ อาจทำได้โดยการเติมสารที่ไม่มีขั้วหรือไม่ชอบน้ำลงไป เช่น ไขมัน น้ำมันพืช กรดไขมัน ไข น้ำมันหอมระเหย (Janjarasskul และ Krochta, 2010; Mellinas และคณะ, 2016)

ตารางที่ 5.1 คุณสมบัติของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์กับฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้และฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ

ฟิล์ม	ความต้านทานแรงดึง (เมกะปาสคาล)	ความยืดที่จุดขาด (เปอร์เซ็นต์)	การซึมผ่านไอน้ำ (กรัมมิลลิเมตรต่อชั่วโมงต่อตารางเมตรต่อกิโลปาสคาล)
ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์จาก *A. pullulans* YTP6-14 + กลีเซอรอล 1, 1.5 และ 2% w/v	4.37, 0.72 และ 0.29	532.55 และ 602.25 (กลีเซอรอล 1 และ 1.5% ตามลำดับ)	2.94, 3.93 และ 5.64
ฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้	18.46	125.68	0.04
ฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ จาก *A. pullulans* NRRL 58543 ผสมแอลจิเนต (50:50% w/w)	1.49×10^{-4}	15.04	ไม่ได้ทำการทดลอง
ฟิล์มพูลลูแลน+ กลีเซอรอล 0.75% w/v (Tong และคณะ, 2008)	67.00	11.00	0.44
ฟิล์มพูลลูแลน + กลีเซอรอล 15% w/w (Wu และคณะ, 2013)	47.60	1.27	0.38

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ฟิล์มพูลลูแลนผสมเวย์โปรตีน (70 : 30 % w/w) + กลีเซอรอล 20% w/w (Khanzadi และคณะ, 2015)	3.19	276.40	0.52
ฟิล์มพูลลูแลน (Kanmani และ Lim, 2013)	15.20	0.47	0.03
ฟิล์มแป้งข้าวโพด + กลีเซอรอล (1:0.25) (Jimenez และคณะ, 2012)	9.20	8.00	7.90
ฟิล์มไคโตซาน + กลีเซอรอล 15% w/w (Wu และคณะ, 2013)	48.80	19.20	0.65
ฟิล์มอัลจิเนตผสมแอปเปิ้ล + กลีเซอรอล 1.5% w/w (Rojas-Grau และคณะ, 2007)	2.90	51.06	4.95

เมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของ *A. pullulans* YTP6-14 บนอาหารเหลว YM เป็นเวลา 1-7 วัน พบว่าเซลล์มีรูปร่างหลายแบบตั้งแต่วันที่ 1 คือ บลาสโตสปอร์ การแตกหน่อ เส้นใยเทียม โคนิเดีย และเซลล์พอง เป็นต้น โดยรูปร่างของบลาสโตสปอร์ค่อนข้างกลมถึงรี มีหลายขนาด มีการแตกหน่อของบลาสโตสปอร์และเซลล์พอง และมีการสร้างท่องอกของเซลล์พองและเส้นใยเทียม แต่ไม่พบลักษณะของคลาไมโดสปอร์และเส้นใยตลอดการทดลองถึงวันที่ 7 ส่วนลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง YM พบว่าในระยะแรก โคโลนีมีสีเหลืองอ่อน และเริ่มสร้างเส้นใยสั้นๆออกมารอบโคโลนีในวันที่ 3 และต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมชมพูเมื่ออายุมากขึ้น สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่อธิบายโดย Barnett และ Hunter (1972) และ Zalar และคณะ (2008) และจะเปลี่ยนเป็นสีดำ

บางส่วนเนื่องจากคลาไมโดสปอร์ (De Hoog และ Yurlova, 1994) เมื่อเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 เดือนขึ้นไป แตกต่างจากรายงานอื่นๆที่พบว่าเชื้อมีการผลิตเม็ดสีเมื่อเวลาผ่านไป 7-14 วัน (Punnapayak และคณะ, 2003; เพ็ญนภา มานิตย์โชติพิสิฐ, 2551) แต่พบเชื้อที่ไม่มีการผลิตเม็ดสีหรือผลิตได้น้อยเช่นเดียวกัน (Choudhury และคณะ, 2011; Prasongsuk และคณะ, 2007; Shabtai และ Mukmenev, 1995) โดยรูปร่างของเชื้อขึ้นอยู่กับอายุของหัวเชื้อจุลินทรีย์, ภาวะในการเลี้ยงเชื้อและสูตรอาหาร (Deshpande และคณะ, 1992; Reeslev และคณะ, 1991; Sugumaran และคณะ, 2013) การที่เชื้อไม่ผลิตเม็ดสีเป็นข้อดีในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจาก *A. pullulans* ส่วนมากมักจะผลิตเม็ดสีออกมาระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ทำให้ผลผลิตที่ได้ปนเปื้อน ดังนั้นจึงต้องมีขั้นตอนการกำจัดสีออกไป เช่น การดูดซับสีด้วยผงถ่านกัมมันต์, การใช้ตัวทำละลายหรือเกลือรวมกัน หรือทำให้เชื้อเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) เพื่อให้ผลิตเม็ดสีลดลงหรือไม่มีการผลิตเม็ดสี เช่น รังสียูวี, กรดไนตรัส เป็นต้น (Gniewosz และ Duszkiewicz-Reinhard, 2008; Prajapati และคณะ, 2013) ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนในกระบวนการผลิต ดังนั้นการใช้สายพันธุ์ที่มีการผลิตเม็ดสีน้อยหรือจำกัด จะช่วยลดขั้นตอนเหล่านี้ได้

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจาก *A. pullulans* YTP6-14 มีความสามารถในการขึ้นรูปฟิล์ม ถึงแม้จะมีคุณสมบัติไม่ดีเท่าฟิล์มยืดหุ้มห่ออาหาร ยี่ห้อเทสโก้ แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการขึ้นรูปฟิล์มเบื้องต้น ยังต้องมีการปรับปรุงและพัฒนาคุณสมบัติของฟิล์มต่อไป โดยจุดเด่นของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ คือ มีความปลอดภัย สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ สามารถรับประทานได้ เป็นการช่วยลดปัญหามลพิษทางด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่งไม่พบคุณสมบัตินี้ในฟิล์มพลาสติก ดังนั้นฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อนี้จึงเป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและนำไปพัฒนาต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการผลิตในระดับถังหมักเพื่อเพิ่มผลผลิตและประสิทธิภาพของพอลิแซ็กคาไรด์ให้สูงขึ้น

2. ควรศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูกลง เช่น ของเหลือใช้จากอุตสาหกรรม นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจน เพื่อลดต้นทุนในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

3. ควรศึกษาสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มเติม เช่น ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หมู่ฟังก์ชันนัล น้ำหนักโมเลกุลของพอลิแซ็กคาไรด์ เป็นต้น เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลมากขึ้น

4. ควรศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการขึ้นรูปฟิล์ม และปรับปรุงฟิล์มให้มีคุณสมบัติดีขึ้น เช่น ชนิดของพลาสติไซเซอร์ ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ การเติมสารที่ไม่ชอบน้ำ และสารต้านจุลินทรีย์ เป็นต้น

5. ควรศึกษาคุณสมบัติของฟิล์มเพิ่มเติม เช่น การซึมผ่านแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T. & Agustini, T. W. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloids* **28**, 189-199 (2012).

Ahmadi, R., Kalbasi-Ashtari, A., Oromiehie, A., Yarmand, M. S. & Jahandideh, F. Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (Plantago ovata Forsk). *Journal of Food Engineering* **109**, 745-751, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.11.010 (2012).

Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A. & Khan, S. T. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir–part II. *Food Hydrocolloids* **30**, 343-350 (2013).

Akhtar, M. J. *et al.* Control of salmon oil photo-oxidation during storage in HPMC packaging film: Influence of film colour. *Food Chemistry* **120**, 395-401, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.10.010 (2010).

ASTM. Standard test methods for water vapour transmission of materials E 95-96. (1995)

Badel, S., Bernardi, T. & Michaud, P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* **29**, 54-66, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.011 (2011).

Badr-Eldin, S., El-Tayeb, O., El-Masry, H., Mohamad, F. & El-Rahman, O. A. Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*: Factors affecting polysaccharide formation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **10**, 423-426 (1994).

Bai, J., Alleyne, V., Hagenmaier, R. D., Mattheis, J. P. & Baldwin, E. A. Formulation of zein coatings for apples (Malus domestica Borkh). *Postharvest Biology and Technology* **28**, 259-268 (2003).

Baird, J. K., Sandford, P. A. & Cottrell, I. W. Industrial applications of some new microbial polysaccharides. *Nature Biotechnology* **1**, 778-783 (1983).

Bajaj, I. B., Survase, S. A., Saudagar, P. S. & Singhal, R. S. Gellan gum: Fermentative production, downstream processing and applications. *Food Technology and Biotechnology* **45**, 341 (2007).

Baldwin, E., Nisperos, M., Chen, X. & Hagenmaier, R. Improving storage life of cut apple and potato with edible coating. *Postharvest Biology and Technology* **9**, 151-163 (1996).

Barnett, H. L. & Hunter, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. 3 edn, United States: Burgess publishing company, (1972).

Bourtoom, T. Plasticizer effect on the properties of biodegradable blend film from rice starch-chitosan. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology* **30**, 149 (2008).

Bradford, M. A rapid and sensitive method the quantitation of microgram quantities of protein utilization the principle of protein-binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254 (1976).

Bulmer, M. A., Catley, B. J. & Kelly, P. J. The effect of ammonium ions and pH on the elaboration of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan, by *Aureobasidium pullulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **25**, 362-365 (1987).

Calazans, G., Lopes, C., Lima, R. & De Franc, F. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters* **19**, 19-21 (1997).

Campbell, B. S., McDougall, B. M. & Seviour, R. J. Why do exopolysaccharide yields from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation? *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 104-112 (2003).

Chamy, R. & Rosenkranz, F. Biodegradation-life of science. Intech, 378 pp. (2013).

Chen, J., Wu, S. & Pan, S. Optimization of medium for pullulan production using a novel strain of *Auerobasidium pullulans* isolated from sea mud through response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* **87**, 771-774 (2012).

Chen, Y., Sun, L., Zeng, Y., Wang, L. & An, L. The production-influencing factors of extracellular polysaccharide (EPS) from a strain of lactic acid bacteria and EPS extraction. *Frontiers of Biology in China* **1**, 236-240, doi:10.1007/s11515-006-0028-5 (2006).

Cheng, K. C., Demirci, A. & Catchmark, J. M. Evaluation of medium composition and fermentation parameters on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Food Science and Technology International*, 1-11 (2011).

Cheng, K. C., Demirci, A. & Catchmark, J. M. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **92**, 29-44 (2011).

Chi, Z. *et al.* Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**, 793-804 (2009).

Chi, Z. & Zhao, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 206-211, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00119-4 (2003).

Chien, P. J., Sheu, F. & Yang, F. H. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering* **78**, 225-229 (2007).

Choudhury, A. R., Saluja, P. & Prasad, G. Pullulan production by an osmotolerant *Aureobasidium pullulans* RBF-4A3 isolated from flowers of *Caesulia axillaris*. *Carbohydrate Polymers* **83**, 1547-1552 (2011).

Collins, E. A., Bares, J. & Billmeyer, F. W. Experiments in polymer science. New York: Wiley, (1973).

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

Corzo, J., Leon-Barrios, M., Hernando-Rico, V. & Gutierrez-Navarro, A. Precipitation of metallic cations by the acidic exopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium* (*Chamaecytisus*) strain BGA-1. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 4531-4536 (1994).

Craig, D. Q. & Reading, M. Thermal analysis of pharmaceuticals. New York: CRC press, (2006).

Cui, S. W. Food carbohydrates chemistry, physical properties, and applications United states of America: CRC Press, (2005).

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

De Hoog, G. *et al.* Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8 S and ITS2 rDNA sequence comparison. *Studies in Mycology* **43**, 31-37 (1999).

De Vuyst, L. & Degeest, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **23**, 153-177 (1999).

Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A. & Voilley, A. Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. *Critical Reviews in Food Science* **38**, 299-313 (1998).

Deshpande, M. S., Rale, V. B. & Lynch, J. M. *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report. *Enzyme and Microbial Technology* **14**, 514-527, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0141-0229(92)90122-5 (1992).

Dhanapal, A. *et al.* Edible films from polysaccharides. *Food Science and Quality Management*, 9-17 (2012).

Dong, H., Cheng, L., Tan, J., Zheng, K. & Jiang, Y. Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. *Journal of Food Engineering* **64**, 355-358 (2004).

Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C. & Schorr-Galindo, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers* **87**, 951-962, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083 (2012).

Duan, X., Chi, Z., Wang, L. & Wang, X. Influence of different sugars on pullulan production and activities of α-phosphoglucose mutase, UDPG-pyrophosphorylase and glucosyltransferase involved in pullulan synthesis in *Aureobasidium pullulans* Y68. *Carbohydrate Polymers* **73**, 587-593 (2008).

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry* **28**, 350-356 (1956).

Fajardo, P. *et al.* Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *Journal of Food Engineering* **101**, 349-356 (2010).

Fan, L., Soccol, A. T., Pandey, A. & Ricardo Soccol, C. Effect of nutritional and environmental conditions on the production of exo-polysaccharide of *Agaricus*

brasiliensis by submerged fermentation and its antitumor activity. *LWT - Food Science and Technology* **40**, 30-35, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.006 (2007).

Fang, Z. Pretreatment techniques for biofuels and biorefineries. Springer, (2013).

Farid, M. M. Mathematical modeling of food processing. New York: CRC Press, (2010).

Freitas, F., Alves, V. D. & Reis, M. A. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* **29**, 388-398 (2011).

Freitas, F., Alves, V. D., Reis, M. A., Crespo, J. G. & Coelhoso, I. M. Microbial polysaccharide-based membranes: Current and future applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 1-11 (2014).

Galdeano, M. C., Wilhelm, A. E., Mali, S. & Grossmann, M. V. E. Influence of thickness on properties of plasticized oat starch films. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **56**, 637-644 (2013).

Gaur, R. & Singh, R. Optimization of physico-chemical and nutritional parameters for pullulan production by a mutant of thermotolerant *Aureobasidium pullulans* in fed batch fermentation process. *African Journal of Biotechnology* **9**, 7322-7330 (2010).

Gaur, R., Singh, R., Gupta, M. & Gaur, M. K. *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology* **9**, 7989-7997 (2010).

Ghasemlou, M., Khodaiyan, F. & Oromiehie, A. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefiran. *Carbohydrate Polymers* **84**, 477-483, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.010 (2011).

Gibson, L. H. & Coughlin, R. W. Optimization of high molecular weight pullulan production by *Aureobasidium pullulans* in batch fermentations. *Biotechnology Progress* **18**, 675-678 (2002).

Gniewosz, M. & Duszkiewicz-Reinhard, W. Comparative studies on pullulan synthesis, melanin synthesis and morphology of white mutant *Aureobasidium pullulans* B-1 and parent strain Ap-3. *Carbohydrate Polymers* **72**, 431-438 (2008).

Gniewosz, M., Krasniewska, K., Woreta, M. & Kosakowska, O. Antimicrobial activity of a pullulan–caraway essential oil coating on reduction of food microorganisms and quality in fresh baby carrot. *Journal of Food Science* **78**, 1242-1248 (2013).

Gniewosz, M. & Synowiec, A. Antibacterial activity of pullulan films containing thymol. *Flavour and Fragrance Journal* **26**, 389-395 (2011).

Gniewosz, M. *et al.* The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae flos*) on postharvest quality of apples. *Food Control* **37**, 351-361 (2014).

Gounga, M. E., Xu, S. Y. & Wang, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *Journal of Food Engineering* **83**, 521-530 (2007).

Grassi, M., Grassi, G., Lapasin, R. & Colombo, I. Understanding drug release and absorption mechanisms: a physical and mathematical approach. New York: CRC Press, (2006).

Guilbert, S., Gontard, N. & Gorris, L. G. Prolongation of the shelf-life of perishable food products using biodegradable films and coatings. *LWT-Food Science and Technology* **29**, 10-17 (1996).

Gutierrez, T., Shimmield, T., Haidon, C., Black, K. & Green, D. H. Emulsifying and metal ion binding activity of a glycoprotein exopolymer produced by *Pseudoalteromonas* sp. strain TG12. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 4867-4876 (2008).

Hanusova, K., Dobias, J. & Klaudisova, K. Effect of packaging films releasing antimicrobial agents on stability of food products. *Czech Journal of Food Sciences* **27**, 347-349 (2009).

Izydorczyk, M., Cui, S. W. & Wang, Q. Polysaccharide gums: Structures, functional properties, and applications. *Food carbohydrates: Chemistry, physical properties, and applications*, 293-299 (2005).

James, K. C. Solubility and related properties (drugs and the pharmaceutical sciences) 1edn, Vol. 28 CRC Press, (1986).

Janjarasskul, T. & Krochta, J. M. Edible packaging materials. *Annual Review of Food Science and Technology* **1**, 415-448 (2010).

Jiang, Y. & Li, Y. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry* **73**, 139-143, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00246-6 (2001).

Jimenez, A., Fabra, M. J., Talens, P. & Chiralt, A. Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids* **26**, 302-310, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.009 (2012).

Jolly, L., Vincent, S. J., Duboc, P. & Neeser, J. R. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 367-374 (2002).

Jouki, M., Khazaei, N., Ghasemlou, M. & HadiNezhad, M. Effect of glycerol concentration on edible film production from cress seed carbohydrate gum. *Carbohydrate Polymers* **96**, 39-46, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.077 (2013).

Kalia, S. & Sabaa, M. W. Polysaccharide based graft copolymer. Berlin: Springer, (2013).

Kambourova, M. *et al.* Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. *Carbohydrate Polymers* **77**, 338-343 (2009).

Kanmani, P. & Lim, S. T. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. *Food chemistry* **141**, 1041-1049 (2013).

Kaur, G., Mahajan, M. & Bassi, P. Derivatized polysaccharides: preparation, characterization, and application as bioadhesive polymer for drug delivery. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* **62**, 475-481 (2013).

Khan, M. I., Adrees, M. N., Tariq, M. R. & Sohaib, M. Application of edible coating for improving meat quality: A review. *Pakistan Journal of Food Sciences* **23**, 71-79 (2013).

Khan, T., Park, J. K. & Kwon, J.-H. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. *Korean Journal of Chemical Engineering* **24**, 816-826, doi:10.1007/s11814-007-0047-1 (2007).

Khanzadi, M. *et al.* Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate–pullulan by application of beeswax. *Carbohydrate*

Polymers **118**, 24-29, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.11.015 (2015).

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

Kumar, A. S., Mody, K. & Jha, B. Bacterial exopolysaccharides-a perception. *Journal of basic microbiology* **47**, 103-117, doi:10.1002/jobm.200610203 (2007).

Kumar, C. G., Joo, H. S., Choi, J. W., Koo, Y. M. & Chang, C. S. Purification and characterization of an extracellular polysaccharide from haloalkalophilic *Bacillus* sp. I-450. *Enzyme and Microbial Technology* **34**, 673-681, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.03.001 (2004).

Kumar, D., Saini, N., Pandit, V. & Ali, S. An insight to pullulan: A biopolymer in pharmaceutical approaches. *International Journal of Basic and Applied Sciences* **1**, 202-219 (2012).

Laohakunjit, N. & Noomhorm, A. Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. *Starch‐Starke* **56**, 348-356 (2004).

Leathers, T. D. Biotechnological production and applications of pullulan. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**, 468-473 (2003).

Lee, J.-H. *et al.* Optimization of conditions for the production of pullulan and high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology Letters* **23**, 817-820 (2001).

Lee, J., Park, H. J., Lee, C. & Choi, W. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *LWT-Food Science and Technology* **36**, 323-329 (2003).

Li, Y., Yokoyama, W., Wu, J., Ma, J. & Zhong, F. Properties of edible films based on pullulan–chitosan blended film-forming solutions at different pH. *RSC Advances* **5**, 105844-105850 (2015).

Lin, E. S. & Chen, Y. H. Factors affecting mycelial biomass and exopolysaccharide production in submerged cultivation of *Antrodia cinnamomea* using complex media. *Bioresource Technology* **98**, 2511-2517, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.008 (2007).

Lindsay, S. High performance liquid chromatography. Singapore: John Wiley and Sons, (1991).

Loaec, M., Olier, R. & Guezennec, J. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research* **31**, 1171-1179, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00375-2 (1997).

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

Madi, N. S., McNeil, B. & Harvey, L. M. Influence of culture pH and aeration on ethanol production and pullulan molecular weight by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **65**, 343-350 (1996).

Maqbool, M., Ali, A., Ramachandran, S., Smith, D. R. & Alderson, P. G. Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating. *Crop Protection* **29**, 1136-1141 (2010).

Margaritis, A. & Pace, P. W. Microbial polysaccharide. New York: New York Pergamon Press, (1985).

McIntosh, M., Stone, B. A. & Stanisich, V. A. Curdlan and other bacterial (1-->3)-beta-D-glucans. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**, 163-173, doi:10.1007/s00253-005-1959-5 (2005).

McNeil, B. & Kristiansen, B. Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks. *Enzyme and Microbial Technology* **12**, 521-526 (1990).

McNeil, B., Kristiansen, B. & Seviour, R. Polysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering* **33**, 1210-1212 (1989).

Mellinas, C. *et al.* Active edible films: Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science* **133**, 1-15 (2016).

Mishra, B. & Vuppu, S. A study on downstream processing for the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*-SB-01 from the fermentation broth. *Research Journal of Recent Sciences* **2**, 16-19 (2013).

Nonsee, K., Supitchaya, C. & Thawien, W. Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) oil. *International Food Research Journal* **18**, 1531-1541 (2011).

Oguzhan, P. & Yangılar, F. Pullulan: Production and usage in food industry. *African Journal of Food Science and Technology* **4(3)**, 57-63 (2013).

Paul, F., Morin, A. & Monsan, P. Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. *Biotechnology Advances* **4**, 245-259 (1986).

Piermaria, J. A., Pinotti, A., Garcia, M. A. & Abraham, A. G. Films based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids* **23**, 684-690 (2009).

Prajapati, V. D., Jani, G. K. & Khanda, S. M. Pullulan: an exopolysaccharide and its various applications. *Carbohydrate Polymers* **95**, 540-549 (2013).

Prasertsan, P., Dermlim, W., Doelle, H. & Kennedy, J. Screening, characterization and flocculating property of carbohydrate polymer from newly isolated *Enterobacter cloacae* WD7. *Carbohydrate Polymers* **66**, 289-297 (2006).

Prasongsuk, S. *et al.* Pullulan production by tropical isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**, 55-61 (2007).

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

Preston, R. D. Polysaccharide conformation and cell wall function. *Annual Review of Plant Physiology* **30**, 55-78, doi:10.1146/annurev.pp.30.060179.000415 (1979).

Punnapayak, H., Sudhadham, M., Prasongsuk, S. & Pichayangkura, S. Characterization of *Aureobasidium pullulans* isolated from airborne spores in Thailand. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **30**, 89-94 (2003).

Rachtanapun, P. & Tongdeesoontorn, W. Effect of glycerol concentration on sorption isotherms and water vapour permeability of carboxymethyl cellulose films from waste of mulberry paper. *Asian Journal of Food and Agro-Industry* **2**, 478-488 (2009).

Ramalingam, C., Priya, J. & Mundra, S. Applications of microbial polysaccharides in food industry. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* **27(1)**, 322-324 (2014).

Ramos, S. & Garcia Acha, I. A vegetative cycle of *Pullularia pullulans*. *Transactions of the British Mycological Society* **64**, 129-135, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(75)80083-0 (1975).

Ravella, S. R. *et al.* Extracellular polysaccharide (EPS) production by a novel strain of yeast-like fungus *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers* **82**, 728-732, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.039 (2010).

Ravi Kumar, M. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers* **46**, 1-27, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9 (2000).

Reeslev, M., Nielsen, J. C., Olsen, J., Jensen, B. & Jacobsen, T. Effect of pH and the initial concentration of yeast extract on regulation of dimorphism and exopolysaccharide formation of *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Mycological Research* **95**, 220-226 (1991).

Rehm, B. H. Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 578-592 (2010).

Rinaudo, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* **57**, 397-430 (2008).

Rodriguez, M., Oses, J., Ziani, K. & Mate, J. I. Combined effect of plasticizers and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Research International* **39**, 840-846, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2006.04.002 (2006).

Rojas-Grau, M. A. *et al.* Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering* **81**, 634-641, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.01.007 (2007).

Rojas‐Grau, M., Grasa‐Guillem, R. & Martin‐Belloso, O. Quality changes in fresh‐cut fuji apple as affected by ripeness stage, antibrowning agents, and storage atmosphere. *Journal of Food Science* **72**, 36-43 (2007).

Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E. & Thompson, F. L. The prokaryotes: applied bacteriology and biotechnology. 4 edn, Berlin: Springer, (2013).

Salehizadeh, H. & Shojaosadati, S. A. Extracellular biopolymeric flocculants: Recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances* **19**, 371-385, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00071-4 (2001).

Sanchez-Ortega, I. *et al.* Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 1-18 (2014).

Seo, H. P. *et al.* Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. *Bioresource Technology* **95**, 293-299, doi:10.1016/j.biortech.2003.02.001 (2004).

Seydim, A. & Sarikus, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International* **39**, 639-644 (2006).

Shabtai, Y. & Mukmenev, I. Enhanced production of pigment-free pullulan by a morphogenetically arrested *Aureobasidium pullulans* (ATCC 42023) in a two-stage fermentation with shift from soy bean oil to sucrose. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**, 595-603, doi:10.1007/bf00164760 (1995).

Sheoran, S. K., Dubey, K. K., Tiwari, D. & Singh, B. P. Directive production of pullulan by altering cheap source of carbons and nitrogen at 5 L bioreactor level. *ISRN Chemical Engineering*, 1-5 (2012).

Shih, I. L., Van, Y. T., Yeh, L. C., Lin, H. G. & Chang, Y. N. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. *Bioresource Technology* **78**, 267-272, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00027-X (2001).

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

Sikorski, Z. E. Chemical and functional properties of food components. 3 edn, New York: CRC Press, (2007).

Simon, L., Caye-Vaugien, C. & Bouchonneau, M. Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: New observations. *Microbiology*, 979-985 (1993).

Singh, R., Gaur, R., Tiwari, S. & Gaur, M. K. Production of pullulan by a thermotolerant *Aureobasidium pullulans* strain in non-stirred fed batch fermentation process. *Brazilian Journal of Microbiology* **43**, 1042-1050 (2012).

Singh, R. S., Saini, G. K. & Kennedy, J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. *Carbohydrate Polymers* **73**, 515-531 (2008).

Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. Principles of instrumental analysis. 6 edn, The United States of America David Harris, (2007).

Skurtys, O. *et al.* Food hydrocolloid edible films and coatings. New York: Nova Science Publishers, 66 pp. (2010).

Sugumaran, K. *et al.* Production of pullulan by *Aureobasidium pullulans* from asian palm kernel: A novel substrate. *Carbohydrate Polymers* **92**, 697-703 (2013).

Suput, D. Z., Lazic, V. L., Popovic, S. Z. & Hromis, N. M. Edible films and coatings: Sources, properties and application. *Food and Feed Research* **42**, 11-22 (2015).

Sutherland, I. W. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge: Cambridge University Press, (1990).

Sutherland, I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* **12(2)**, 393-448, doi:http://dx.doi.org/10.1016/0734-9750(94)90018-3 (1994).

Sutherland, I. W. Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential. *International Biodeterioration and Biodegradation* **38**, 249-261, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(96)00058-3 (1996).

Sutherland, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **38**, 319-328 (1999).

Sutherland, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal* **11**, 663-674, doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00112-1 (2001).

Tako, M., Nakamura, S. & Nagahama, T. Studies on the application of polysaccharide produced by coryneform bacteria strain c-81 Physical properties of sweet bean

jelly containing the polysaccharide as a stabilizing agent. *Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of the Ryukyus* **29**, 79-86 (1982).

Thakhiew, W., Devahastin, S. & Soponronnarit, S. Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films. *Journal of Food Engineering* **99**, 216-224, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.02.025 (2010).

Thambugala, K. M. *et al.* Dothideales. *Fungal Diversity* **68**, 105-158 (2014).

Thaniyavarn, J. *et al.* Yeast biodiversity in the coastal area of Koh Si Chang and their potential as biosurfactant producers. *The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference.* 2013. The emerald hotel, Bangkok, Thailand. (2013).

Tomasik, P. Chemical and functional properties of food saccharides. New York: CRC Press, (2003).

Tong, Q., Xiao, Q. & Lim, L. T. Preparation and properties of pullulan–alginate–carboxymethylcellulose blend films. *Food Research International* **41**, 1007-1014 (2008).

Tracton, A. A. Coatings technology handbook. New York: CRC press, (2005).

Trinetta, V., Cutter, C. & Floros, J. Effects of ingredient composition on optical and mechanical properties of pullulan film for food-packaging applications. *LWT-Food Science and Technology* **44**, 2296-2301 (2011).

Trinetta, V., Floros, J. D. & Cutter, C. N. Sakacin a - containing pullulan film: An active packaging system to control epidemic clones of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. *Journal of Food Safety* **30(2)**, 366-381 (2010).

Ueda, S., Momii, F., Osajima, K. & Ito, K. Extracellular polysaccharide produced by strain No. 626 of *Aeromonas hydrophila*. *Agricultural and Biological Chemistry* **45**, 1977-1981 (1981).

Umaraw, P. & Verma, A. K. Comprehensive review on application of edible film on meat and meat products: An eco-friendly approach. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-44 (2015).

Uretimi, D. Production of dextran by newly isolated strains of *Leuconostoc mesenteroides* PCSIR-4 and PCSIR-9. *Turkish Journal of Biochemistry* **31**, 21-26 (2005).

Valencia-Chamorro, S. A., Palou, L., del Rio, M. A. & Perez-Gago, M. B. Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **51(9)**, 872-900 (2011).

Venugopal, V. Marine polysaccharide:Food application. United states of America: CRC Press, (2011).

Wang, Y. *et al.* Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers* **82(3)**, 895-903, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.013 (2010).

Wu, J., Zhong, F., Li, Y., Shoemaker, C. & Xia, W. Preparation and characterization of pullulan–chitosan and pullulan–carboxymethyl chitosan blended films. *Food Hydrocolloids* **30**, 82-91 (2013).

Wu, S., Chen, H., Jin, Z. & Tong, Q. Effect of two-stage temperature on pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **26(4)**, 737-741 (2010).

Wu, S., Jin, Z., Tong, Q. & Chen, H. Sweet potato: A novel substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers* **76(4)**, 645-649 (2009).

Xu, S., Chen, X. & Sun, D. W. Preservation of kiwifruit coated with an edible film at ambient temperature. *Journal of Food Engineering* **50**, 211-216 (2001).

Yadav, K. L., Rahi, D. K. & Soni, S. K. Bioemulsifying potential of exopolysaccharide produced by an indigenous species of *Aureobasidium pullulans* RYLF10. *PeerJ PrePrints* **2**, 1-13 (2014).

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

Yurlova, N., De-Hoog, G. & Van-Den-Ende, A. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology*, 63-69 (1999).

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

Zalar, P. *et al.* Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology* **61**, 21-38 (2008).

Zamora, F. *et al.* Thermodegradation and thermal transitions of an exopolysaccharide produced by *Pediococcus damnosus* 2.6. *Journal of Macromolecular Science* **41(3)**, 473-486 (2002).

Zhu, G., Sheng, L. & Tong, Q. Preparation and characterization of carboxymethyl-gellan and pullulan blend films. *Food Hydrocolloids* **35**, 341-347 (2014).

ปรมาภรณ์ เกิดทรัพย์. การผลิตและการเก็บรักษาฟิล์มบริโภคได้จากโปรตีนละลายน้ำจากปลาทรายแดง. ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2545).

เพ็ญนภา มานิตย์โชติพิสิฐ. ลักษณะสมบัติของ *Aureobasidium pullulans* ไอโซเลต บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับเบสหลายตำแหน่ง และความสัมพันธ์ระหว่างแอลฟาอะไมเลสแอคติวิตีกับแบบแผนพูลลูแลน. ปริญญาดุษฎีบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2551).

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. มาตรฐานถุงพลาสติกสำหรับบรรจุอาหารเลขที่ 1027-2553. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. กระทรวงอุตสาหกรรม: (2553).

วิชชุดา วิไลรัศมี. เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแล็กติกแอซิดแบคทีเรียและการประยุกต์ในน้ำสลัด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2555).

สมฤดี ชุณหโรจน์ฤทธิ์. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์และลักษณะสมบัติของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2551).

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งยีสต์มอลต์ (YM)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
สารสกัดจากข้าวมอลต์ (Malt extract)	3	กรัม
แบคโตเพปโตน (Bactopeptone)	5	กรัม
กลูโคส (glucose)	10	กรัม
วุ้นผง (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.5

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามสูตรของ (Youssef และคณะ, 1999)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	0.4	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	1	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	0.6	กรัม
ซูโครส (sucrose)	50	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับระดับความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5.5

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

หมายเหตุ ถ้าเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ใส่ผงวุ้น 20.0 กรัมต่อลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 โมลาร์

กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 10 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

3. สารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ฟีนอล	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4. สารละลายคูแมสซีบลู

ชั่งสารละลายคูแมสซี่บลู จี 250 1000 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกรดฟอสฟอริก 85 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้เป็น 1000 มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.01 นอร์มัล

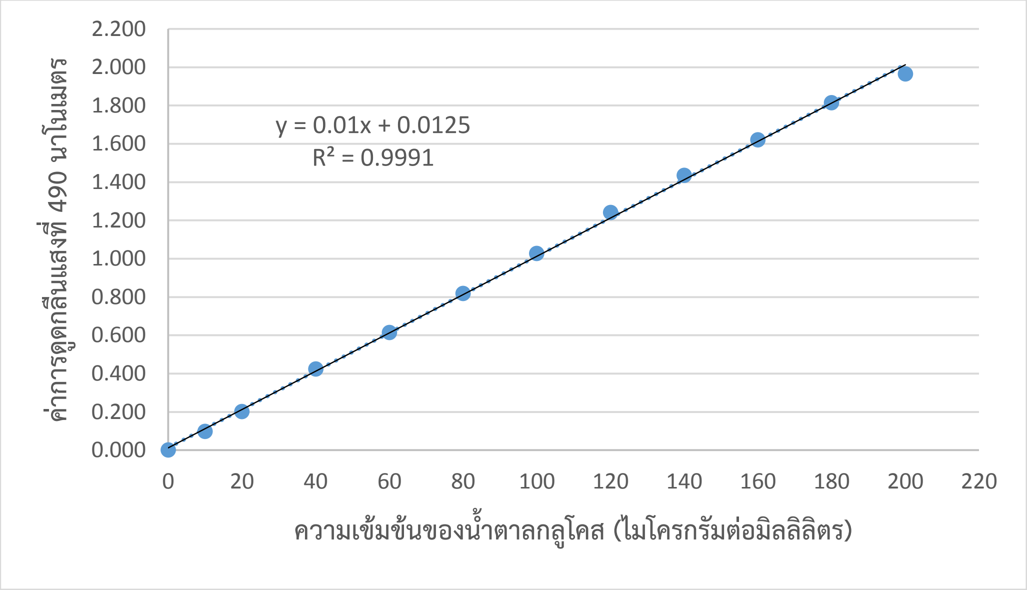
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.004	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

6. สารละลายซิทิลไพริดิเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ซิทิลไพริดิเนียมคลอไรด์	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

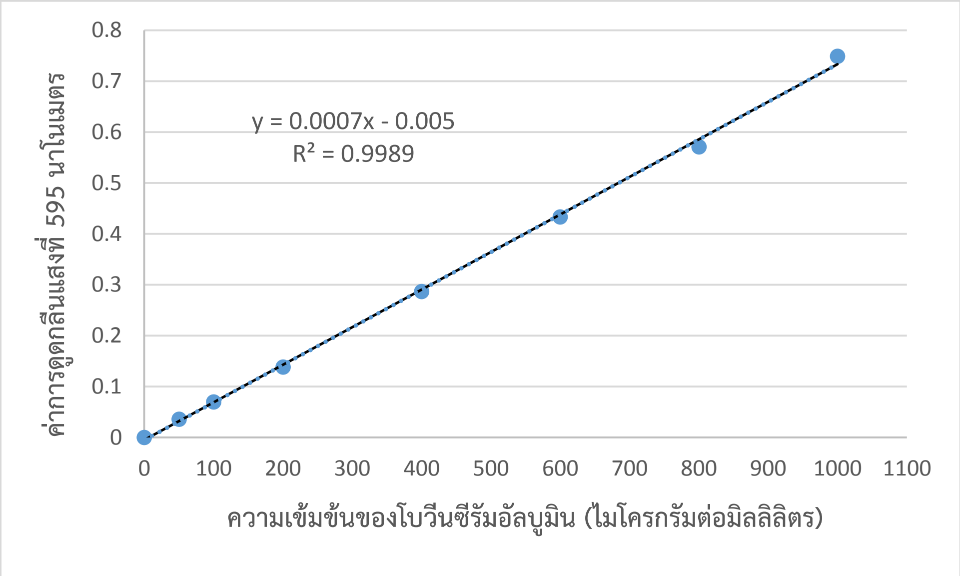
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์โดยวิธี Phenol-Sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2. กราฟมาตรฐานโปรตีนวิเคราะห์โดยวิธี Protein Dye Binding (Bradford, 1976)



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ศุภิศา เอกเผ่าพันธุ์ เกิดวันศุกร์ที่ 8 มีนาคม 2534 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ จบการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง (เหรียญทอง) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2555 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2556

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ ในงาน The 27th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference Innovative Biotechnology ระหว่างวันที่ 17-20 พฤศจิกายน 2558 ณ โรงแรมแมนดาริน จังหวัดกรุงเทพฯ ในหัวข้อเรื่อง “Production, characterization and film formation of exopolysaccharides from Aureobasidium pullulans YTP6-14” (Proceeding)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University