

ภาวะของการผลิตไบโอพอลิเมอร์จาก *Aureobasidium pullulans*

นายพงษ์ศักดิ์ ละไมพิศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-579-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**PRODUCTION CONDITIONS OF BIOPOLYMER FROM
*AUREOBASIDIUM PULLULANS***

Mr. Pongsak Lamaipis

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Botany

Department of Botany

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1997


ISBN 974-638-579-8

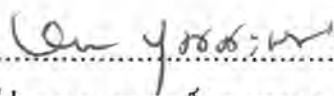
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ภาวะของการผลิตไบโอพอลิเมอร์จาก *Aureobasidium pullulans*
โดย นายพงษ์ศักดิ์ ละไมพิศ
สาขาวิชา พฤษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.हररษา ปุณณะพยัคฆ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

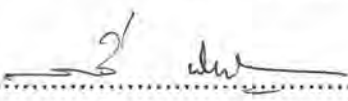

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุภวัฒน์ ชุตินวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.हररษา ปุณณะพยัคฆ์)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ)


.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิษญากร)

พงษ์ศักดิ์ ละไมพิศ : ภาวะของการผลิตไบโอโพลิเมอร์จาก *Aureobasidium pullulans*
(PRODUCTION CONDITIONS OF BIOPOLYMER FROM *AUREOBASIDIUM PULLULANS*) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ھرรณา ปุณณะพยัคฆ์ ;
107 หน้า. ISBN 974-638-579-8.

Aureobasidium pullulans ที่เลือกใช้สำหรับการวิจัยคือ สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร PDB ที่อุณหภูมิ 30°C พบรูปร่างหลายแบบจาก 2 สายพันธุ์ ประกอบด้วย รูปร่างแบบบลาสโตสปอร์ (blastospore) คลาไมโดสปอร์ (chlamydospore) เซลล์พอง (swollen cell) และรูปร่างแบบเส้นใย (hyphae) การสร้างเม็ดสีเมลานินจะเกิดขึ้นภายในเซลล์ และหลังออกภายนอกเซลล์ พบการสร้างเม็ดสีเมลานินเฉพาะสายพันธุ์ ATCC 42023 แต่ไม่พบกับสายพันธุ์ NRRL 6992 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อสีของเม็ดสีที่เกิดขึ้น โดยเม็ดสีเหลืองจะเกิดขึ้นเมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ หรือ NH_4NO_3 เป็นแหล่งไนโตรเจนแต่จะเปลี่ยนเป็นเม็ดสีดำเมื่อใช้ปิบ โคนเป็นแหล่งไนโตรเจน

ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอโพลิเมอร์พุลลูแลนจาก *Aureobasidium pullulans* สายพันธุ์ NRRL 6992 พบว่า ให้ผลผลิตสูงสุด 0.310 กรัม/กรัมของแหล่งคาร์บอน เมื่อระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 6.5 ที่อุณหภูมิ 30°C โดยมีจุโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณผลผลิตต่ำกว่าสายพันธุ์ ATCC 42023 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งให้ผลผลิตพุลลูแลนสูงสุด 0.520 กรัม/กรัมของแหล่งคาร์บอน เมื่อระดับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 6.5 ที่อุณหภูมิ 30°C โดยมีจุโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

การศึกษาเปรียบเทียบการสลายตัวของพุลลูแลนบนผิวดินเป็นเวลานาน 9 วัน พบว่า พุลลูแลนที่ผลิตจากสายพันธุ์ NRRL 6992 มีการสลายตัวได้ดีกว่าพุลลูแลนที่ผลิตจากสายพันธุ์ ATCC 42023

ภาควิชา พฤษศาสตร์
สาขาวิชา พฤษศาสตร์
ปีการศึกษา 2540

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C825693 : MAJOR BOTANY

KEY WORD: *Aureobasidium pullulans* / PULLULAN / YEAST LIKE FUNGI

PONGSAK LAMAIPIS: PRODUCTION CONDITIONS OF BIOPOLYMER FROM
AUREOBASIDIUM PULLULANS. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. HUNSA
PUNNAPAYAK, Ph.D. 107 pp. ISBN 974-638-579-8.

Two strains of *Aureobasidium pullulans*, NRRL 6992 and ATCC 42023, were selected for the investigation. Both exhibited pleomorphic natures of the yeast comprising of blastospores, chlamydospores, swollen cells and hyphae. The ATCC 42023 strain produced melanin pigments inside the cell and excreted outside while the NRRL 6992 did not produce the melanin. Nitrogen sources have some influences on the melanin production. Yellow pigments occurred when either $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or NH_4NO_3 was used as a nitrogen source. Black pigments were produced when peptone was used instead. The optimized conditions for the production of pullulan biopolymer from both strains were found to be at 30°C , pH 6.5, with sucrose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ as the preferred carbon and nitrogen sources, respectively. The pullulan yield from ATCC 42023 was significantly higher (0.52 g/g C-source) than NRRL 6992 (0.31 g/g C-source). Comparison of the degradation of pullulan sticks prepared from each strain under natural environments revealed that the NRRL 6992 polymer sticks were naturally degraded more rapidly than the others.

ภาควิชา.....BOTANY.....

สาขาวิชา.....BOTANY.....

ปีการศึกษา.....2540.....

ลายมือชื่อนิสิต.....P. Lamaipis.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....Hansa Punpayak.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ในปี พ.ศ. 2539 และ 2540

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างสมบูรณ์ โดยได้รับความช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งจากอาจารย์ที่ปรึกษาผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ปริดา บุญ-หลง ที่กรุณาเป็นประธานสอบวิทยานิพนธ์ และตรวจแก้วิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ และรองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบ และตรวจแก้วิทยานิพนธ์

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทรงศักดิ์ สำราญสุข ที่ได้กรุณาสละเวลาเพื่อให้ความรู้และคำปรึกษาเกี่ยวกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และเทคนิคการถ่ายภาพ

ขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาพฤกษศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกๆ คนที่ได้ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกๆ คนที่ได้ให้กำลังใจและความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย และพี่สาว ที่ได้ให้กำลังใจและช่วยเหลือสนับสนุนเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ฉ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	14
3. ผลการทดลอง.....	18
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	88
5. สรุปผลการทดลอง.....	93
รายการอ้างอิง.....	95
ภาคผนวก.....	100
ประวัติผู้เขียน.....	107

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของจำนวนเซลล์ <i>A. pullulans</i> 2 สายพันธุ์ที่เจริญเติบโตในอาหารสูตร PDB.....	19
2	ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023.....	30
3	ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพอลิกลูแลน (ก./ก.ของแหล่งคาร์บอน) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023.....	31
4	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก./100 มล.) ในวันที่ 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อ <i>A. pullulans</i> ด้วยระดับ pH เริ่มต้นต่างๆ.....	32
5	ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023.....	43
6	ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการผลิตพอลิกลูแลน (ก./ก.ของแหล่งคาร์บอน) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023.....	44
7	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก./100 มล.) ในวันที่ 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อ <i>A. pullulans</i> ด้วยอุณหภูมิในการบ่มระดับต่างๆ.....	45
8	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023.....	56
9	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพอลิกลูแลน (ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023.....	57
10	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก./100 มล.) ในวันที่ 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อ <i>A. pullulans</i> ด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ.....	58
11	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (มก./มล.) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023.....	69
12	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตพอลิกลูแลน (ก./ก. ของแหล่งคาร์บอน) ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 และ ATCC 42023.....	70
13	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ (มก./100 มล.) ในวันที่ 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อ <i>A. pullulans</i> ด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ.....	71

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	กลไกการสังเคราะห์พอลิกลูแลนของเชื้อ <i>A. pullulans</i>	3
2	โครงสร้างพอลิกลูแลน.....	5
3	กราฟมาตรฐานแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992.....	20
4	กราฟมาตรฐานแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023.....	21
5	ลักษณะเซลล์แบบบลาสโตสปอร์ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992.....	22
6	ลักษณะเซลล์แบบคลาไมโดสปอร์ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992.....	22
7	การสืบพันธุ์แบบแตกหน่อของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992.....	23
8	ลักษณะเซลล์แบบเซลล์พองของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992.....	24
9	ลักษณะเซลล์แบบเส้นใยของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992.....	25
10	ลักษณะเซลล์แบบบลาสโตสปอร์ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023.....	25
11	การสืบพันธุ์แบบแตกหน่อของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023.....	26
12	ลักษณะเซลล์แบบคลาไมโดสปอร์ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023.....	26
13	ลักษณะเซลล์แบบเซลล์พองของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023.....	27
14	ลักษณะเซลล์แบบเส้นใยของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023.....	27
15	ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992	33
16	ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023	34
17	ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพอลิกลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992.....	35
18	ผลของระดับ pH เริ่มต้นต่อการผลิตพอลิกลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 6992	36
19	ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพอลิกลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 ด้วยระดับ pH เริ่มต้นต่างๆ.....	37

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
20	ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 ด้วยระดับ pH เริ่มต้นต่างๆ..... 38
21	การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 ที่ pH เริ่มต้นระดับต่าง ๆ..... 39
22	แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 ที่ pH เริ่มต้นระดับต่าง ๆ..... 40
23	ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการผลิตเซลล์แห้งของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992..... 46
24	ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการผลิตเซลล์แห้งของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023..... 47
25	ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992..... 48
26	ผลของระดับอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023..... 49
27	ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 ในอุณหภูมิระดับต่างๆ..... 50
28	ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 ในอุณหภูมิระดับต่างๆ..... 51
29	การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ..... 52
30	แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ..... 53
31	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992..... 59
32	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023..... 60

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
33	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992..... 61
34	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 62
35	ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุลลูแลน ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ..... 63
36	ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุลลูแลน ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 ในแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ..... 64
37	แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 ด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ..... 65
38	แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 ด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ..... 66
39	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992..... 72
40	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 73
41	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992..... 74
42	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 75
43	ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุลลูแลน ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 ในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ..... 76
44	ผลการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ระหว่างการผลิตพุลลูแลน ของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 ในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ..... 77
45	การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 ในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ..... 78

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
46	แสดงการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารระหว่างการผลิตพุลลูแลนของ <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ ATCC 42023 ในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ..... 79
47	การสลายตัวของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 บนผิวดินในธรรมชาติเป็นเวลา 9 วัน..... 81
48	การสลายตัวของไบโอพอลิเมอร์ที่ผลิตจาก <i>A. pullulans</i> สายพันธุ์ NRRL 6992 บนผิวดินในธรรมชาติเป็นเวลา 9 วัน..... 82
49	โครงสร้างพุลลูแลนมาตรฐานวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Infrared spectrophotometer..... 84
50	โครงสร้างพุลลูแลนจากสายพันธุ์ NRRL 6992 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Infrared spectrophotometer..... 85
51	โครงสร้างพุลลูแลนจากสายพันธุ์ ATCC 42023 วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Infrared spectrophotometer..... 86
52	โครงสร้างทางเคมีของหมู่ฟังก์ชันน้ำตาล..... 87