การผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 ด้วยอาหารที่มีแทนนินเป็นองค์ประกอบ

THE PRODUCTION OF BETA-GLUCAN FROM YEAST *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 BY TANNIN CONTAINING MEDIUM

ณัฐพร โชติกาวินทร์

NATTHAPORN CHOTIGAVIN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-AI-M-053-297

การผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 ด้วยอาหารที่มีแทนนินเป็นองค์ประกอบ

THE PRODUCTION OF BETA-GLUCAN FROM YEAST *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 BY TANNIN CONTAINING MEDIUM

ณัฐพร โชติกาวินทร์

NATTHAPORN CHOTIGAVIN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2561

KMITL-2018-AI-M-053-297

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE PRODUCTION OF BETA-GLUCAN FROM YEAST *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 BY TANNIN CONTAINING MEDIUM

NATTHAPORN CHOTIGAVIN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2018

KMITL-2018-AI-M-053-297

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2018

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 ด้วยอาหารที่มีแทนนินเป็นองค์ประกอบ

THE PRODUCTION OF BETA-GLUCAN FROM YEAST *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 BY TANNIN CONTAINING MEDIUM

ชื่อนักศึกษา นางสาวณัฐพร โชติกาวินทร์

รหัสประจำตัว 59608027

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ	
ผศ.ดร.อังคณา วิภาตนาวิน	
ดร.ปนัดดา นนทนำ	
ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น	

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ มิถุนายน 2561 เวลา 09.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 303 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่.....เดือน...มิถุนายน...พ.ศ...2561...

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตบีตากลูแคนจาก *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 ด้วยอาหารที่มีแทนนินเป็นองค์ประกอบ
นักศึกษา	นางสาวณัฐพร โชติกาวินทร์
รหัสประจำตัว	59608027
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
พ. ศ.	2561
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาการผลิตบีตากลูแคนของยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 ที่ถูกกระตุ้นด้วยแทนนินในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ผนังเซลล์ยีสต์ทดสอบโดยการย้อมเซลล์ยีสต์ด้วย Congo red พบว่ายีสต์ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนินติดสีของ Congo red เข้มกว่ายีสต์ที่เจริญในอาหาร YM เวลาในการเพาะเลี้ยงที่ทำให้ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินมีค่าสูงที่สุด คือ 36 ชั่วโมง ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.97 กรัม/ลิตร ปริมาณบีตากลูแคน 119.47 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และเมื่อคำนวณผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์ (Yp/x) มีค่าสูงกว่ายีสต์ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมแทนนิน 1.2 เท่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ในถังหมักแบบกะที่ระดับการผลิต 5 ลิตร พบว่าสภาวะการหมักที่ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm มีการเจริญของเชื้อและผลิตบีตากลูแคนสูงที่สุด คือที่ 36 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์ 2.24×10^8 CFU/มิลลิลิตร และปริมาณบีตากลูแคน 181.94 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สูงที่สุด คือ 0.40 h^{-1} แต่ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μmax) สูงที่สุด คือ 8.96 h^{-1} เมื่อเปรียบเทียบปริมาณบีตากลูแคนระหว่างยีสต์ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมแทนนินและเติมแทนนิน ที่สภาวะการหมักที่ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm พบว่าเมื่อมีการเติมแทนนินทำให้ได้ปริมาณบีตากลูแคนสูงกว่า 237 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ และนอกจากนี้ยังช่วยให้มีการผลิตบีตากลูแคนที่เสถียรไม่ลดลงเมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง บีตากลูแคนที่ผลิตได้จาก *S. carlsbergensis* RU01 ถูกสกัดด้วยวิธี Alkaline extraction และนำไปทำให้บริสุทธิ์(บางส่วน) โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟี คือ DEAE-Toyopearl และ Concavalin A พบว่าปริมาณบีตากลูแคนที่ได้จากเซลล์ยีสต์ที่มีการกระตุ้นด้วยแทนนินมีปริมาณเท่ากับ 52.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักของเซลล์ ซึ่งได้มากกว่ายีสต์ที่เจริญในอาหารที่ไม่เติมแทนนิน 4.2 เท่า โครงสร้างบีตากลูแคนที่ได้จากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU 01 เมื่อศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ exo-1,3 β-glucanase หรือ exo-1,6 β-glucanase ต่อบีตากลูแคนที่สกัดได้พบว่า ส่วนใหญ่มีโครงสร้างเป็นพันธะแบบ 1,3 β-glucan มากกว่า 1,6 β-glucan ซึ่งสรุปได้ว่าบีตากลูแคนของเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 นั้นมีอัตราส่วนของพันธะบีตา 1,3 และมีกิ่งก้านที่เชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา 1,6 ไกลโคซิดิก เท่ากับ 4:1 จากอัตราส่วนนี้พบว่าสายบีตา 1,3 เป็นโครงสร้างหลักและมีกิ่งก้านที่เชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา 1,6 จะช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ดีขึ้น และจากการออกแบบการทดลองแบบผิวสัมผัส โดยใช้การวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) พบว่าความเข้มข้นของอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล 5%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.17%(w/v) และแทนนิน 0.30%(w/v) น่าจะทำให้การผลิตปริมาณเซลล์และปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุด เพราะฉะนั้นควรใช้ในการปริมาณนี้ในการทดลองต่อไป

คำสำคัญ : บีตากลูแคน, ยีสต์, *Saccharomyces carlsbergensis* RU01, กากน้ำตาล, แทนนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	The production of beta-glucan from yeast *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 by tannin containing medium
Student	Miss Natthaporn Chotigavin
Student ID.	59608027
Degree	Master of Science
Program	Food Science
Year	2018
Thesis Advisor	Dr. Wiramsri Sripochanart

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate beta-glucan production of *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 which stimulated by tannin in molasses medium. The carbohydrate content in yeast cell walls was detected by Congo red staining. Yeast grown in the molasses medium with tannin showed higher intensity than yeast grown in YM medium. The maximum biomass and beta-glucan production was 3.97 g/L and 119.47 mg/g of cell dry weight, respectively at 36 hours which was an optimum time. Yeast grown in the molasses medium with tannin was higher beta-glucan yield 1.2 folds than control. *S. carlsbergensis* RU01 was cultured in stirred tank fermenter by using 5 litre of the molasses medium. The result showed that 400 rpm and 1 vvm was the highest biomass beta-glucan production and specific growth rate was 2.24×10^8 CFU/ml, 181.94 mg/g of cell dry weight and 0.40 h^{-1}, respectively at 36 hours. The highest maximum specific growth rate (μmax) was 8.96 h^{-1} which a 400 rpm and 0.5 vvm. When comparison the biomass and beta-glucan production in fermenter at 400 rpm and 1 vvm between yeast grown in the molasses medium with tannin and without tannin the result showed that yeast grown in the molasses medium with tannin was higher beta-glucan production than control and was a stability beta-glucan production. . Beta-glucan from *S. carlsbergensis* RU01 was extracted by alkaline extraction and further purified by DEAE-Toyopearl and Conavalin A chromatography for removed protein and mannan from beta-glucan. the result showed that yeast grown in the molasses medium with tannin was higher beta-glucan production than control 4.2 folds. The beta-glucan from *S. carlsbergensis* RU01 was linked by 1,3 β-glucan more than 1,6 β-glucan which can improve immune systems. Central composite design (CCD) was used for experimental design. The optimization analysis found that the optimum

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

concentration of substrates for the highest biomass and beta-glucan production was 3% (w/v) of molasses 0.1% (w/v) of ammonium sulfate and 0.1% (w/v) of tannin which should be used this concentration in further experiments.

Keywords: β-Glucan, Yeast, *Saccharomyces carlsbergensis* RU01, Molasses, Tannin

.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยคำแนะนำจาก ดร. วิรามศรี ศรีพจนารถ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น ที่กรุณาให้คำปรึกษาเสนอแนะแนวทางการวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งได้รับคำแนะนำเพิ่มเติมจาก ผศ.ดร.อังคณา วิภาตนาวิน และ ดร. ปนัดดา นนทนำ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากอาจารย์ทุกท่าน และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ พี่ น้อง และเพื่อน ทีมวิจัย เพื่อนนักศึกษาปริญญาโทวิทยาศาสตร์การอาหาร รวมทั้งเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมการเกษตรทุกท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการทำวิจัยนี้เสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจทำให้ข้าพเจ้าทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จ คุณค่าและประโยชน์ที่ได้จาก วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

ณัฐพร โชติกาวินทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	X
สารบัญภาพ	XII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 บีตากลูแคน	3
2.1.1 โครงสร้างทางเคมีของบีตากลูแคน	3
2.1.2 ชนิดของบีตากลูแคน	5
2.1.3 การนำบีตากลูแคนจากยีสต์ไปใช้ประโยชน์	9
2.2 ยีสต์	12
2.2.1 ลักษณะการเจริญของยีสต์	13
2.2.2 สภาพแวดล้อมและสารอาหารในการเจริญ	14
2.3 ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis*	16
2.4 กากน้ำตาล	16
2.4.1 การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาล	17
2.5 แทนนิน	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 20

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการทดลอง..... 24

3.1 เชื้อจุลินทรีย์..... 24

3.2 สารเคมี..... 24

3.3 อุปกรณ์..... 25

3.4 สถานที่ทำการทดลอง..... 25

3.5 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง..... 25

3.6 วิธีการดำเนินงาน..... 25

3.6.1 การเลี้ยงเชื้อ *S. carlsbergensis* RU01..... 25

3.6.2 การทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01..... 26

3.6.3 การเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ระหว่างอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% และไม่เติมแทนนิน..... 26

3.6.4 การย้อมเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ด้วย Congo red..... 26

3.6.5 การเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตากลูแคน..... 27

3.6.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิธี DNS..... 27

3.6.7 การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคน..... 27

3.6.8 การสกัดบีตากลูแคนและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01..... 28

3.6.9 การศึกษาลักษณะสมบัติของบีตากลูแคนที่เตรียมได้..... 29

3.6.10 การศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01..... 29

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

4.1 ศึกษาความเข้มของการติดสี Congo red ที่บริเวณผนังเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 32

4.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 33

4.3 ผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินและไม่มีแทนนิน 34

4.4 ผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ในสภาพวิธีการหมักแบบกะ ที่ระดับการผลิต 5 ลิตร 37

4.5 ผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 เปรียบเทียบระหว่างในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินและไม่มีแทนนิน ในสภาพวิธีการหมักแบบกะ ที่ระดับการผลิต 5 ลิตร 42

4.6 ผลการสกัดบีตากลูแคนและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 44

4.7 การศึกษาโครงสร้างของบีตากลูแคนที่ได้จากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 46

4.8 การศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาล แอมโมเนียมซัลเฟตและแทนนินในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่ทำให้มีการเจริญและผลิตบีตากลูแคนสูงที่สุด 46

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 57

5.1 สรุปผลการทดลอง 57

5.2 ข้อเสนอแนะ 60

บรรณานุกรม 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	79
ภาคผนวก ก-1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt medium (YM).....	79
ภาคผนวก ก-2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจามจุรี.....	79
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี.....	81
ภาคผนวก ข-1 การเตรียมซิเตรทเมทิลลีนไวโอเลต.....	81
ภาคผนวก ข-2 การเตรียมสารเคมีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid Method(DNS).....	81
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์.....	82
ภาคผนวก ค-1 การตรวจนับเซลล์ยีสต์โดยใช้ฮีมาไซโตรมิเตอร์.....	82
ภาคผนวก ค-2 การหาความเข้มข้นของเซลล์.....	83
ภาคผนวก ค-3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	86
ภาคผนวก ค-4 การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคน.....	87
ประวัติผู้เขียน.....	89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ปริมาณบีตากลูแคนจากแหล่งต่างๆ ที่วิเคราะห์โดยวิธีทางเอนไซม์.....	3
2.2	บีตากลูแคนที่มีโครงสร้างแตกต่างกันจากแหล่งที่มาต่างๆ.....	4
2.3	องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*.....	6
2.4	องค์ประกอบของกากน้ำตาล.....	17
3.1	ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3.2	ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD).....	31
4.1	ผลของอัตราการเจริญจำเพาะ(μ) อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด(μmax) และผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์(Yp/x).....	38
4.2	แสดงปริมาณกลูแคนที่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	45
4.3	แสดงสัดส่วนของบีตา 1,3/1,6 กลูแคน ของเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01.....	46
4.4	การเก็บข้อมูลของ Central Composite Design สำหรับอาหารที่ความเข้มข้นต่างๆกับปริมาณเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 และปริมาณบีตากลูแคน.....	48
4.5	การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	49
4.6	การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคน....	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	**50**
4.8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคน.....	**51**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*.....	5
2.2	ทิศทางและตำแหน่งการจับกันของโมเลกุลบีตาดีกลูโคสด้วยพันธะบีตา 1,3 และบีตา 1,6 ในผนังเซลล์ยีสต์.....	7
2.3	โครงสร้างของบีตากลูแคนในธัญพืช.....	8
2.4	รูปร่างยีสต์ และโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์.....	13
2.5	กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ.....	14
2.6	กากน้ำตาล.....	16
2.7	โครงสร้างของแทนนิน.....	18
4.1	แสดงการติดสีของ Congo red ของเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01.....	33
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่เวลาต่างๆในอาหารกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบของแทนนิน 0.1 %.....	34
4.3	ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง เปรียบเทียบในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินและไม่มีแทนนิน.....	35
4.4	ปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ S. carlsbergensis RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง เปรียบเทียบในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินและไม่มีแทนนิน.....	36
4.5	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์ของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง เปรียบเทียบในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่มีแทนนินและอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนิน.....	36
4.6	ปริมาณเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ในถังหมักปริมาตร 7 ลิตร.....	38
4.7	ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ในถังหมักปริมาตร 7 ลิตร.....	40
4.8	ปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง ในถังหมักแบบกะที่ระดับการผลิต 5 ลิตร.....	42
4.9	ปริมาณเชื้อและปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะที่ระดับการผลิต 5 ลิตร ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เปรียบเทียบระหว่างอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% และไม่เติมแทนนิน.....	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.10	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์ของยีสต์ S. carlsbergensis RU01 ที่การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะที่ระดับการผลิต 5 ลิตร ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เปรียบเทียบระหว่างอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% และไม่เติมแทนนิน.....	**44**
4.11	พื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นแทนนิน 0.3% (w/v)...	**52**
4.12	พื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกากน้ำตาลและแทนนิน ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.17% (w/v)	**53**
4.13	พื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตและแทนนิน ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% (w/v).....	**53**
4.14	พื้นผิวตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้ระหว่างกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นแทนนิน 0.3% (w/v).....	**54**
4.15	พื้นผิวตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้ระหว่างกากน้ำตาลและแทนนิน ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.17% (w/v).....	**55**
4.16	พื้นผิวตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้ระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตและแทนนิน ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% (w/v).....	**55**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

บีตากลูแคน (β-glucan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก สกัดได้จากเห็ด ผนังเซลล์ของยีสต์ ราเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์ บีตากลูแคนเป็นไฮโดรคอลลอยด์ ไม่ละลายในน้ำแต่ดูดน้ำได้ดี ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร บีตากลูแคนถูกใช้เป็นสารเติมแต่งอาหาร สารเพิ่มความหนืด อิมัลซิไฟเออร์ เป็นอาหารฟังก์ชั่นและเป็นเส้นใยอาหารที่เป็นพรีไบโอติกช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ บีตากลูแคนเป็นสารที่ยอมรับทั่วไปว่าปลอดภัยและยังมีคุณสมบัติทางการแพทย์ในการรักษาโรคมะเร็งและเนื้องอกอย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีการนำบีตากลูแคนมาใช้รักษามะเร็งหลายชนิดและลดผลข้างเคียงของเคมีบำบัด เช่น การฉายแสง และยังมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันต่อต้านเนื้อเยื่อ เช่น รูมาตอยด์ บีตากลูแคนจากยีสต์เป็นแหล่งหนึ่งที่มีการผลิตที่มากในอุตสาหกรรม ซึ่งสารบีตากลูแคนเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ โดยถ้ายีสต์ถูกรบกวนจากสารเคมี เช่น แทนนิน จะมีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อป้องกันสารเคมีเหล่านั้น โดยผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมีองค์ประกอบของกรดไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้น จากแนวคิดนี้จึงมีการนำยีสต์มากระตุ้นให้มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณของบีตากลูแคน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาผลของแทนนินต่อการเจริญและการผลิตบีตากลูแคนของยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

1.2.2 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 ในสภาพวิธีการหมักแบบกะที่ระดับการผลิต 5 ลิตร

1.2.3 ศึกษาโครงสร้างทางเคมีกายภาพของบีตากลูแคนที่ผลิตได้จากยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

1.2.4 ทำนายสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ทำให้มีการเจริญและผลิตบีตากลูแคนสูงที่สุดสำหรับเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นถึงการกระตุ้นการสร้างบีตากลูแคนจาก *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 โดยแทนนินลงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและ สร้างสภาวะอัตราการให้อากาศในถังหมักขนาด 7 ลิตร และศึกษาคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ เช่น โครงสร้างของ บีตากลูแคนจาก *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 และทำนายสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ทำให้มีการผลิตบีตากลูแคนจาก *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 สูงสุด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ทราบถึงสารเคมีคือแทนนินที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างบีตากลูแคน

1.4.2 ได้ทราบความเร็งรอบในการกวนและอัตราการให้อากาศที่ทำให้มีการเจริญและการผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 สูงที่สุดในระดับถังหมัก

1.4.3 ได้ทราบโครงสร้างทางเคมีกายภาพของบีตากลูแคนที่ผลิตได้จากยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารและยา

1.4.4 ได้ทราบความเข้มข้นของอาหารที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01ในสภาวะที่มีแทนนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 บีตากลูแคน (Beta-Glucan, β-Glucan)

บีตากลูแคนจัดเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ มีหน่วยย่อย คือ ดีกลูโคส (D-glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตาไกลโคซิดิก (β-glycosidic bond) บีตากลูแคนสามารถพบได้หลากหลายในธรรมชาติ เช่น ยีสต์ เห็ด แบคทีเรีย สาหร่าย ข้าวบาร์เลย์ และ ข้าวโอ๊ต (Zhu และคณะ, 2015) ซึ่งแต่ละแหล่งมีปริมาณบีตากลูแคนแตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณบีตากลูแคนจากแหล่งต่างๆ ที่วิเคราะห์โดยวิธีทางเอนไซม์

แหล่งที่มา	ปริมาณบีตากลูแคน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
บีตากลูแคนมาตรฐาน Lot 90201a	66.80
Saccharomyces cerevisiae	60.00
บีตากลูแคนจากข้าวบาร์เลย์ Lot 90801a	97.60
สเคลอโรกลูแคน (Scleroglucan) ของ Actigum CS11	89.10
เคิร์ดแลน (Curdlan) Lot 60201a	97.40
แพไคแมน (Pachyman) Lot 10301a	86.60
ลามินาลิน (Laminarin) จาก *Eisenia arborea* หรือ Tokyo Kasei	89.70
อัลฟาเซลลูโลส (α-cellulose)	9.60
เอวิเซล (Avicel)	14.50
แป้งชนิดละลายได้ (Soluble starch) ของ Sigma Chemical	0.34
ไกลโคเจน ประเภท II (Glycogen Type II) ของ Sigma G-8751	0.27

ที่มา : Megazyme, 2011; The National Innovation Agency, 2005

2.1.1 โครงสร้างทางเคมีของบีตากลูแคน

บีตากลูแคนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ยีสต์ สาหร่าย เห็ด แบคทีเรีย จะมีโครงสร้างที่แตกต่างกันตามแหล่งที่มา เช่น เป็นสายสั้นหรือสายยาว มีแขนงหรือไม่มีแขนง หรือสมบัติทางเคมี เช่น ละลายน้ำได้หรือเป็นอนุภาค (ไม่ละลายน้ำ) เป็นต้น (Stone และ Clarke, 1992;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stone. 2009) ตารางที่ 2.2 แสดงชนิดของบีตากลูแคนตามแหล่งที่มา จะส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพและผลต่อหน้าที่ทางชีวภาพของบีตากลูแคน (Ensley และคณะ, 1994; Yan และคณะ, 2005; Barsanti และคณะ, 2011) เช่น งานวิจัยของ Akramiene และคณะ (2007) พบว่าบีตากลูแคนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ มีฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้ผลิตสารต้านจุลินทรีย์และกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ในส่วนของบีตากลูแคนที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ มีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ แต่ในส่วนของการทดสอบกับเซลล์ยังไม่แน่ชัด ส่วนบีตากลูแคนสายสั้นๆ เช่น laminarin โดยทั่วไปไม่ออกฤทธิ์

ตารางที่ 2.2 บีตากลูแคนที่มีโครงสร้างแตกต่างกันจากแหล่งที่มาต่างๆ

ชนิดบีตากลูแคน	แหล่งที่มา	ชื่อเรียก
(1,3)-β-glucans (linear, homogeneous)	- *Alcaligenes faecalis* - *Euglena gracilis* - *Poria cocos* - *Vitis vinifera*	curdlan paramylon callose laricinan
(1,3),(1,6)-β-glucans (linear with (1,6) - linked β-glucosyl side branches)	- *Laminaria* sp. - *Claviceps purpurea* - *Sclerotinia sclerotiorum*	laminarin wall glucan wall glucan
(1,3),(1,6)-β-glucans (linear with (1,6) - linked β-glucosyl or β-gentobiosyl	- *Eisenia bicyclis* - *Schizophyllum commune*	laminarin wall glucan
(1,3),(1,6)-β-glucans (branch on branch)	- *Saccharomyces cerevisiae* - *Schizophyllum commune*	cell wall glucan
(1,3),(1,4)-β-glucans (linear)	- ธัญพืช - *Cetraria islandica*	β-glucans lichenin
(1,3),(1,4)-β-glucans (linear with (1,4)-linked β-glucosyl side branches)	เห็ดนางรม	wall glucan

ที่มา : Stone และ Clarke (1992)

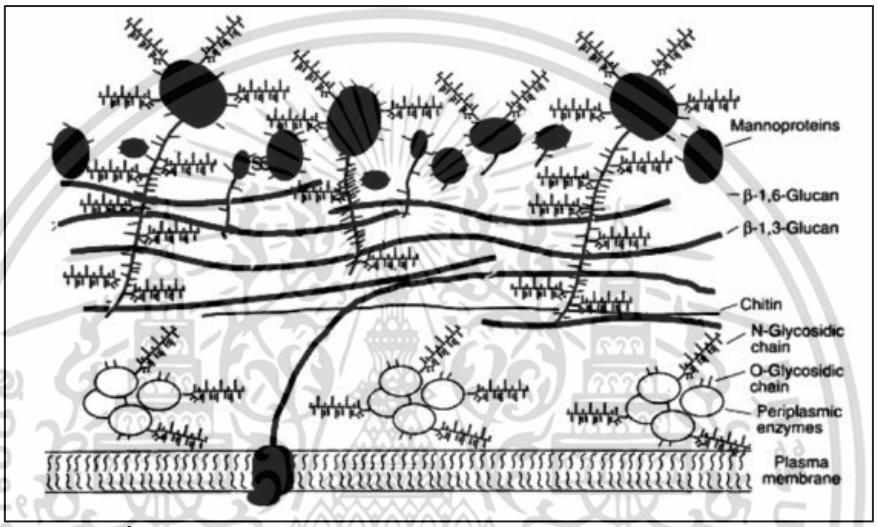
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ชนิดของบีตากลูแคน

แบ่งประเภทของบีตากลูแคนตามแหล่งที่พบหลัก ๆ ได้ดังนี้

1. บีตากลูแคนจากยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในทางอาหาร และเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น ขนมอบชนิดต่างๆ เหล้า เบียร์ ไวน์ เป็นต้น เช่น *Saccharomyces cerevisiae* หรือ ยีสต์ขนมปัง บีตากลูแคนจากยีสต์เป็นโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสเรียงต่อกันเป็นเส้นยาว ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ยีสต์ แสดงดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : Osumi (1998)

Uscanga และ Francois (2003) ศึกษาองค์ประกอบของพอลิแซ็กคาไรด์ของผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* แบ่งพอลิแซ็กคาไรด์บนผนังเซลล์ยีสต์ออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ แมนโน-โปรตีน บีตากลูแคน และไคติน โดยผนังเซลล์ชั้นในประกอบด้วยบีตากลูแคนเป็นหลัก ส่วนผนังเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วยแมนโนโปรตีน (Cabib, 1997) ซึ่งสัดส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์จะเปลี่ยนแปลงตามสายพันธุ์ของยีสต์ สภาวะในการเจริญ รวมถึงปริมาณออกซิเจนและสารอาหาร (Mcmurrough และ Rose, 1967) ตารางที่ 2.3 แสดงถึงองค์ประกอบและสัดส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์บนผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

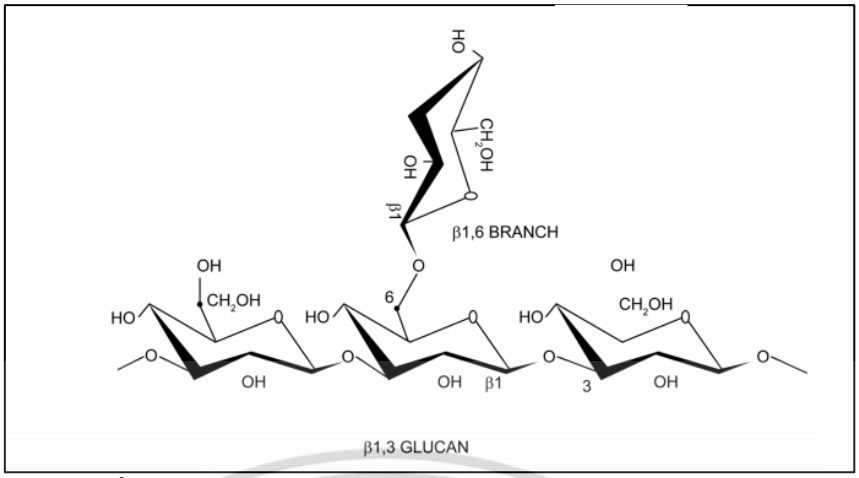
ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

องค์ประกอบ	ปริมาณ (% น้ำหนักเซลล์แห้ง)
(1,3)-β-D-glucan	50-55
(1,6)-β-D-glucan	5-10
Mannoprotein complex	35-40
Chitin	2

ที่มา : Kath และ Kulicke (1999); Klis และคณะ (2002); Lessage และ Bussey (2006); Kwiatkowski และคณะ (2009)

บีตากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์มีโครงสร้างการเรียงตัวสายหลักที่ต่อกันด้วยพันธะ 1,3 และมีสายแขนงไปด้านข้างด้วยพันธะ 1,6 กล่าวคือ คาร์บอนตัวที่ 1 ของกลูโคสตัวตั้งต้นจับกับคาร์บอนตัวที่ 3 ของกลูโคสตัวถัดไปต่อกันเป็นสายยาวซึ่งเป็นสายหลัก และมีสายแตกแขนงออกไปด้านข้าง โดยที่คาร์บอนตัวที่ 1 ของสายแขนงนั้นมาจับกับคาร์บอนตัวที่ 6 ของสายหลัก เรียกโครงสร้างแบบนี้ว่า 1,3/1,6 กลูแคน ดังภาพที่ 2.2 บีตากลูแคนที่ผนังเซลล์ยีสต์เริ่มสร้างขึ้นในขณะที่เกิดการแตกหน่อของยีสต์โดยเอนไซม์กลูแคนซินเธเทส (Glucansynthetase enzyme) ซึ่งพบที่เยื่อหุ้มพลาสมาในขณะที่มีการแตกหน่อ (Shematek และคณะ, 1980) สำหรับการสังเคราะห์บีตา 1,6 กลูแคนนั้น สร้างขึ้นหลังจากสร้างบีตา 1,3 กลูแคนที่เยื่อหุ้มพลาสมาโดยอาจมีบีตา 1,3 กลูแคนเป็นตัวตั้งต้น (Roh และคณะ, 2002) จากการศึกษาของ Shahinian และคณะ (1998) ศึกษาการดัดแปลงโครงสร้างของ N-linked chain ส่งผลต่อปริมาณของบีตา 1,6 กลูแคนที่ผนังเซลล์ พบว่า N-linked chain กับบีตา 1,6 กลูแคนมีความสัมพันธ์กัน แมนโนโปรตีนที่อยู่ส่วนนอกของผนังเซลล์จะผ่านการตัดแต่งโดยการเติมหมู่ไกลโคซิลฟอสฟาทิดิลอินโนซิทอล แล้วจึงเกิดพันธะไกลโคซิดิกกับบีตา 1,6 กลูแคน จากนั้นโครงสร้างที่ได้จะเชื่อมกับบีตา 1,3 กลูแคนเพื่อสร้างเป็นโครงข่ายของผนังเซลล์ต่อไป (Kapteyn และคณะ, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 ทิศทางและตำแหน่งการจับกันของโมเลกุลบีตาดีกลูโคส
ด้วยพันธะบีตา 1,3 และบีตา 1,6 ในผนังเซลล์ยีสต์
ที่มา : Stone และ Clarke (1992)

บีตา 1,3 กลูแคน มีความสำคัญคือเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางกลและโครงสร้างของผนังเซลล์ของยีสต์ สำหรับบีตา 1,6 กลูแคน ทำหน้าที่เชื่อมแต่ละองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ เช่น เชื่อมแมนโนโปรตีนกับผนังเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนซ์ (Manner และคณะ, 1973; Kollar และคณะ, 1997) และเนื่องจากบีตา 1,3 กลูแคนเชื่อมโยงกับไคตินและแมนโนโปรตีน จึงทำให้บีตากลูแคนที่ได้จากผนังเซลล์ยีสต์มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (Varelas และคณะ, 2016) การผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์มีวิธีที่หลากหลาย โดยต้องคำนึงถึงผลได้และประสิทธิภาพสูงที่สุด Lee และคณะ (2001) ทำบริสุทธิ์บีตากลูแคนที่ละลายน้ำได้จากผนังเซลล์ยีสต์ โดยสกัดขั้นตอนแรกด้วยด่างและทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และ ConA chromatography บีตากลูแคนที่ได้ปราศจากโปรตีนและละลายได้ที่พีเอชเป็นกลาง

2. บีตากลูแคนจากเห็ด

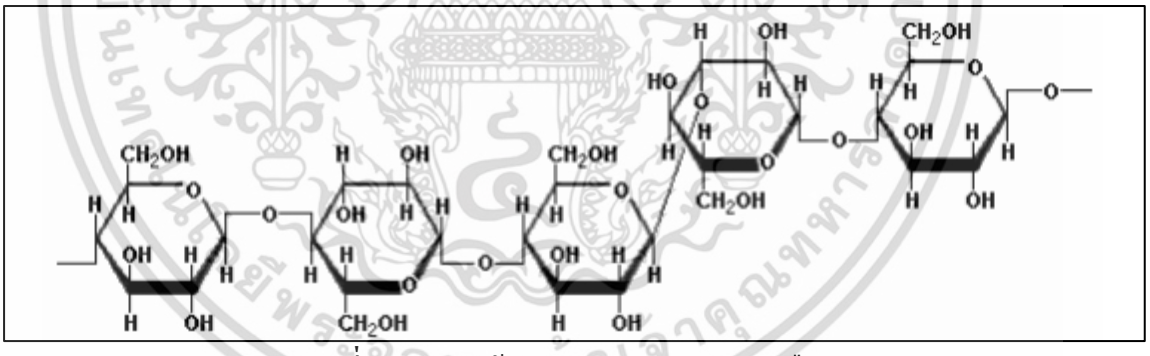
เห็ดอยู่ในอาณาจักรฟังไจที่อุดมไปด้วยสารประกอบทางชีวภาพมากมาย เช่น พอลิ-แซ็กคาร์ไรด์ โปรตีน เลคติน และโพลิฟีนอล (Volman และคณะ, 2010) บีตากลูแคนสามารถสกัดได้จากเห็ดหลายชนิด เช่น เห็ดหอม เห็ดไมตาเกะ เห็ดแครง เป็นต้น เนื่องจากเห็ดเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำและช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ดังนั้นเห็ดจึงถูกนำมาใช้เป็นอาหารและผลิตเป็นยา (Mizuno, 1996; Zhang และคณะ, 2005) โครงสร้างของเห็ดโดยทั่วไปประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ชั้นนอกประกอบด้วยกลูแคนที่ละลายน้ำได้ มีลักษณะเป็นเมือก ส่วนถัดไปคือ เนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย Alkaline-soluble glucan (α-(1,3)-glucan) และชั้นในสุดประกอบด้วยส่วนที่เป็น Alkaline-insoluble glucan (β-(1,3)-glucan) และไคติน (Pramanik, 2005) วิธีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายได้จากเห็ดนิยมใช้วิธีการสกัดด้วยน้ำร้อน (Yan และคณะ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2005) มีงานวิจัยจาก The University of Strathclyde (2003) บันทึกว่าบีตากลูแคนจากเห็ดมีคุณสมบัติโดยตรงในการเป็นตัวทำลายเซลล์มะเร็ง Wasser (2002) ได้ใช้บีตากลูแคนชนิดเลนติแนน (lentinan) สกัดจากเห็ดหอม นำมาทดสอบในผู้ป่วยและสัตว์ทดลองที่เป็นมะเร็ง พบว่าเมื่อให้เลติแนนควบคู่กับการทำเคมีบำบัด ทำให้ผู้ป่วยและสัตว์ทดลองมีอายุนานขึ้นและก้อนมะเร็งมีขนาดเล็กลง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Nemoto และคณะ (1993) นักวิจัยชาวญี่ปุ่นได้ทดลองใช้บีตากลูแคนจากเห็ด เรียกว่า OL-2 กับหนู เพื่อศึกษา Specific immune response รวมทั้งเม็ดโลหิตขาว Tumor necrosis factor และเซลล์ของไขกระดูก รวมทั้งตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันอื่นๆ และพบว่า OL-2 สามารถกระตุ้น Non-specific host defense mechanisms โดยเข้าไปช่วยตอบรับของ Hematopoietic stem cell

3. บีตากลูแคนจากธัญพืช

พืชบางชนิด เช่น ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์ พบว่า บีตากลูแคนของธัญพืชเหล่านี้มีพันธะ 1,4 เป็นสายหลักและ 1,3 เป็นสายแขนง แสดงภาพโครงสร้างดังรูที่ 2.3 การผลิตบีตากลูแคนจากธัญพืช นิยมใช้วิธีการสกัดด้วยวิธีใช้น้ำร้อนและด่าง แยกโปรตีนออกจากผนังเซลล์ด้วยการตกตะกอนด้วยจุดไอโซอิเล็กทริค และแยกบีตากลูแคนออกด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, 2-propanol หรือเอทานอล (Wood และคณะ, 1978)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของบีตากลูแคนในธัญพืช

ที่มา : Michaela และคณะ (2011)

การเสริมภูมิคุ้มกันของบีตากลูแคนในธัญพืชกำลังเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์ การสกัดบีตากลูแคนจากธัญพืชนั้นทำได้ยากกว่าแหล่งอื่น ๆ ทำให้บีตากลูแคนที่ได้จากธัญพืชนั้นมีราคาสูง บีตากลูแคนในข้าวโอ๊ตเมื่อรวมกับน้ำในระบบทางเดินอาหาร จะกลายเป็นเจลในลำไส้เล็กซึ่งจะช่วยดูดซึมน้ำดี ทำให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง นอกจากนี้บีตากลูแคนยังถูกย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่จนได้กรดโพรพิโอนิกซึ่งเป็นกรดไขมันสายสั้นที่สามารถยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลได้ (Daou และ Zhang. 2012) Estrada และคณะ (1997) ใช้บีตากลูแคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่สกัดจากข้าวโอ๊ต โดยหนูได้รับเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยได้รับบีตากลูแคนเพียงครั้งเดียว 3 วันก่อนฉีดเข้าตัวหนู พบว่าบีตากลูแคนมีความสามารถในการทำงานโดยเป็น Immunomodulatory ในการทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันทั้งใน Vitro และ Vivo

นอกจากนี้ยังสามารถพบบีตากลูแคนได้จากแหล่งอื่น ๆ เช่น ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่าย และพืชอื่น ๆ เป็นต้น Stack และคณะ (2010) ศึกษาบีตากลูแคนจากแบคทีเรีย *Lactobacillus paracasei* NEBC 338 โดยใช้เอนไซม์ไกลโคซิลทรานเฟอเรส (Glycosyltransferase) ซึ่งนำบีตากลูแคนที่ได้ไปใช้เป็นโพรไบโอติก Yoshida และคณะ (2014) ทำการสกัดบีตากลูแคนจากข้าวโพดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริก Vetvicka และคณะ (2007) สกัดและทำบริสุทธิ์บีตากลูแคนจากสาหร่ายสีน้ำตาล *Laminaria digitate* ด้วยการสกัดด้วยน้ำร้อน โดยบีตากลูแคนจากแหล่งที่แตกต่างกันจะมีน้ำหนักโมเลกุล สมบัติทางเคมีกายภาพและฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกัน (Du และคณะ, 2014) เช่น บีตากลูแคนจากเชื้อรา (Fungal) มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและยับยั้งการเกิดมะเร็ง (Du และคณะ, 2015) ส่วนบีตากลูแคนจากธัญพืชช่วยลดคอเลสเตอรอลและระดับน้ำตาลในเลือด (Zhu และคณะ, 2015) เป็นต้น

2.1.3 การนำบีตากลูแคนจากยีสต์ไปใช้ประโยชน์

บีตากลูแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ของกลูโคสที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งโปรคาริโอตและยูคาริโอต และถูกนำไปใช้หลากหลายทางด้านยา, เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมเคมี ตลอดจนอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์ (Zekovic และคณะ, 2005; Laroche และ Michaud, 2007) ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าบีตากลูแคนที่สกัดจากยีสต์มีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ (Chanchaichaovivat, 2010)

1. การประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และอุตสาหกรรมยา

ในทางการแพทย์มีงานวิจัยแสดงหลักฐานจากการทดสอบในระดับสัตว์ทดลองและมนุษย์แสดงให้เห็นได้ว่าบีตากลูแคนจัดเป็น “Biological Immune Modifiers” สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ (Miura และคณะ, 1996) ซึ่งมีการศึกษามากขึ้นเนื่องจากปลอดภัยและออกฤทธิ์กระตุ้นการตอบสนองของร่างกายที่มีต่อการอักเสบติดเชื้อ (Biological Response Modifier ; BRM) (Bohn และBeMiller ปี 1995 ; Gardiner ปี 2000) บีตากลูแคนจากยีสต์สามารถลดอาการเจ็บป่วยและรักษาโรคสำคัญได้ เช่น ลดปริมาณเซลล์มะเร็งและเนื้องอก (Diluzio,1983; Laroche และ Michaud, 2007; Novak และ Vetvicka, 2007) Wakui และคณะ (1986) พบว่าบีตากลูแคนเป็นตัวเสริมสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้บำบัดผู้ป่วยได้เป็นอย่างดี (Chemotherapy) ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะอาหารและมะเร็งลำไส้ใหญ่ที่มีอาการระดับรุนแรง บีตากลูแคนช่วยลดการติดเชื้อหลังผ่าตัด (Dellinger และคณะ, 1999; Demir และคณะ, 2007; Hong และคณะ, 2004) Babineau และคณะ (1994)ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บีตากลูแคนในการควบคุมการติดเชื้อในผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดที่เสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง เช่นเดียวกับ Dellinger และคณะ (1999) ทดลองใช้กับผู้ป่วยลำไส้ใหญ่ที่ได้รับการผ่าตัด โดยให้บีตากลูแคนอัตราส่วน 0 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่าเมื่อผ่านไป 30 วัน สามารถลดอัตราการติดเชื้อได้ 39% หลังการผ่าตัด Onderdonk และคณะ (1992) ศึกษาบีตากลูแคนที่สกัดจากยีสต์ พบว่าสามารถลดการเกิดการติดเชื้อในเลือดหรือเนื้อเยื่อได้ โดยทดลองกับหนูที่ได้รับเชื้อ *E. coli* หรือ *S. aureus* ไม่พบอาการใดๆหลังฉีดบีตากลูแคน 4-6 ชั่วโมง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Keynodle และคณะ (1998) ทดลองฉีดบีตากลูแคนจากยีสต์ในหนูตะเภา ก่อนที่จะฉีดเชื้อ *S. aureus* เข้าไปในตัวหนู และมีงานวิจัยอีกมากมายที่ใช้บีตากลูแคนจากยีสต์ในการป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรีย (Onderdonk และคณะ, 1992; Tzianabos และคณะ, 1998) นอกจากนี้บีตากลูแคนยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และสามารถรักษาบาดแผลได้ (Wagner และคณะ, 1988; Adachi และคณะ, 1990; Hong และคณะ, 2004; Salvador และคณะ, 2008) รายงานจาก EFSA NDA Panel (Dietetic Products, Nutrition and Allergies) พบว่าบีตากลูแคนสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในกระแสโลหิต แต่ไม่ได้ลดน้ำหนักร่างกาย และมีแนวโน้มในการศึกษานำบีตากลูแคนจากยีสต์มาใช้ป้องกันการติดเชื้อไวรัสไข้หวัดใหญ่ (Fuller, 2010)

บีตากลูแคนสามารถผ่านกระเพาะอาหาร และสามารถทนกรดได้ เอนไซม์ในลำไส้จะย่อยโมเลกุลของบีตากลูแคนและดูดซึมที่ผนังลำไส้ ซึ่งในร่างกายมนุษย์จะมีตัวรับและโปรตีนที่จำเพาะกับบีตากลูแคน (Ross และคณะ, 1999) Vetvicka และคณะ (2007) ได้ค้นพบตัวรับ (Receptors) บนพื้นผิวของ Innate immune cells ที่เรียกว่า Complement Receptor 3 (CR3) ซึ่งทำหน้าที่รับผิดชอบต่อการเกาะติดของบีตากลูแคน แต่บีตากลูแคนส่วนมากมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำมีผลทำให้เกิดข้อจำกัดในการใช้งานในมนุษย์ เช่น เกิดการติดเชื้อ การอักเสบ (Novak และ Vetvicka, 2008) ทั้งตากลูแคนชนิดละลายและไมละลาย สามารถใช้งานได้ในการแพทย์ ซึ่งการเตรียมบีตากลูแคนให้มีขนาดเล็กจะทำให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุดต่อการนำไปใช้ (Vetvicka และคณะ, 2002)

2. การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง บีตากลูแคนใช้ช่วยในเรื่องการชะลอความแก่ และช่วยเพิ่มความชุ่มชื่นในผิวหนัง โดยอยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ครีมและโลชั่น (Wheatcroft และคณะ, 2002) บีตากลูแคนช่วยปกป้องผิวหนังจากการติดเชื้อ และรักษาบาดแผลได้ สามารถป้องกันผลกระทบจากรังสี นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ antioxidant ปกป้องอนุมูลอิสระ (Takahashi และคณะ, 1978; Patchen และคณะ, 1987) บีตากลูแคนสามารถใช้เป็นสารให้ความชุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื้นได้ และสามารถใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวในเครื่องสำอางที่ทำให้เกิดเจล ปรับปรุงเนื้อสัมผัส (Gardiner, 2000)

3. การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

บีตากลูแคนชนิดที่ละลายน้ำได้และละลายไม่ได้จากยีสต์ขนมปังและบริวเวอร์ยีสต์ได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากใช้ต้นทุนต่ำในการผลิตและให้มูลค่าสูง (Worrasinchai และคณะ, 2006) และปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Generally Recognized As Safe; GRAS) (Hobson และ Greenshields, 1996)

บีตากลูแคนถูกนำมาใช้ประโยชน์โดยนำมาผสมในอาหารประเภทต่าง ๆมากขึ้น เช่น ผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่ม ขนมอบและอาหารเสริมสุขภาพ เป็นต้น บีตากลูแคนที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ มีประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นสารเพิ่มความข้นหนืดในอาหารหรือสารทดแทนไขมันหรือใช้เป็นอาหารเสริม (Sucher และคณะ, 1975; Douaud, 2007; Lee และคณะ, 2009) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำ อิมัลชัน และไฟเบอร์ (Thammakiti และคณะ, 2004; Laroche และ Michaud, 2007) Seeley, 1997 ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติของยีสต์ขนมปังที่แยกโปรตีนออกแล้ว ยีสต์สกัด และบีตากลูแคนเมื่อนำไปใช้ในอาหาร พบว่าบีตากลูแคนที่แยกออกมาจากยีสต์มีคุณสมบัติในการดูดซับและให้ความหนืดได้ดีกว่ายีสต์แห้งหรือส่วนประกอบอื่นของยีสต์ (Generally Recognized As Safe; GRAS) (Hobson และ Greenshields, 1996)

บีตากลูแคนที่ได้จากยีสต์ขนมปังหรือบริวเวอร์ยีสต์สามารถใช้ผลิตเป็นน้ำสลัด ซอสโยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์นม และสารเติมแต่งในเค้กได้ (Seeley, 1997; Read และ Nagodawithana, 1991) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติช่วยอุ้มน้ำจึงนำไปประยุกต์ใช้ได้ในไส้กรอกและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อื่นๆ (Thammakiti และคณะ, 2004) Marinescu และคณะ (2011) ผลิตมายองเนสโดยใช้บีตากลูแคนจากบริวเวอร์ยีสต์ทดแทนไขมัน พบว่ามายองเนสที่ใส่บีตากลูแคนมีปริมาณน้ำสูงกว่าที่ไม่ใส่บีตากลูแคน ให้แคลอรี่ที่ต่ำกว่า และเก็บได้นานยิ่งขึ้นอย่างต่ำ 63 วัน ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส และ 91 วันที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Araujo และคณะ (2013) ที่ประยุกต์ใช้บีตากลูแคนและแมนโนโปรตีนแทนสารให้ความคงตัวในมายองเนส Kittisuban และคณะ (2014) เปรียบเทียบผลของ Hydroxypropyl methylcellulose บีตากลูแคนจากยีสต์ และเวย์โปรตีน ต่อคุณสมบัติทางกายภาพของขนมปังที่ไม่มีกลูเตน พบว่าบีตากลูแคนจากยีสต์ได้ผลเป็นที่ยอมรับในการทดลองประสาทสัมผัสทางอาหาร เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Quirce และคณะ (2018) ซึ่งศึกษาผลของ (1⟶3)(1⟶6)-β-glucan ต่อคุณสมบัติทางกายภาพของขนมปังที่ไม่มีกลูเตน พบว่าคุณสมบัติเชิงรีโอโลยีของโดขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของบีตากลูแคน และการเพิ่ม

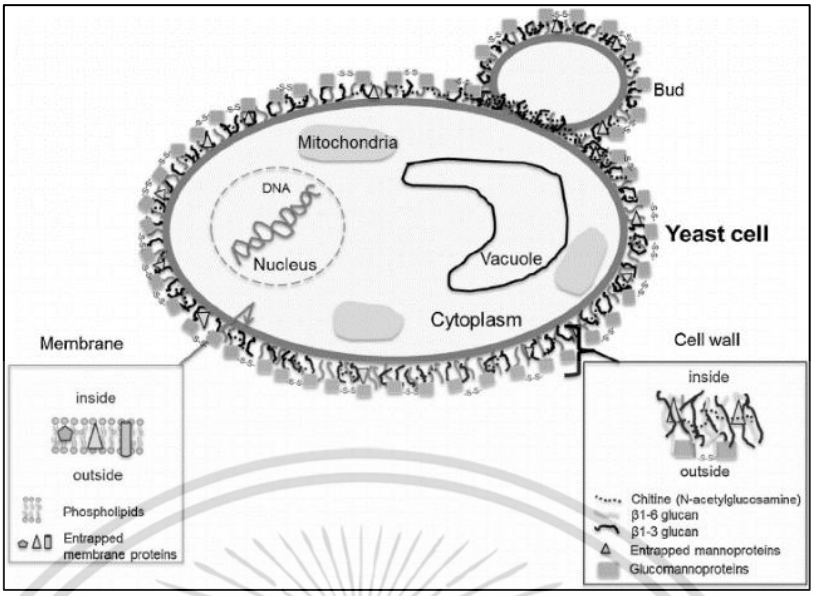
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณบีตากลูแคนจะช่วยเพิ่มคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของขนมปัง Raikos และคณะ (2018) ใช้บีตากลูแคนที่ได้จากบริวเวอร์ยีสต์แทนสารเพิ่มความหนืดในโยเกิร์ต พบว่าเมื่อใส่บีตากลูแคนปริมาณ 0.8 %(w/w) ได้รับการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัส นอกจากนี้เนื่องจากบีตากลูแคนมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรคอลลอยด์ (Thammakiti และคณะ, 2004) จึงมีการนำบีตากลูแคนมาช่วยปรับปรุงคุณสมบัติการเกิดเจลและการคืนตัวของแป้งข้าวเจ้า ซึ่งพบว่าบีตากลูแคนช่วยเพิ่มความหนืดให้กับแป้งและช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเจล (Banchathanakij และ Suphantharika, 2009)

2.2 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอต อยู่ในอาณาจักรฟังไจซึ่งเป็นอาณาจักรเดียวกับรา เป็นเซลล์เดี่ยวรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 5 ไมครอน (สาวิตรี, 2540) เซลล์ยีสต์หนึ่งเซลล์มีปริมาตรประมาณ 40 ลูกบาศก์ไมโครเมตร และมีน้ำหนักแห้งประมาณ 1×10^{-10} กรัมโดยเฉลี่ย โดยทั่วไปสามารถแบ่งส่วนประกอบของเซลล์ยีสต์ได้ 2 ส่วนหลักๆ ได้แก่ ส่วนของผนังเซลล์ และส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ ได้แก่ นิวเคลียสและไซโตพลาสซึม โดยประมาณ 75% น้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ยีสต์เป็นสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (Kogan และ Kocher. 2007) ผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ชั้น คือ ชั้นในทำหน้าที่กำหนดรูปร่างและโครงสร้างของเซลล์ ประกอบด้วยบีตา 1,3 กลูแคน (β-1,3 glucan) บีตา 1,6 กลูแคน (β-1,6 glucan) และไคติน และโครงสร้างชั้นนอกประกอบด้วยแมนแนน ที่เกาะอยู่กับโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนท์ เรียกว่า แมนโนโปรตีน ทั้งนี้องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ยังขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์(Cabib, 1997; Uscanga และ Francois ,2003) ส่วนเซลล์เมมเบรนเป็นส่วนที่ล้อมรอบเซลล์ยีสต์โดยอยู่ถัดจากผนังเซลล์ชั้นนอกเข้ามา โดยมีหน้าที่หลักคือรักษาสมดุลเซลล์ยีสต์ และทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2549) โดยรูปร่างลักษณะของยีสต์แสดงดังภาพที่ 2.4 หลายทศวรรษที่ผ่านมาผนังเซลล์ยีสต์ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมทั้งสำหรับคนและสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S. cerevisiae* ซึ่งผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration, FDA) ว่าสามารถใช้เติมลงไปในอาหารสัตว์ได้อย่างปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) (Hobson และ Greenshields, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 รูปร่างยีสต์ และโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์

ที่มา : Thabet และคณะ (2013)

ยีสต์ส่วนใหญ่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ ซึ่งยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces* และ *Pichia* จะแตกหน่อแบบ Multipolar budding คือการแตกหน่อที่เกิดขึ้นได้ทุกส่วนของเซลล์ และมียีสต์บางชนิดที่แตกหน่อที่ขั้วเซลล์เท่านั้น (Polar budding) เช่น *Pityrosporum* (Walker, 1998)

2.2.1 ลักษณะการเจริญของยีสต์

พบว่ายีสต์ส่วนใหญ่เพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการแตกหน่อ พบจำนวนน้อยที่จะเกิดการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองด้วยวิธีฟิชชัน (Fission) ปกติการเพิ่มจำนวนของเชื้อจะเกิดในสภาวะที่เหมาะสมเท่านั้น เช่นเดียวกับยีสต์ *S. cerevisiae* หากเจริญในอาหารที่เหมาะสมเพียงพอก็จะสามารถเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าได้ภายในเวลาสั้น ๆ แต่ถ้าอาการหมด ยีสต์จะเข้าสู่ระยะที่ไม่มีการแตกหน่อแต่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ (สาวิตรี, 2549)

การเจริญของยีสต์ที่มีการเพาะเลี้ยงในระบบปิดที่มีการใส่อาหารเพียงครั้งเดียวตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (Batch culture) จะมีการเจริญแบบ sigmoid curve (ภาพที่ 2.5) ซึ่งมีการเจริญแบ่งออกเป็นกว้าง ๆได้ 4 ระยะ (สมจิตร, 2552) ได้แก่

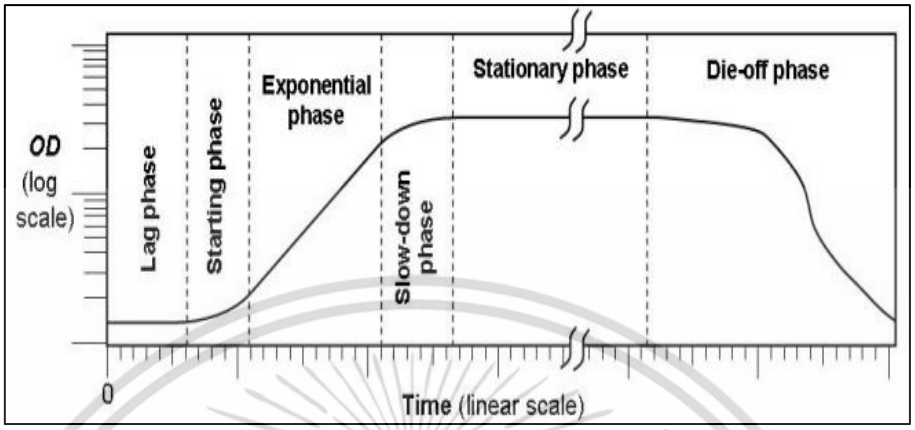
1. Lag phase เป็นระยะเริ่มต้นในการเจริญของเชื้อ โดยเชื้อจะปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่และเตรียมพร้อมในการแบ่งเซลล์

2. Log phase (Exponential phase) เชื้อเข้าสู่ระยะที่มีการเจริญอย่างรวดเร็ว โดยอัตราการเติบโต อาจมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดจุลินทรีย์ สารอาหาร และสภาพแวดล้อม

3. Stationary phase .ในระยะนี้สารอาหารเริ่มมีปริมาณจำกัด ปริมาณออกซิเจนน้อยลง สภาพแวดล้อมเริ่มไม่เหมาะสมกับการเจริญ เกิดการสะสมสารพิษ ทำให้เชื้อมีการเจริญลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Decline phase อัตราการตายของเชื้อเพิ่มขึ้นเนื่องจากขาดแคลนสารอาหาร และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมกับการเจริญ



ภาพที่ 2.5 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ

ที่มา : Widdel (2010)

ลักษณะการเจริญของโคโลนียีสต์บนอาหารที่ปรากฏ ส่วนใหญ่มีสีขาว ครีมและชมพู หากโคโลนีมีอายุน้อยจะมีลักษณะเป็นเมือกชื้น หากมีอายุมากขึ้นจะมีลักษณะเปลี่ยนไป เช่น เริ่มแห้ง และมีการย่นของโคโลนี แบ่งประเภทของยีสต์จากการเจริญบนอาหารเหลวได้สองประเภท คือ ยีสต์ชนิดออกซิเดทีฟจะเจริญอยู่เฉพาะผิวของอาหารเหลว เรียกว่า ฟิล์มยีสต์ แต่พวกเฟอร์เมนเททีฟจะเจริญในทุกส่วนของอาหาร (สุมาลี, 2541) การตรวจสอบสัณฐานวิทยาของยีสต์เพื่อระบุสายพันธุ์อาจใช้วิธีการศึกษาลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี ผิวหน้าโคโลนี ความนูนของโคโลนี และขอบของโคโลนี เป็นต้น (ธวัชชัย, 2549)

2.2.2 สภาพแวดล้อมและสารอาหารในการเจริญของยีสต์

ยีสต์ต้องการความชื้นในการเจริญน้อยกว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ แต่มากกว่ารา เจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูง สามารถจำแนกยีสต์ได้ 2 พวกตามความต้องการความชื้นของยีสต์ ได้แก่ พวกยีสต์ทั่วไป ที่ต้องการความชื้นสูง วอเตอร์แอคทิวิตี้ขั้นต่ำอยู่ระหว่าง 0.88 ถึง 0.94 เช่น ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์ และยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมปัง ในขณะที่ยีสต์ออสโมฟีลิก จะเจริญอย่างช้าๆในอาหารที่มีความเข้มข้นสูง เช่น น้ำเชื่อม ที่มีค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ 0.78 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ คือ 25-35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เจริญได้สูงที่สุดคือ 35-47 องศาเซลเซียส ยีสต์เจริญได้ดีในสภาวะกรด และมีออกซิเจน (สุมาลี, 2541)

น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่ดีที่สุดของยีสต์ และใช้ไนโตรเจนในการช่วยในการเจริญ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย กรดอะมิโน จนถึงโพลีเปปไทด์ (สุมาลี, 2541) ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ไดแซ็กคาไรด์พวกมอลโทส ซูโคส หรือ แลกโทสได้ ส่วนโพลิแซ็กคาไรด์ที่ยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บางชนิดใช้ได้ คือ แป้ง ยีสต์ที่สามารถใช้แป้งได้ เช่น *S. diastaticus, S. chevalieri, Endomycopsis fibuligera* มียีสต์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถให้น้ำตาลเพนโทสได้ดีกว่าน้ำตาลเฮกโซส เช่น *Cryptococcus* ยีสต์บางพวก เช่น ฟิล์มยีสต์สามารถใช้กรดอินทรีย์ได้ ยีสต์มีกระบวนการไกลโคลไลติก 2 กระบวนการ คือ สภาพที่ไม่มีออกซิเจนยีสต์จะใช้กระบวนการเอมบ์เดน เมเยอร์ฮอฟพาร์นาส (EMP) ถึง 90 % ใน *S. cerevisiae* และ *Candida utilis* ส่วนในสภาพมีออกซิเจนนอกจากกระบวนการเอมบ์เดนเมเยอร์ฮอฟพาร์นาสใน *S. cerevisiae* จะใช้กระบวนการเฮกโซส มอนอฟอสเฟต 6-30 % และใน *C. utilis* 30-50% ในสภาพไม่มีออกซิเจนน้ำตาลจะเข้าสู่กระบวนการหมักได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งการหมักให้ได้เอทานอลนี้ไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในสภาพไม่มีออกซิเจนเท่านั้น อาจเกิดขึ้นได้เมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงแม้อยู่ในสภาพที่มีออกซิเจนทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลูโคสที่มีความเข้มข้นมากกว่า 5 % จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการหายใจ แต่ถ้าหากไม่มีน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเป็นการกระตุ้นหรือเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในวัฏจักรเครบส์ นอกจากนี้การมีน้ำตาลยังยับยั้งการสร้าง ไมโทคอนเดรียอีกด้วย ในสภาพมีออกซิเจนและความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ ๆ ยีสต์จะใช้น้ำตาลไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำหรือเกิดกระบวนการหายใจเช่นเดียวกับในพืชและสัตว์ (สาวิตรี 2549; ธวัชชัย, 2549)

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกเฟคัลเททีฟ แอนแอโรบ แต่ยีสต์เติบโตในสภาพมีออกซิเจนได้ดี ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนเติบโตได้ช้ากว่าในสภาพมีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาล โดยการออกซิเดชันโดยสมบูรณ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาล โดยการหมักส่วนใหญ่เป็นการให้เอทานอล ในการหมักโดยยีสต์ให้ได้เอทานอลนั้น หากมีออกซิเจนยีสต์จะใช้น้ำตาลให้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แทนการหมักให้เอทานอล หรือการหมักถูกยับยั้งโดยการหายใจเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Pasteur effect ยกเว้นในยีสต์บางชนิด ได้แก่ *Brettanomyces* ซึ่งออกซิเจนช่วยกระตุ้นการหมัก (Negative Pasteur effect) ในสภาพมีออกซิเจนแต่ถ้าหากมีน้ำตาลความเข้มสูง ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลให้เอทานอลแทนการหายใจให้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ หรือการหายใจถูกยับยั้งด้วยการหมัก (Reverse Pasteur effect, Crabtree effect) ยีสต์บางชนิดสามารถเติบโตได้เฉพาะในสภาพมีออกซิเจนไม่มีความสามารถในการหมัก (Oxidative yeast) ยีสต์พวกนี้ได้แก่ *Rhodotorula, Sporobolomyces, Endomycopsis* เป็นต้น (สาวิตรี, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis*

เป็นยีสต์ที่ถูกใช้ในการผลิตลาเกอร์เบียร์ (Reess, 1870) *Saccharomyces carlsbergensis* ถูกเชื่อว่าเป็นลูกผสมของ *Saccharomyces eubayanus* กับ *Saccharomyces cerevisiae* (Martini และคณะ ,1993)ในประเทศจีนมีการค้นพบว่าใช้เชื้อ *S. carlsbergensis* ในการผลิตแอลกอฮอล์จากการหมักด้วยน้ำผึ้ง ผลไม้ ข้าวและข้าวบาร์เลย์ (McGovern และคณะ, 2004; Damerow, 2012)

S. carlsbergensis เป็นจุลินทรีย์ยูคาริโอต มีรูปร่างยาว มีลักษณะเป็นเส้นใย ยีสต์นี้มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการแตกหน่อโดยการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์หรือแบสิดิโอสปอร์ การตกตะกอนของ *S. carlsbergensis* จะเป็นยีสต์ที่ก้นถังหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะยับยั้งตะกอน *S. carlsbergensis* เป็นยีสต์ที่ทนความเย็นกว่า *S. cerevisiae* สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำ ในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 5-14 องศาเซลเซียส ในระหว่างกระบวนการหมักจะทำให้ค่าพีเอชลดลง แอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น ยีสต์นี้จะต้องการแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลในการเจริญเติบโต ได้แก่ผลไม้ หรือคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ (Dengis และคณะ,1995; Borsting และคณะ, 1997)

2.4 กากน้ำตาล (Molasses)

กากน้ำตาล (Molasses) เป็นของเหลวสีดำที่เหนียวข้น ซึ่งไม่สามารถจะตกผลึกน้ำตาลได้อีก เป็นเนื้อของสิ่งที่ไม่ใช่น้ำตาลที่ละลายปนอยู่ในน้ำอ้อย ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ทและสารเคมี เช่น ปูนขาว ซึ่งใช้ในการตกตะกอนให้น้ำอ้อยใส ส่วนประกอบของกากน้ำตาลจะไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับพันธุ์อ้อยและกรรมวิธีการผลิต แต่ส่วนมากพบว่าส่วนประกอบส่วนใหญ่ คือ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ทและน้ำ ปัจจุบันโรงงานน้ำตาลที่ทันสมัยมีความสามารถในการสกัดน้ำตาลออกจากกากน้ำตาลได้มากขึ้นแต่ก็ยังมีหลงเหลืออยู่ เพราะการสกัดออกทั้งหมดจะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีน้ำตาลซูโครสบางส่วนที่สูญเสียไปกับกากน้ำตาล ซึ่งเป็นการสูญเสียค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการสูญเสียแบบอื่น (นฤมล, 2549)

ภาพที่ 2.6 กากน้ำตาล (Molasses)

ที่มา : นฤมล (2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กากน้ำตาล มี 3 ชนิด ได้แก่ (ปริษฎางค์, 2547)

1. Blackstrap molasses หรือ Final molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาล ร้อยละ 50-60 การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจะใช้น้ำตาลประเภทนี้เป็นวัตถุดิบ

2. Refinery molasses คือ กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวมีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 48

3. Highest molasses หรือ Invert molasses คือกากน้ำตาลที่ไม่ใช่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล แต่ได้

จากการนำบางส่วนของน้ำอ้อยไปแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหยซึ่งมีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 77 โดยกากน้ำตาลมีส่วนประกอบ ดังมีรายละเอียดในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของกากน้ำตาล

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
น้ำ	17 - 25
ซูโครส	30 - 40
กลูโคส	4 - 9
ฟรุกโทส	5 - 12
น้ำตาลรีดิวซ์อื่นๆ	1 - 5
คาร์โบไฮเดรตอื่นๆ	2 - 5
เถ้า	7 - 15
สารประกอบไนโตรเจน	2 - 6
กรดที่ไม่มีไนโตรเจน	2 - 8

ที่มา: กนกวรรณ (2547)

2.4.1 การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาล

1. เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยงแบคทีเรีย (Keller, 1967)

2. เป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งใช้ในการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ บิวธิลแอลกอฮอล์ อาซีโตน กรดซิตริก กลีเซอรอล และยีสต์ เอทิลแอลกอฮอล์ใช้ทำกรดอาซีติค เอธีลอีเธอร์ เป็นต้น (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2510)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ใช้ในอุตสาหรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมทำสุรา อุตสาหกรรมการทำผงชูรส อุตสาหกรรมการทำยีสต์ อุตสาหกรรมการผลิตยารักษาโรคบางอย่าง อุตสาหกรรมการทำน้ำปลาและซีอิ้ว (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2510)

4. เป็นแหล่งวิตามินบีจำนวนมาก นำมาใช้หรือผลิตเป็นอาหารสัตว์ (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2510)

5. ใช้เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาพลาเทนซิส ในระบบบ่อเพาะเลี้ยงน้ำวน (ปาวลี, 2550)

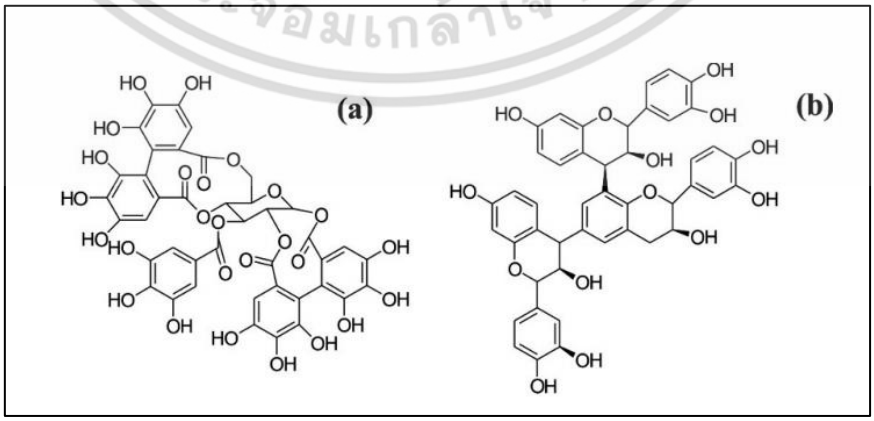
2.5 แทนนิน (Tannin)

แทนนินประกอบด้วยกลุ่มฟีนอลิกขนาดใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำ มวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500 และ 3000 ดาลตัน พบได้ในพืชทั่วไป และเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักเบียร์และไวน์ (Singleton และ Eseau 1969)

แทนนินมี 2 ชนิด แสดงโครงสร้างดังภาพที่ 2.7

1. ไฮโดรไลซ์แทนนิน (Hydrolysed tannins) ซึ่งเป็นกลูโคสิดิกไกลโคไซด์ของโพลิแกลลอยไกลโคไซด์ (ขวัญใจ, 2535) มีโครงสร้างประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือน้ำตาลและกรดฟีนอลิก (ประกร, 2535) และเมื่อไฮโดรไลซ์แทนนินละลายในกรดหรือน้ำย่อย จะได้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง ได้แก่ กรดแกลลิก กรดเอลลาจิก และกลูโคส (อัญมณี, 2540) พบมากในส่วนใบ ฝัก

2. คอนเดนส์แทนนิน (Condensed tannins) เป็นสารที่มีโมเลกุลใหญ่และซับซ้อนมากกว่าไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนิน คอนเดนส์แทนนินเป็นพอลิเมอร์ของฟลาโวนอยด์ที่เกิดจากการรวมตัวของพวก Flavan-3-ol (ขวัญใจ, 2535) ไม่สามารถไฮโดรไลซ์ด้วยกรดหรือด่าง แต่ละลายได้ดีในน้ำร้อน แอลกอฮอล์ และอะซีโตน พบได้ในส่วนเปลือกต้นและแก่นไม้เป็นส่วนใหญ่



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของแทนนิน (a) Hydrolyzable tannin และ (b) Condensed tannin

ที่มา : Raja และคณะ (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แทนนินมีคุณสมบัติตกตะกอนโปรตีน ทำให้หนังสัตว์ไม่เน่าเปื่อย จึงมีการใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง และแทนนินมีฤทธิ์ฝาดสมานจึงใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม เช่น รักษาอาการพุพอง อาการท้องเสีย มีฤทธิ์เป็นยา ต้านไวรัส เป็นต้น นอกจากนี้แทนนินยังนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เช่น การย้อมผ้า บำบัดน้ำเสีย กาว ปุ๋ย ธุรกิจปลาสวยงาม ผลิตเครื่องสำอาง น้ำหมึก หมึกพิมพ์ สีย้อมผ้าต่าง ๆ กาวในอุตสาหกรรมไม้อัด ใช้เป็นสารเสริมรสชาติอาหารในการผลิตไวน์ เบียร์ สาเก ชา กาแฟ และ น้ำผลไม้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารเคลือบอาหาร ได้แก่ เนื้อสัตว์โดยผสมกับเจลาตินหรือโปรตีนจากนมทำให้เก็บรักษาอาหารได้นานยิ่งขึ้น (ขวัญใจ, 2535; ประกร, 2553)

แทนนินมีคุณสมบัติในการยับยั้งกระบวนการหมัก (Singleton และ Eseau, 1969) Scalbert (1991) กล่าวถึงกลไกการยับยั้งของแทนนิน 3 ขั้นตอน

1. แทนนินเข้าแทรกในเยื่อหุ้มเซลล์ ยับยั้งการขนส่งไอออน (Diwan, 1972)

2. แทนนินเข้าทำปฏิกิริยาและตกตะกอนโปรตีนและองค์ประกอบของไนโตรเจน (Haslam และ Lilley, 1988) ซึ่งอาจเกิดจากไนโตรเจนถูกกีดกันหรือเอนไซม์ถูกยับยั้ง

3. แทนนินคีเลตไอออนของโลหะ (Harris และ Livingston, 1964) และยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ (Mila และคณะ, 1996; Chung และคณะ, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kim และ Yun (2006) ผลิตบีตากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* โดยกล่าวว่าสิ่งที่มีผลต่อผนังเซลล์ยีสต์ คือ ส่วนประกอบของอาหารและสภาวะในการผลิตบีตากลูแคนจากผนังเซลล์ยีสต์ถูกใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์และเภสัชมาเป็นเวลานาน แต่อย่างไรก็ตามบีตากลูแคนที่แยกได้จากผนังเซลล์ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ละลายน้ำซึ่งไม่สามารถนำไปใช้ได้ การเตรียมบีตากลูแคนให้ละลายได้จึงมีประโยชน์ในการนำไปใช้ งานวิจัยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ยีสต์ต่อเอนไซม์ β-glucanase (Glucanex® 200G) และเปรียบเทียบปริมาณบีตากลูแคนระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบ Batch และ Fed batch บีตากลูแคนถูกสกัดด้วยวิธีใช้ด่างร้อน (2%(w/v) NaOH) 90 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง และเติมเอทานอล 3 เท่า ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนบีตากลูแคน กำจัดโปรตีนออกด้วย DEAD ionexchange chromatography และกำจัดแมนแนนออกด้วย Concanavalin A chromatography จะได้บีตากลูแคนที่ละลายได้ โดยพบว่าการทนต่อเอนไซม์ β-glucanase ของผนังเซลล์ Smith และคณะปี 2000 กล่าวว่าเพิ่มขึ้นในช่วง Stationary phase และปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุดในช่วงก่อน Stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่ผนังเซลล์หนาที่สุด

Kim และคณะ (2007) ศึกษาปริมาณเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* JU13 ในการเพาะเลี้ยงแบบ Fed batch เพื่อผลิตบีตากลูแคน อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงได้แก่ กากน้ำตาลและน้ำหมักข้าวโพด ออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง พบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลและน้ำหมักข้าวโพดที่ทำให้ได้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด คือ 6.4% (v/v) และ 17% (v/v) ตามลำดับ ได้ปริมาณเซลล์ 10.8 กรัมต่อลิตรหลังจากเพาะเลี้ยง 20 ชั่วโมง และได้ปริมาณบีตากลูแคน 97.2 ± 0.053 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นเพาะเลี้ยงยีสต์ในถังหมักชนิดกวนขนาด 2.5 ลิตรแบบ Batch โดยศึกษาระดับการที่ 200 ถึง 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ถึง 3 vvm เพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 พบว่าปริมาณเซลล์แปรผันตรงกับอัตราการกวน และปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (DO) ลดลงอย่างรวดเร็วเกือบเป็น 0 ในชั่วโมงที่ 8 ถึง 12 ยกเว้นการกวนที่ 350 และ 400 รอบต่อนาทีที่ค่า DO สูงขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 32 เนื่องจากแหล่งคาร์บอนหมด ซึ่งการกวนในระดับ 350 และ 400 รอบต่อนาที ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกัน คือ 35.1 ถึง 36.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในการเพาะเลี้ยงแบบ Fed batch เลือกการกวนในระดับ 350 รอบต่อนาที ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์ 95.7 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vu และคณะ (2009) ศึกษาความเข้มข้นของยีสต์ *S. cerevisiae* KV-25 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มาจากของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม ได้แก่ กากน้ำตาล และน้ำหมักข้าวโพด พบว่าปริมาณเซลล์ยีสต์ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบพื้นผิวตอบสนอง พบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลและน้ำหมักข้าวโพดที่ทำให้ได้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด คือ 10.25 %(v/v) และ 16.87%(v/v) ตามลำดับ และเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงยีสต์ในถังหมักสองแบบได้แก่ แบบ Batch และ Fed batch พบว่า การเพาะเลี้ยงแบบ Batch 5 ลิตร ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์ 36.5 กรัมต่อลิตร ส่วนแบบ Fed batch ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์สูงกว่า คือ 187.63 กรัมต่อลิตร และพบว่าการผลิตมวลเซลล์ยีสต์แปรผันตรงกับอัตราการกวน ซึ่งอัตราการกวน 350 และ 400 รอบต่อนาทีให้ปริมาณเซลล์สูงที่สุด และนอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณกลูโคสในอาหาร

Schnierda และคณะ (2014) ศึกษาหาองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตมวลเซลล์จาก Non-Saccharomyces โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ ยีสต์สกัดและน้ำหมักข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า กากน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร และ ยีสต์สกัด 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์มากที่สุด คือ 11 กรัมต่อลิตร และได้แอลกอฮอล์ 5.5 กรัมต่อลิตร

Ha และคณะ (2002) ทำการวิเคราะห์กลูแคนที่ละลายในด่างที่ผลิตจากยีสต์ *S. cerevisiae* JH ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย UV เพื่อให้ได้บีตากลูแคนที่มีกิ่งก้านมากขึ้น ยีสต์ถูกทดสอบความทนของ laminarinase และ endo-β-(1,3)-D-glucanase สกัดบีตากลูแคนโดยใช้ด่างร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบที่ 5 และ 8 ชั่วโมง และปรับให้เป็นกลางโดย 2 M acetic acid และเติมเอทานอล 3 เท่าเพื่อตกตะกอนบีตากลูแคน สกัดนำแมนแนนหรือแมนโนโปรตีนออกโดยใช้ Concanavalin-A จากนำวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพด้วย HPLC gas chromatography และ ^{13}C-NMR spectrometry พบว่ายีสต์ที่ถูกเหนี่ยวนำมีปริมาณกลูแคนที่ละลายได้ในด่างถึง 10 เท่าและมีปริมาณ β-1,6-D-linkage มากกว่า

Tam และคณะ (2013) ศึกษาการสกัดบีตากลูแคนจากบริวเวอร์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เหลือทิ้งโดยใช้วิธี autolysis เอนไซม์ และ ultrasonic โดยกล่าวว่าบริวเวอร์ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมสามารถนำมาสร้างมูลค่าเพิ่มได้ เช่นเดียวกับ worrasinchai และคณะ (2015) ตะกอนเซลล์ยีสต์ถูกแช่ใน phosphate-citrate buffer (พีเอช 7.0) และทำให้ผนังเซลล์แตกโดยการใช้เอนไซม์และ ultrasound จากนั้นนำไป autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที 15 นาที เพื่อแยกส่วนใสออก ตะกอนนำไปล้างให้สะอาดและนำมาสกัดต่อด้วย solvent โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

solvent : ตะกอนยีสต์ อัตราส่วน 1 : 4 (w/w) บีตากลูแคนที่นำไปปั่นเหวี่ยงและทำแห้งที่ 40 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนโดย YEAST BETA GLUCAN ASSAY KIT (Megazyme Int, Bray, Ireland) ใช้การออกแบบการทดลองแบบ RSM ผลการวิเคราะห์ คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ทำให้ได้ปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุดคือ 0.86 %(w/w) ใช้เวลา 5.34 ชั่วโมง และใช้ ultrasound 8.28 w/g 11.60 นาที ได้ปริมาณบีตากลูแคน 72.06% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

Varelas และคณะ (2016) ศึกษาวิธีการสกัดบีตากลูแคนที่แตกต่างกันจากยีสต์ *S. cerevisiae* VIN 13 โดยการสกัดบีตากลูแคนด้วยวิธีด่างร้อน และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เอนไซม์ Glucanex® 200G ซึ่งประกอบด้วย β-1,3-glucanase และ β-1,6-glucanase จนได้เป็นหน่วยย่อยคือกลูโคส พบว่าการกระตุ้นให้ยีสต์ย่อยตัวเองด้วย 3% NaCl พีเอช 5 ใช้เวลา 29 ชั่วโมง 55 องศาเซลเซียส และใช้ 0.5 M NaOH 2 ชั่วโมง 90 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ปริมาณบีตากลูแคนสูงสุด คือ 64 ± 1.25 %

Lee และคณะ (2001) ศึกษาการทำบริสุทธิ์บีตากลูแคนที่ละลายได้จากผนังเซลล์ยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำการสกัดบีตากลูแคนด้วยด่าง เรียกว่า กลูแคน p-1 ได้สัดส่วนกลูแคนต่อแมนแนน 30 ต่อ 70 และปริมาณโปรตีน 2.8% (w/w) จากนั้นกำจัดโปรตีนออกด้วย DEAE chromatography เรียกว่า กลูแคน p-2 ได้สัดส่วนกลูแคนต่อแมนแนน 30 ต่อ 70 ปริมาณโปรตีน 0.3% (w/w) และทำบริสุทธิ์มากขึ้นด้วย ConA chromatography เรียกว่า กลูแคน p-3 ได้สัดส่วนกลูแคนต่อแมนแนน 100 ต่อ 0 และปริมาณโปรตีน 0% (w/w)

Naruemon และคณะ (2013) ศึกษาผลของการเติมสารเติมแต่ง ได้แก่ SDS, EDTA และ NaCl ต่อการผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าการใส่สารเติมแต่งสามารถกระตุ้นการสร้างบีตากลูแคน 7-40 % โดยการเติม SDS 100 ppm ในอาหาร YPD ทำให้ได้บีตากลูแคนสูงสุดและปริมาณโปรตีนน้อย ตามด้วยการใส่ SDS 20 และ NaCl 3000 ppm คุณลักษณะทางเคมีวิเคราะห์ด้วย NMR และพบว่าการเติมสารเติมแต่ง EDTA 50 ppm ส่งผลให้บีตากลูแคนที่ได้มีกิ่งก้านมากขึ้นด้วย ซึ่ง Mongkontanawat และคณะปี 2011 ศึกษาผลของการใส่สารเติมแต่ง 3 ชนิด เช่นเดียวกัน ต่อการผลบีตากลูแคนและลักษณะของยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่า การเติม SDS 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้มีปริมาณการแตกหน่อและปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุด คือ 8.16% (w/w) หรือมากกว่า 1.4 เท่าของ control

Varelas และคณะ (2017) ศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส และการเติม NaCl ต่อปริมาณบีตากลูแคนที่ผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* VIN13 ในการเพาะเลี้ยงแบบไม่มีอากาศ กล่าวว่าผนังเซลล์ยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างกระบวนหมัก ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์และสภาวะใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย\ Kim และYun, 2006; Catley, 1988 และ McMurrough และ Rose, 1967 ซึ่ง Aguilar และคณะ (2003) ศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ในการเพาะเลี้ยงสภาวะที่ต่างกัน ยกตัวอย่างปัจจัยที่มีผลต่อผนังเซลล์ยีสต์ เช่น พีเอชอุณหภูมิ การให้อากาศ แหล่งคาร์บอน และการจำกัดของปริมาณไนโตรเจน เป็นต้น Varelas และคณะทดลองเปรียบเทียบการกระตุ้นเชื้อเริ่มต้นด้วย NaCl 0% และ 6% เพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคสต่างกันได้แก่ 200, 300 หรือ 400 กรัมต่อลิตร พบว่าการไม่กระตุ้นด้วย NaCl และใช้กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 200 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณบีตากลูแคนสูงสุดอยู่ในช่วงการเจริญ Stationary phase และผนังเซลล์ทนต่อเอนไซม์ Glucanex® 200G ในช่วงปลาย Exponential phase เช่นกับงานวิจัยของ Logothetis และคณะ, 2007; Oda และ Tonomura , 1993; Morris และคณะ, 1986 และ Hohmann, 2002 ที่ศึกษาผลของ NaCl และ Osmotic stress ต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกัน พบว่าการเติม NaCl มีผลลบต่อการเจริญของยีสต์ โดย Rodriguez และ Ortega (1982) กล่าวว่าการเติม NaCl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้ Na^+ ในยีสต์มีมากขึ้น ส่งผลให้การเจริญของเชื้อลดลง แต่อย่างไรก็ตาม Logothetis และคณะ (2010) กล่าวว่า การเติม NaCl มากกว่า 5% (w/v) ถึงแม้จะให้ปริมาณเซลล์ที่น้อยแต่ส่งผลทำให้ช่วงสุดท้ายของการหมักเชื้อมีอัตราการรอดสูงขึ้น นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบ การกระตุ้นเชื้อก่อนหมักด้วย NaCl และไม่กระตุ้น พบว่า การกระตุ้นยีสต์ด้วย 6% NaCl เป็นเวลา 16 ชั่วโมงก่อนการเพาะเลี้ยงขั้นต่อไปส่งผลดีต่อการหมัก ทั้งในด้านการผลิตเอทานอล การใช้น้ำตาลของยีสต์ และการผลิตกลีเซอรอล El-Samargy และ Zall (1988) กล่าวว่า สารยับยั้งบางชนิดเช่น NaCl มีผลเล็กน้อยต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการใช้น้ำตาลของยีสต์เพื่อผลิตมวลเซลล์ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Saccharomyces carlbergensis RU01 จาก สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

3.2 สารเคมี

3.2.1 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 กากน้ำตาล จากโรงงานน้ำตาลมิตรผล

3.2.1.2 ฝักจามจุรี

3.2.1.3 Yeast extract (Scharlua, Spain)

3.2.1.4 Malt extract (Himedia, India)

3.2.1.5 Peptone (Himedia, India)

3.2.1.6 Dextrose (Pure Chem, Taiwan)

3.2.1.7 Agar (Himedia, India)

3.2.1.8 Ammonium sulfate (RIEDEL-DE-HAEN AG SEELZE-HANNOVER, Germany)

3.2.1.9 Tannic acid (Sigma, USA)

3.2.2 สำหรับการวิเคราะห์

3.2.2.1 Sodium chloride, Carlo Erba, Italy

3.2.2.2 Dinitrosalicylic acid, Carlo Erba, Italy

3.2.2.3 Sodium hydroxide, Carlo Erba, Italy

3.2.2.4 Potassium sodium tartrate, Carlo Erba, Italy

3.2.2.5 Sodium hydroxide, Univar, Australia

3.2.2.6 Glucose, Univar, Australia

3.2.2.7 Hydrochloric acid 37%, Carlo Erba, Italy

3.2.2.8 YEAST BETA GLUCAN ASSAY KIT (Megazyme Int., Bray, Ireland)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น Dragon 3002, Switzerland)

3.3.2 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BSA224S-CW, Germany)

3.3.3 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Heraeus, รุ่น T20 USA)

3.3.4 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) (Bosstech, USA)

3.3.5 ไมโครเวฟ (Microwave) (Electrolux, China)

3.3.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Memmert, Germany)

3.3.7 หม้อนึ่งความดันไอสูง (Autoclave) (Tomy รุ่น ES315, Japan)

3.3.8 เครื่องหมุนผสม (Vortex mixer) (Vortex Genie 2, USA)

3.3.9 เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) (Heraeus รุ่น Pico 21, Germany)

3.3.10 เครื่องหมุนเหวี่ยงคุมอุณหภูมิ (Eppendrof รุ่น 5804 R, Germany)

3.3.11 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) (Inolab, Germany)

3.3.12 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Nikon ECLIPSE E200, China)

3.3.13 เครื่องเขย่า (Shaker) (รุ่น GFL 3017)

3.3.14 เครื่องเขย่าแบบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker Series) (รุ่น Innova 42)

3.3.15 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS Spectrophotometer)

3.3.16 ถังหมักขนาด 7.5 ลิตร รุ่น BioFlo® 310 Fermentor พร้อมชุดควบคุม (Eppendrof, USA)

3.3.17 เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

3.5 ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เดือน สิงหาคม 2559 ถึง เดือนเมษายน 2561

3.6 วิธีการดำเนินงาน

3.6.1 การเลี้ยงเชื้อ *S. carlsbergensis* RU01

กระตุ้นให้ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ทนต่อสภาวะที่มีความเข้มข้นของแทนนิน โดยเตรียมเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยฝักจามจุรี 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกระตุ้นให้ยีสต์ทนต่อแทนนินในขั้นต่อไป เทอาหารใส่ในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้เย็น นำเชื้อยีสต์มาเขี่ยเชื้อแบบ Streak plate ลงในจานเพาะเชื้อที่เทอาหารไว้แล้ว เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิห้อง จากนั้นเขี่ยเชื้อ *S. carlsbergensis* RU01 สายพันธุ์ที่ถูกพัฒนาให้เจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นของแทนนินได้ 1 โคโลนี ลงใน flask ในอาหารเหลว Yeast extract malt extract (YM) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.6.2 การทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01

ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract malt extract (YM) ปรับความขุ่นของยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 ± 0.1 OD ที่ 600 นาโนเมตร ใส่หัวเชื้อ 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 3%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%(w/v) และแทนนิน 0.1%(w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเซลล์ทุกๆ 0 4 12 20 24 36 48 และ 60 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเตรียมหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่าง นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์โดยเติม 0.85% NaCl 1 มิลลิลิตรลงในหลอด เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ 2 ครั้ง ทิ้งส่วนใส อบตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน คำนวณหาน้ำหนักแห้ง (X) ในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.6.3 การเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ระหว่างอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% และไม่เติมแทนนิน

ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract malt extract (YM) ปรับความขุ่นของยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 ± 0.1 OD ที่ 600 นาโนเมตร ใส่หัวเชื้อ 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดที่แตกต่างกันได้แก่ อาหารที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 3%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%(w/v) ที่เติมแทนนิน 0.1%(w/v) และ ได้แก่ อาหารที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 3%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%(w/v) ที่ไม่เติมแทนนิน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเซลล์เมื่อครบ 36 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณบีตากลูแคน

3.6.4 การย้อมเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ด้วย Congo red

การย้อมเซลล์ด้วยสี Congo red เป็นการย้อมคาร์โบไฮเดรตที่บริเวณผนังเซลล์ เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ครบ 36 ชั่วโมง ทำการล้างตะกอนเซลล์ 2 รอบ โดยใช้ 0.85% NaCl และล้างรอบสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการตรึงเซลล์บนกระจกสไลด์ หยดสี Congo red ทิ้งไว้นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100x

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบของโครงสร้างยีสต์ที่เป็นคาร์โบไฮเดรตจะติดสีแดงของสีย้อม Congo red (ดัดแปลงวิธีจาก Mckinney, 1953)

3.6.5 การเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตบีตากลูแคน

นำยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Yeast extract malt extract (YM) ปรับความขุ่นของยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 1.5 ± 0.1 OD ที่ 600 นาโนเมตร ใส่หัวเชื้อ 250 มิลลิลิตร ลงถังหมักขนาด 7.5 ลิตร ที่มีปริมาตรทำงาน 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์แบบกะในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 3% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% และแทนนิน 0.1% โดยใช้การวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล โดยมีตัวแปร 2 ตัวคือ อัตราการให้อากาศและความเร็วรอบในการกวน โดยปรับอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 และ 1 VVM ความเร็วรอบในการกวนเท่ากับ 100 200 และ 400 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อนับจำนวนเซลล์ วิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทุกๆ 0 4 8 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง

3.6.6 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิธี DNS

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที นำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank (Miller และคณะ, 1959)

3.6.7 การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคน

เซลล์ยีสต์ถูกปั่นเหวี่ยงออกจากน้ำหมักและล้างด้วย 0.85% NaCl 2 ครั้ง และล้างเซลล์ครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น ทำการสกัดบีตากลูแคนด้วยวิธีใช้ความร้อนและความดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปล่อยให้เซลล์เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้อง เติม 12 M HCl ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันกับเซลล์ และบ่มทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเจือจางสารละลายที่มีเซลล์ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2 M HCl ปิดปากหลอดทดลองและนำไปต้ม 2 ชั่วโมง ปรับ พีเอชให้เป็นกลางด้วย 1 M NaCl และปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งตะกอนและเก็บส่วนใสนำมาวิเคราะห์บีตากลูแคนโดยใช้ ชุดตรวจสอบปริมาณบีตากลูแคน “YEAST BETA GLUCAN ASSAY KIT’’ (Megazyme Int., Bray, Ireland)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.8 การสกัดบีตากลูแคนและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01

เลี้ยงเชื้อ *S. carlsbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 สูตร ปริมาตร 500 ml ได้แก่ สูตรควบคุมคือ กากน้ำตาล 3%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%(w/v) และสูตรใส่แทนนิน คือกากน้ำตาล 3%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%(w/v) และแทนนิน 0.1% (w/v) ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิติจากข้อ 3.6.2 เพาะเลี้ยงยีสต์ในเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก เติมน้ำเกลือเจือจาง 0.85 % เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเหวี่ยงแยกอีก 2 ครั้ง รินส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การสกัดบีตากลูแคนและทำบริสุทธิ์บีตากลูแคนมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.6.8.1 การเตรียมบีตากลูแคน

นำเซลล์ยีสต์อบแห้งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงข้อที่ 3.6.8 จำนวน 10 กรัม สกัดด้วย 2% โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาปรับให้เป็นกลางโดยใช้ 2 โมลาร์ กรดอะซิติก และเติมเอทานอล 3 เท่า เพื่อตกตะกอน บีตากลูแคนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตะกอนที่ได้เรียกว่าส่วนของ glucan - p1 (Lee และคณะ, 2001)

3.6.8.2 การทำให้บีตากลูแคนบริสุทธิ์(บางส่วน) (Lee และคณะ, 2001)

1. การทำให้บีตากลูแคนบริสุทธิ์(บางส่วน) โดยใช้ DEAE toyopearl chromatography

นำส่วนของ glucan - p1 ละลายใน 3 % กรดอะซิติก และเหวี่ยงแยกเพื่อเอาส่วนที่ไม่ละลายออก เก็บส่วนใสและปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 โดยใช้ 2 M NaOH เตรียมสารละลายใส่ใน DEAE toyopearl columm (ขนาด 10 x 1.0 cm) โดยใช้ 10 mM sodium phosphate buffer ที่พีเอช8.0 เป็นตัวชะ เพื่อแยกส่วนของโปรตีนออก จากนั้น10 mM sodium phosphate buffer ที่พีเอช 8.0 ที่มี 0.15 M NaCl เป็นตัวชะ ส่วนที่ได้เรียกว่า glucan - p2

2. การทำให้บีตากลูแคนบริสุทธิ์มากขึ้นโดยใช้ Concavalin A chromatography

นำส่วนของ glucan-p2 มาผ่าน Concavalin A (ขนาด 10 x 1.5 cm) เพื่อแยกส่วนของแมนแนนออกจาก บีตากลูแคนโดยใช้ 50 mM phosphate buffer (พีเอช 7.4) 10 ml ที่ประกอบด้วย 0.15 M NaCl เป็นตัวชะ ส่วนที่ได้เรียกว่า glucan - p3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.9 การศึกษาลักษณะสมบัติของบีตากลูแคนที่เตรียมได้

3.6.9.1 การวิเคราะห์โครงสร้างของบีตากลูแคนที่เตรียมได้

ชั่งตัวอย่างบีตากลูแคนที่เตรียมได้ในข้อ 3.6.8.2 ในอัตราส่วน 0.1% (w/v) เติมน้ำ 1 มิลลิลิตร จากนั้นละลายและไฮโดรไลซ์กลูแคนทั้งหมด (อัลฟากลูแคนและบีตากลูแคน) โดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% (w/w) ในหลอดทดลองที่บรรจุสารสกัดจากยีสต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ เขย่าทุก ๆ 15 นาที (เพื่อให้บีตากลูแคนละลายสมบูรณ์) เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรในแต่ละหลอด นำตัวอย่างไปต้ม 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำมาเติม 2 M KOH เพื่อปรับพีเอชให้เป็นกลาง จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใส 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร exo-1,3 β-glucan หรือ exo-1,6 β-glucan ใน 50 mM phosphate buffer พีเอช 7.4 เติมลงในหลอด เขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 60 นาที เติมเอนไซม์ GOPOD (glucose oxidase/peroxidase mixture) ลงในแต่ละหลอดแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 510 นาโนเมตร เพื่อวัดปริมาณกลูแคนทั้งหมด (ดัดแปลงจาก Many และ Vizhi, 2014)

3.6.10 การศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01

3.6.10.1 การทดลองเพื่อหาอิทธิพลของอิทธิพลของปัจจัยจากแบบจำลอง

การทดลองเพื่อหาอิทธิพลของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ใช้การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ที่มีปัจจัย 3 ปัจจัย คือ ได้แก่ ความเข้มข้นของกากน้ำตาล (x_1) ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (x_2) และปริมาณแทนนิน (x_3) ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินการ ดังนี้

1. การกำหนดระดับของอิทธิพลของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

การกำหนดระดับปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย โดยพิจารณาจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและการทดลองเบื้องต้น ซึ่งระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (+1) โดยมีค่าแอลฟา (α) เท่ากับ 1.68 ดังแสดงในตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

ตัวแปร	ระดับ				
	-1.6818 (-α)	-1	0	+1	+1.6818 (+α)
ความเข้มข้นของกากน้ำตาล (x_1)	0.98	2.00	3.50	5.00	6.02
ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (x_2)	0.00	0.05	0.10	0.20	0.30
ปริมาณแทนนิน (x_3)	0.03	0.10	0.20	0.30	0.37

2. การออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD)

ในการทดลองศึกษาสูตรอาหารในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ได้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติกำหนดลำดับการทดลองและการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ที่มีปัจจัย 3 ปัจจัย แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับและมีการทำซ้ำที่มีจุดกึ่งกลาง 6 ครั้ง ดังนั้นจึงมีจำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมด 20 หน่วย ดังตารางที่ 3.2

3.6.10.2 การหาปริมาณบีตากลูแคนจากการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design

เขี่ยเชื้อ *S. carlsbergensis* RU01สายพันธุ์ที่ถูกพัฒนาให้เจริญในสภาวะที่มีความแทนนินได้ 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว Yeast extract malt extract (YM) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ปรับความขุ่นของยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 ± 0.1 OD ที่ 600 นาโนเมตร และเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามตารางการออกแบบการทดลองดังตารางที่ 3.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเซลล์เมื่อครบ 36 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณบีตากลูแคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD)

ลำดับการทดลอง	ตัวแปรอิสระ		
	กากน้ำตาล (x_1) (กรัม)	แอมโมเนียมซัลเฟต (x_2) (กรัม)	แทนนิน (x_3) (กรัม)
1	2.00	0.05	0.10
2	5.00	0.05	0.30
3	3.50	0.25	0.20
4	5.00	0.20	0.10
5	2.00	0.05	0.30
6	2.00	0.20	0.30
7	3.50	0.13	0.20
8	6.02	0.13	0.20
9	3.50	0.13	0.37
10	3.50	0.13	0.20
11	5.00	0.20	0.30
12	2.00	0.20	0.10
13	3.50	0.13	0.20
14	3.50	0.13	0.03
15	0.98	0.13	0.20
16	3.50	0.13	0.20
17	3.50	0.00	0.20
18	3.50	0.13	0.20
19	5.00	0.05	0.10
20	3.50	0.13	0.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

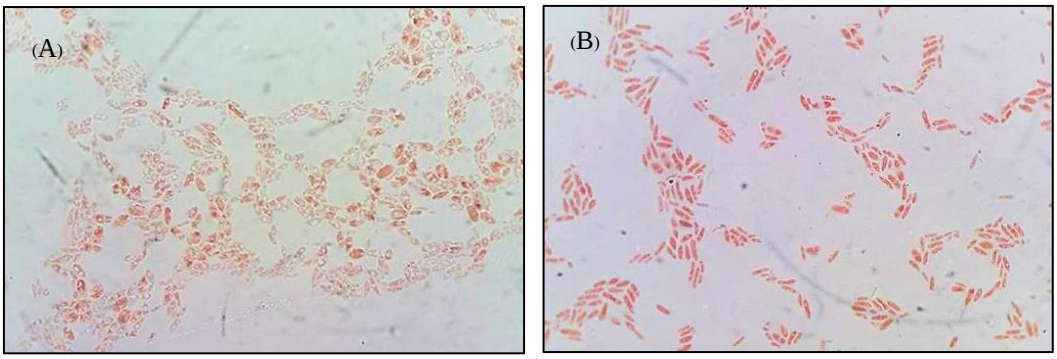
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ศึกษาความเข้มของการติดสี Congo red ที่บริเวณผนังเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01

Congo red เป็นสีย้อมที่ทำปฏิกิริยาได้กับสายคาร์โบไฮเดรตที่บริเวณหมู่ไฮดรอกซิล ให้สีแดง ในงานวิจัยหลายงานจึงใช้ย้อมเซลล์ที่บริเวณผนังเซลล์ จากการทดลองของ Kopecka และ Grabiel, 1992 มีการย้อมสีของ Congo red กับสายบีตา 1,3 กลูแคนที่ผนังเซลล์ยีสต์ จึงได้นำมาย้อมสีผนังเซลล์ของเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนิน และอาหาร YM ที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์ทั่วไป เพื่อเปรียบเทียบให้เห็นปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้น เซลล์ยีสต์ถูกตรึงไว้ในสไลด์ ย้อมด้วย Congo red ประมาณ 20 นาที แล้วล้างสีออก ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 x ส่วนประกอบของโครงสร้างยีสต์ที่เป็นคาร์โบไฮเดรตจะติดสีแดงของสีย้อม Congo red จากการทดลองพบว่ายีสต์ที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ติดสีจาง ส่วนยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลที่ถูกกระตุ้นแทนนิน มีการติดสี Congo red ที่เข้มกว่าดังภาพที่ 4.1 โดยผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะบีตากลูแคน เนื่องจากแทนนินซึ่งเป็นการใส่สารรบกวนเพื่อให้ยีสต์เกิดการปรับตัว ทำให้ยีสต์มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อป้องกันสารเคมีเหล่านั้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rinaldi และคณะ (2016) ศึกษาผลของสายพันธุ์ยีสต์และแทนนินต่อการหมักไวน์ พบว่าแทนนินส่งผลต่อรูปร่างของยีสต์ในไวน์องุ่น ซึ่งจากทดลองพบว่าแทนนินมีผลต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ผนังเซลล์ โดยผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมีองค์ประกอบของกรดไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะบีตากลูแคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



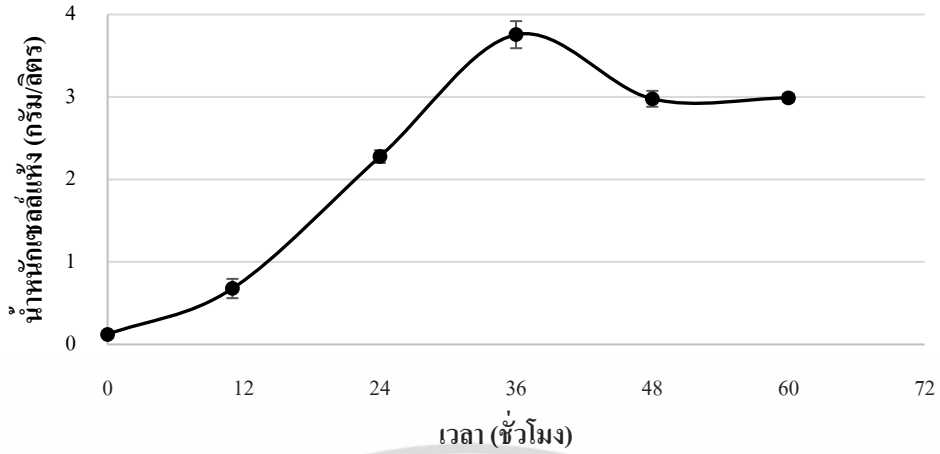
ภาพที่ 4.1 แสดงการติดสีของ Congo red ของเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง โดย A คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth และ B คือ อาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% (w/v)

4.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01

ผนังเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยบีตากลูแคนเป็นหลัก (Cabib, 1991; Kollar และคณะ, 1997; Lipke และ Ovalle, 1998) ฉะนั้นการเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ที่มากจึงเป็นปัจจัยหนึ่งต่อปริมาณบีตากลูแคนดังนั้นการศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 เพื่อให้ได้ปริมาณยีสต์ที่มากที่สุดซึ่งจะส่งผลให้มีปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุดด้วย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 3%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%(w/v) และแทนนิน 0.1%(w/v) โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 0 12 24 36 48 และ 60 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.2

ผลการทดลองพบว่าที่เวลาการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด 3.79 กรัมต่อลิตร และลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 36 ชั่วโมง โดยชั่วโมงที่ 48 และ 60 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.98 และ 2.99 กรัม/ลิตรตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่เวลาต่างๆ ในอาหารกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบของแทนนิน 0.1 % ที่เวลาต่างๆเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

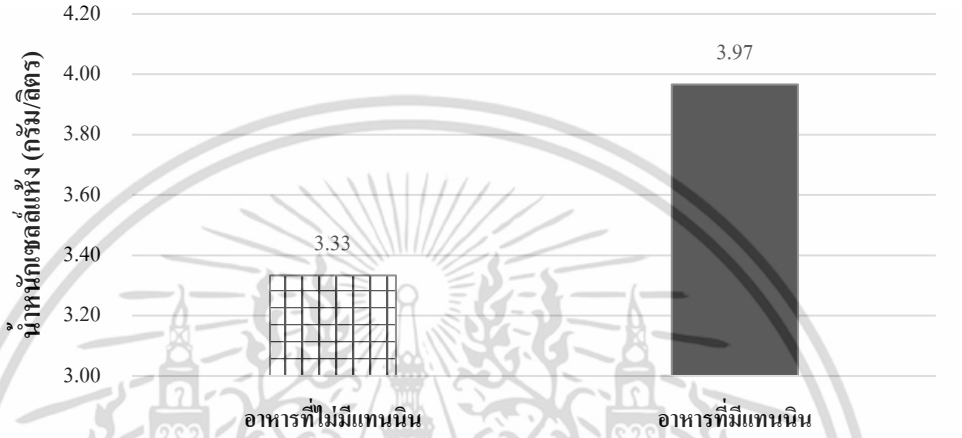
ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wauters และคณะ (1999) ซึ่งทำการคัดแยกยีสต์ที่ทนแทนนิน พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* 4471 มีปริมาณเชื้อลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแทนนิน เช่นเดียวกับงานวิจัยต่อมาในปี 2001 ที่ศึกษาผลของแทนนินต่อยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งพบว่าแทนนินมีผลทำให้เกิดการตกตะกอนบางส่วนของอาหาร YPD ทำให้ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ส่งผลให้ระยะหลังของการเพาะเลี้ยงปริมาณเชื้อลดลงด้วย นอกจากนี้ Singleton และ Eseau (2001) ได้อธิบายว่าแทนนินยับยั้งกระบวนการหมัก ยืนยันได้จากงานวิจัยของ Mullins และ NeSmith (1998) ที่ทำการวิจัยเปรียบเทียบอัตราการเจริญของยีสต์ในการผลิตเอธานอลโดยใช้ข้าวฟ่างเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแทนนินมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อและการผลิตเอธานอล

4.3 ผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินและไม่มีแทนนิน

การใส่สารเคมีในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์จากยีสต์ (Naruemon และคณะ, 2013; Mongkontanawat และคณะ, 2011; Varelas และคณะ, 2017) จึงทำการเปรียบเทียบยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมแทนนินและเติมแทนนิน ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และส่งต่อผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณบีตากลูแคน แสดงดังภาพที่ 4.3 และ 4.4 โดยทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ 36 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

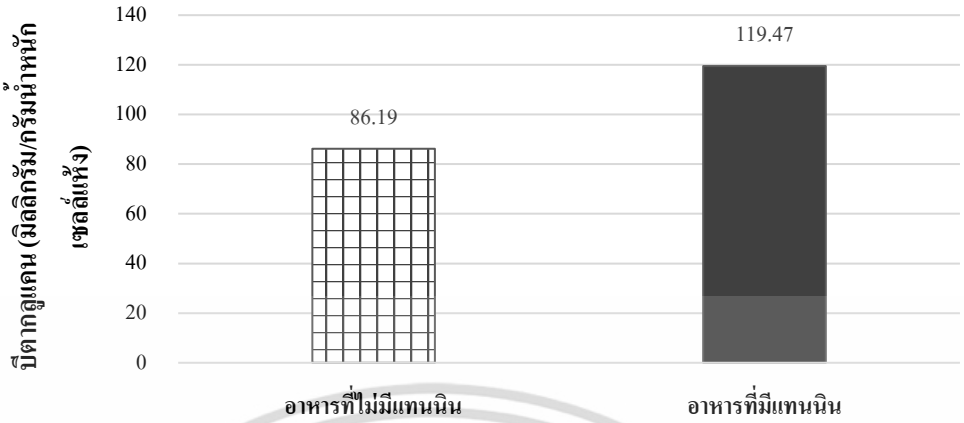
จากผลการทดลองพบว่ายีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนิน 0.1%(w/v) มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.97 กรัม/ลิตร และปริมาณบีตากลูแคน 119.47 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมแทนนิน คือมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.33 กรัม/ลิตร และปริมาณบีตากลูแคน 86.19 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแทนนินสามารถกระตุ้นเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ได้



ภาพที่ 4.3 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง เปรียบเทียบในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินและไม่มีแทนนิน

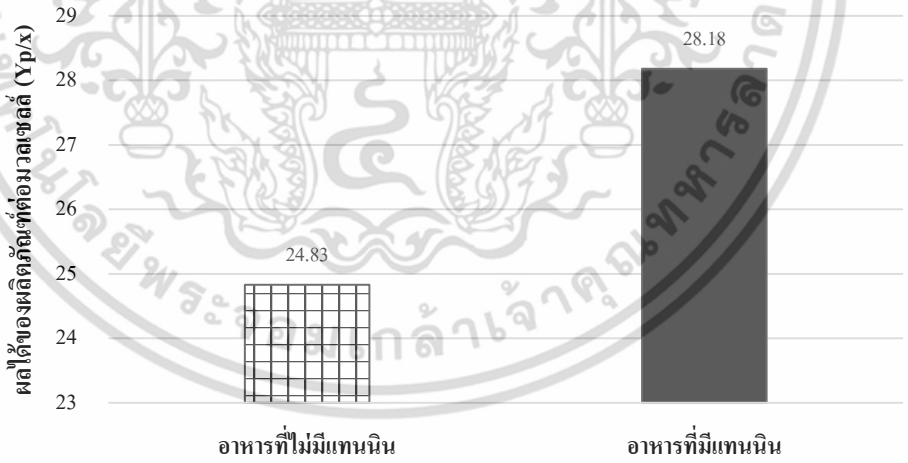
ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wauters และคณะ (1999) ซึ่งศึกษาผลของแทนนินต่อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยทำการเปรียบเทียบยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร YPD ที่ไม่มีการเติมสารเคมีใด ๆ และ ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร YPD ที่มีการเติมแทนนิน 80 ppm พบว่า ยีสต์ที่เติมแทนนินมีปริมาณเซลล์ที่มากกว่า นอกจากนี้มีงานวิจัยหลายชิ้นที่มีการทดลองเติมสารเคมีอื่นๆเพื่อกระตุ้นการเจริญและการผลิตภัณฑ์จากเชื้อ เช่น Naruemon และคณะ (2013) ศึกษาผลของการเติมสารเติมแต่ง ได้แก่ SDS, EDTA และ NaCl ต่อการผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าการใส่สารเติมแต่งสามารถกระตุ้นการสร้างบีตากลูแคนได้ 7 - 40 % โดยการเติม SDS 100 ppm ในอาหาร YPD ทำให้ได้บีตากลูแคนสูงสุดและปริมาณโปรตีนน้อยที่สุด Mongkontanawat และคณะปี 2011 ศึกษาผลของการใส่สารเติมแต่ง 3 ชนิด เช่นเดียวกัน ต่อการผลของบีตากลูแคนและลักษณะของยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่า การเติม SDS 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้มีปริมาณการแตกหน่อและปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุด คือ 8.16% (w/w) หรือ มากกว่า 1.4 เท่าของ control เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 ปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง เปรียบเทียบในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินและไม่มีแทนนิน

การผลิตบีตากลูแคนเมื่อคำนวณเป็นผลได้ของผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองพบว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแทนนิน 0.1% มีผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์มากกว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมแทนนินประมาณ 1.2 เท่า แสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์ของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง เปรียบเทียบในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่มีแทนนิน และอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนิน

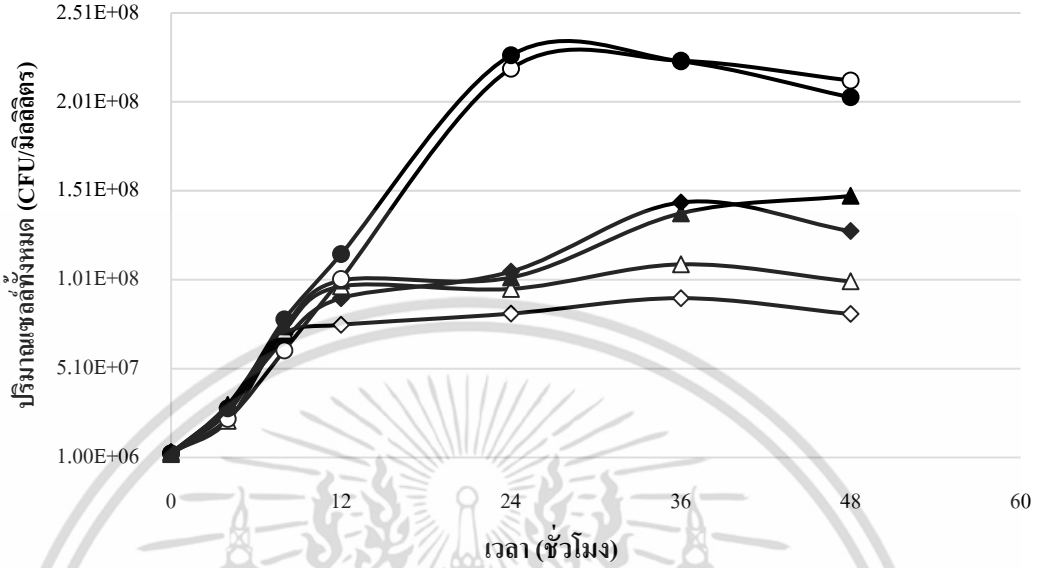
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ในสภาพวิธีการหมักแบบกะ ที่ระดับการผลิต 5 ลิตร

ทำการเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 โดยวิธีการหมักแบบกะ ที่ระดับการผลิตปริมาตร 5 ลิตรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 7 ลิตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 3%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%(w/v) และแทนนิน 0.1%(w/v) ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นปรับความขุ่นของยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 1.5 ± 0.1 OD ที่ 600 นาโนเมตร ใส่หัวเชื้อ 250 มิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาความเร็วรอบในการกวน 3 ระดับ ได้แก่ 100 200 และ 400 รอบต่อนาที และศึกษาอัตราการให้อากาศ 2 ระดับ ได้แก่ 0.5 และ 1 vvm เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0 4 8 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง นำไปนับปริมาณเชื้อทั้งหมดโดยใช้ฮีมาไซโตรมิเตอร์ ปริมาณบีตากลูแคน และบันทึกปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

ผลการทดลองพบว่าปริมาณยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 แปรผันตรงกับความเร็วรอบในการกวนเป็นหลัก โดยเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนปริมาณเซลล์ยีสต์จะเพิ่มขึ้น โดยความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที ให้ปริมาณเซลล์ยีสต์สูงที่สุด ซึ่งอัตราการให้อากาศที่ 0.5 vvm และ 1 vvm ในระดับการกวน 400 รอบต่อนาทีได้ปริมาณเซลล์ที่เท่ากันที่ชั่วโมงที่ 36 คือ 2.24×10^8 CFU/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าอัตราการให้อากาศไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ในความเร็วรอบสูง แต่อัตราการกวนต่ำ คือ 100 และ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่มากกว่าจะให้ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่สูงกว่า ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.7 และนอกจากนี้ผลของอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 พบว่าสภาวะการหมักที่ความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm มีค่าผลของอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สูงสุด คือ 0.40 h^{-1} ซึ่งผลของอัตราการเจริญจำเพาะ(μ) เป็นค่าที่บอกความเร็วของการเพิ่มจำนวนเซลล์ ยิ่งมีค่ามาก ยิ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ได้รวดเร็ว แต่ผลของอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) สูงที่สุดในสภาวะการหมักที่ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm มีค่า 8.96 h^{-1} ผลของอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) และผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์แสดงดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ปริมาณเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ในถังหมักปริมาตร 7 ลิตร ที่สภาวะการกวนและการให้อากาศแตกต่างกัน โดย (◇) = 100 รอบต่อนาที 0.5 vvm, (◆) = 100 รอบต่อนาที 1 vvm (△) = 200 รอบต่อนาที 0.5 vvm, (▲) = 200 รอบต่อนาที 1 vvm, (○) = 400 รอบต่อนาที 0.5 vvm, (●) = 400 รอบต่อนาที 1 vvm

ตารางที่ 4.1 ผลของอัตราการเจริญจำเพาะ(μ) อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด(μmax) และผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์(Yp/x)

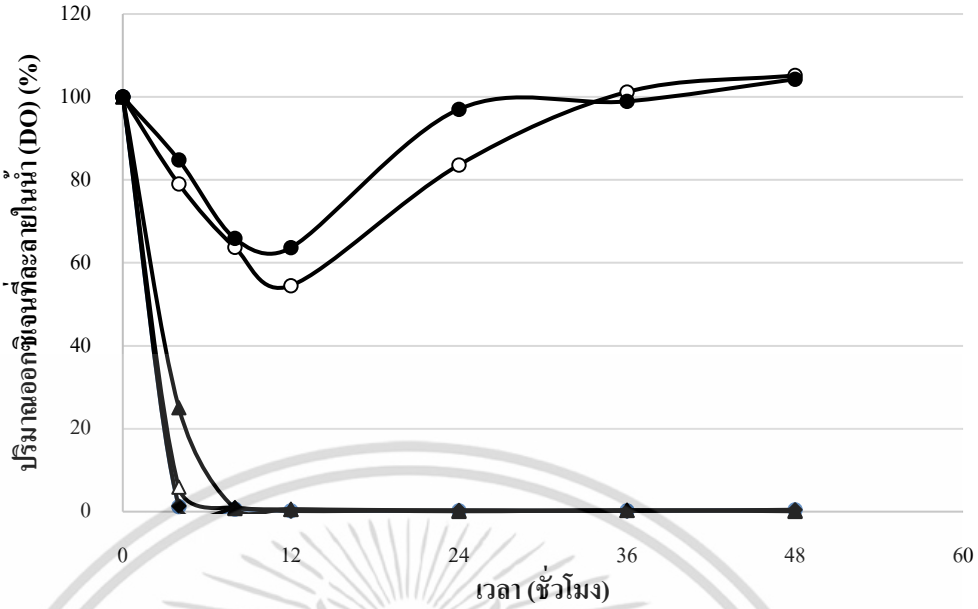
สภาวะการหมัก	อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) (h^{-1})	อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) (h^{-1})	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์ (Yp/x)
100 รอบต่อนาที, 0.5 vvm	0.36	5.56	19.31
100 รอบต่อนาที, 1 vvm	0.36	5.29	12.59
200 รอบต่อนาที, 0.5 vvm	0.36	5.74	28.73
200 รอบต่อนาที, 1 vvm	0.39	4.94	29.20
400 รอบต่อนาที, 0.5 vvm	0.37	8.96	26.07
400 รอบต่อนาที, 1 vvm	0.40	8.38	30.53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim และคณะ (2007) โดยได้ศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* JUL3 โดยอาหารที่ใช้ศึกษาได้แก่ กากน้ำตาล และน้ำหมักข้าวโพด พบว่าความเร็วรอบในการกวนเพิ่มขึ้นทำให้ได้มวลเซลล์มากขึ้น โดยความเร็วรอบในการกวน 350 และ 400 รอบต่อนาที มีปริมาณเซลล์สูงที่สุดซึ่งไม่มีความต่างกันทางสถิติ Jafari และคณะ (2007) ศึกษาผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์ Glucose oxidase ของเชื้อรา *Aspergillus niger* กล่าวว่า ประสิทธิภาพของการให้อากาศขึ้นอยู่กับการกวน ซึ่งการกวนที่สูงส่งผลต่อการสัมผัสระหว่างของเหลวกับก๊าซและประสิทธิภาพในการกระจายฟองก๊าซได้ดีขึ้น งานวิจัยของ Kim และคณะ (2003) และ Mantzouridou และคณะ (2002) ศึกษาผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิตผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน พบว่าอัตราการกวนมีความสำคัญต่อการผสมของสารในถังหมัก ทำให้ปริมาณเซลล์และการถ่ายเทออกซิเจนสูงขึ้น แต่การกวนในระดับสูงเกินไปสามารถทำให้เกิดแรงเฉือน (Shear force) ซึ่งส่งผลเสียหลายอย่างกับจุลินทรีย์เช่น ทำให้รูปทรงเปลี่ยนหรือการผลิตผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป และการให้อากาศจะส่งผลเป็นอย่างมากต่อปริมาณออกซิเจนในกระบวนการหมักต่อเมื่อมีระดับการกวนที่ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง

ผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolve Oxygen, DO) แสดงดังภาพที่ 4.8 พบว่าในความเร็วรอบการกวนที่ต่ำ ได้แก่ 100 และ 200 รอบต่อนาที ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่าเกือบเป็นศูนย์ในชั่วโมงที่ 4 แสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนหมด ทำให้ผลิตมวลเซลล์ได้น้อยกว่า สอดคล้องกับผลการทดลองดังภาพที่ 4.7 ซึ่งออกซิเจนมีความสำคัญการเจริญของเชื้อและการผลิตผลิตภัณฑ์จากเชื้อ (Casas และคณะ, 2000; Lo และคณะ, 2001) ในความเร็วรอบการกวนที่สูง คือ 400 รอบต่อนาที ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 12 เชื้อเจริญอยู่ในช่วง exponential phase ซึ่งยังเหลือมากพอสำหรับใช้ในการเจริญของเซลล์และการผลิตบีตากลูแคน โดยในชั่วโมงที่ 12 ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำคงเหลือ 54.51 % ส่วนความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำคงเหลือสูงกว่า คือ 63.65% ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่เหลือมากกว่าส่งผลให้มีการเจริญของเชื้อและผลิตบีตากลูแคนได้สูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ในถังหมักปริมาตร 7 ลิตร ที่สภาวะการกวนและการให้อากาศแตกต่างกัน โดย (◇) = 100 รอบต่อนาที 0.5 vvm , (◆) = 100 รอบต่อนาที 1 vvm (△) = 200 รอบต่อนาที 0.5 vvm, (▲) = 200 รอบต่อนาที 1 vvm, (○) = 400 รอบต่อนาที 0.5 vvm, (●) = 400 รอบต่อนาที 1 vvm

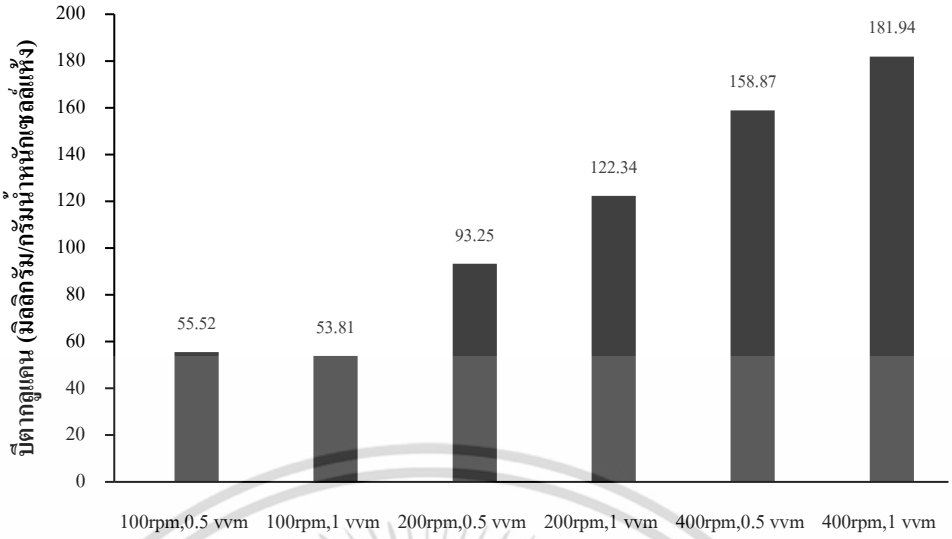
ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kim และคณะ (2007) ศึกษาปริมาณเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* JU13ในการเพาะเลี้ยงแบบ Fed batch เพื่อผลิตบีตากลูแคน อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงได้แก่ กากน้ำตาลและน้ำหมักข้าวโพด เพาะเลี้ยงยีสต์ในถังหมักชนิดกวนขนาด 2.5 ลิตรแบบ Batch โดยศึกษาระดับการที่ 200 ถึง 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ถึง 3 vvm เพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 พบว่าปริมาณเซลล์แปรผันตรงกับอัตราการกวน และปริมาณออกซิเจนที่ละลาย (DO) ลดลงอย่างรวดเร็วเกือบเป็น 0 ในชั่วโมงที่ 8 ถึง 12 ยกเว้นการกวนที่ 350 และ 400 รอบต่อนาทีที่ค่า DO สูงขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 32 เนื่องจากแหล่งคาร์บอนหมด นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษากับแบคทีเรีย เช่น งานวิจัยของ Zhou และคณะ (2017) ซึ่งศึกษาผลของการกวน การให้อากาศและอุณหภูมิต่อการผลิตไกลโคโปรตีน GP-1 จากเชื้อ *Streptomyces kanasenisi* ZX01 พบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลงต่ำที่สุดที่ความเร็วในการกวนระดับต่ำที่สุด คือ 150 รอบต่อนาที และความเร็วรอบสูงที่สุดคือ 300 รอบต่อนาทีเหลือปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมากที่สุด แต่ได้ปริมาณเซลล์และไกลโปรตีน GP-1 ไม่สูงเท่าการใช้ความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที ที่อัตราการให้อากาศ 1 vvm Bandaiphet และ Prasertsan (2006) ศึกษาผลของการกวน การให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อากาศ และสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อการผลิตเอกโซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide) จาก *Enterobacter cloacae* WD7 ทำการศึกษาค่า DOT ที่ระดับการกวน 200 รอบต่อนาที ในอัตราการให้อากาศที่แตกต่างกันคือ 0.50 0.75 1.00 และ1.25 vvm พบว่าค่า DOT ลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงขั้นต่ำที่สุดภายใน 24 ชั่วโมงในกระบวนการหมัก ซึ่งกล่าวว่าค่า DOT ขึ้นอยู่กับอัตราการให้อากาศ โดยอัตราการให้อากาศที่สูง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำก็จะมาก ซึ่งทุกระดับมีค่า DOT เหลือไม่ต่ำกว่า 10% แสดงให้เห็นว่ายังมีออกซิเจนเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ

ผลการทดลองของปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้จากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง ในถังหมักแบบกะที่ระดับการผลิตปริมาตร 5 ลิตร พบว่าปริมาณบีตากลูแคนแปรผันตรงกับความเร็วรอบในการกวนและอัตราการให้อากาศ โดยความเร็วรอบการกวนในระดับสูงคือ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm ให้ปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุด คือ 181.94 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง แสดงดังภาพที่ 4.9 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเซลล์ที่สูงดังภาพที่ 4.7 เนื่องจากบีตากลูแคนเป็นองค์ประกอบหลักที่ผนังเซลล์ยีสต์ ดังนั้นเมื่อปริมาณเชื้อสูงขึ้นจึงทำให้มีปริมาณบีตากลูแคนสูงด้วย และอัตราการให้อากาศส่งผลต่อปริมาณบีตากลูแคน จากผลการทดลองพบว่า อัตราการให้อากาศ 1 vvm ให้ปริมาณบีตากลูแคนสูงกว่าอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm ในความเร็วรอบการกวนที่สูง คือ 200 และ 400 รอบต่อนาที ส่วนความเร็วรอบในการกวนที่ต่ำ ปริมาณบีตากลูแคนมีปริมาณใกล้เคียงกันในสภาวะการให้อากาศที่ต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลของผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์แสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าสภาวะการหมักที่ความในการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm ให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์ (Yp/x)สูงที่สุด คือ 30.53 แสดงให้เห็นว่าความเร็วรอบในการกวนและอัตราการให้อากาศที่สูง ทำให้ได้ปริมาณบีตากลูแคนที่สูง Calik และคณะ (2000) ศึกษาผลของประสิทธิภาพการส่งผ่านออกซิเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* กล่าวว่า การส่งผ่านออกซิเจนในเซลล์ของจุลินทรีย์ในสภาวะการหมักแบบใช้ออกซิเจน ส่งผลสำคัญต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ และการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอไลท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



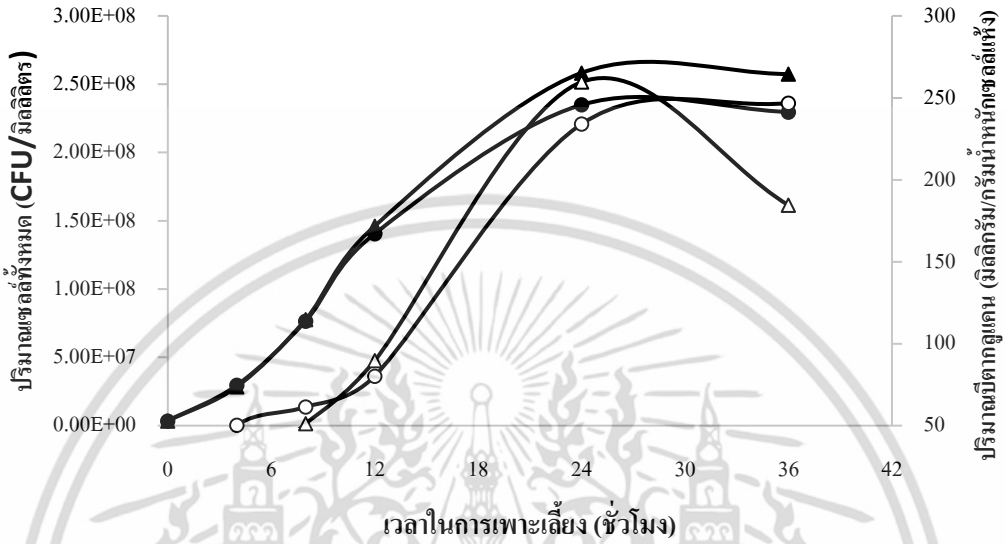
ภาพที่ 4.8 ปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง ในถังหมักแบบกะที่ระดับการผลิต 5 ลิตร

4.5 ผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 เปรียบเทียบระหว่างในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินและไม่มีแทนนิน ในสภาพวิธีการหมักแบบกะ ที่ระดับการผลิต 5 ลิตร

เมื่อเปรียบเทียบผลของปริมาณเซลล์ และปริมาณบีตากลูแคน ในถังหมักที่มีระดับการผลิต 5 ลิตร ในสภาวะที่มีความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างอาหารที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 3%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%(w/v) ที่เติมแทนนิน 0.1%(w/v) และไม่เติมแทนนิน ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นปรับความขุ่นของยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 1.5 ± 0.1 OD ที่ 600 นาโนเมตรใส่หัวเชื้อ 250 มิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 5 อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง เก็บผลที่ชั่วโมงที่ 0 4 8 12 24 และ 36 ผลการทดลองพบว่าเมื่อมีการเติมแทนนินทำให้ได้ปริมาณเซลล์ และปริมาณบีตากลูแคน 2.3 x 10^8 CFU/มิลลิลตร และ 237 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ ในขณะที่ไม่มีการเติมแทนนินในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ปริมาณเซลล์และปริมาณบีตากลูแคนเท่ากับ 2.7 x 10^8 CFU/มิลลิลิตร และ 181 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ แสดงเห็นว่าการเติมแทนนินทำให้ได้ปริมาณบีตากลูแคนสูงกว่าและช่วยให้มีการผลิตบีตากลูแคนที่เสถียรไม่ลดลงเมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมแทนนินที่มีปริมาณบีตากลูแคนลดลงในชั่วโมงที่ 36 ดังรูปที่ 4.10 ผลของผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อ

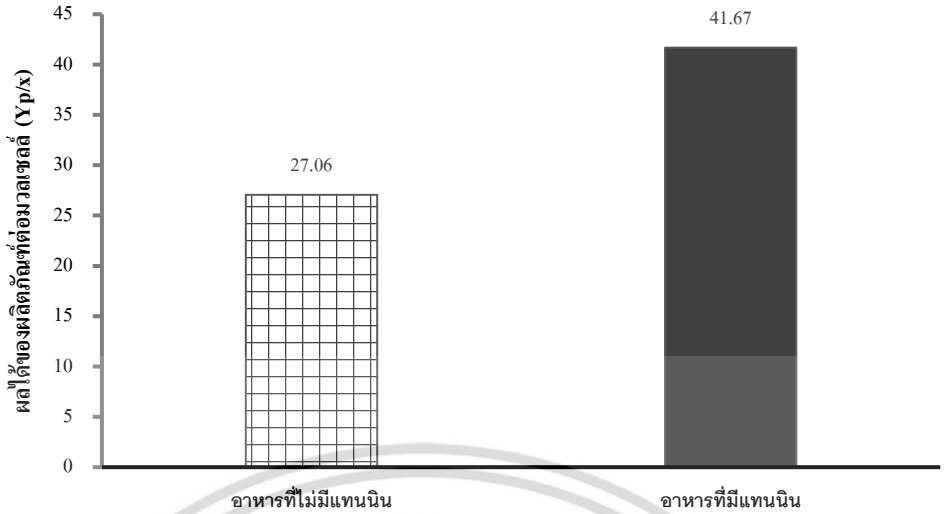
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มวลเซลล์ (Yp/x) แสดงดังภาพที่ 4.11 พบว่ายีสต์ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% มีผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์สูงกว่ายีสต์ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมแทนนิน 1.5 เท่า แสดงให้เห็นว่าแทนนินสามารถกระตุ้นการผลิตบีตากลูแคนได้



ภาพที่ 4.9 ปริมาณเชื้อและปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะที่ระดับการผลิต 5 ลิตร ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เปรียบเทียบระหว่างอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% และไม่เติมแทนนิน โดย (▲) = ปริมาณเซลล์ในอาหารที่ไม่มีแทนนิน (Δ) = ปริมาณบีตากลูแคนในอาหารที่ไม่มีแทนนิน (●) = ปริมาณเซลล์ในอาหารที่มีแทนนิน (○) = ปริมาณบีตากลูแคนในอาหารที่มีแทนนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์ของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบกะที่ระดับการผลิต 5 ลิตร ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เปรียบเทียบระหว่างอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% และไม่เติมแทนนิน

4.6 ผลการสกัดบีตากลูแคนและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01

เมื่อนำเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงอาหารที่ความเข้มข้นอาหารกากน้ำตาล 3%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%(w/v) ที่มีการเติมแทนนิน 0.1% และไม่มีการเติมแทนนิน มาสกัดบีตากลูแคนด้วยวิธี Alkaline extraction โดยการบ่มด้วย 2% NaOH ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงตะกอนเซลล์ออก ปรับส่วนใสให้เป็นกลางโดยใช้ 2 M Acetic acid และเติมเอทานอล 3 เท่า เพื่อตกตะกอนคาร์โบไฮเดรตที่มีบีตากลูแคนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนที่ได้นำไปหาปริมาณบีตากลูแคน จากกระบวนการสกัดพบว่า นอกจากบีตากลูแคนแล้วยังมีส่วนคาร์โบไฮเดรตอื่นจากเซลล์ เช่น ไคติน และแมนแนนซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ออกมาด้วย จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟี คือ DEAE-Toyopearl ซึ่งเป็นโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ เพื่อกำจัดส่วนของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ ซึ่งพบว่าส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์มีแมนแนนจับอยู่กับบีตากลูแคนเพราะฉะนั้นต้องทำการแยกแมนแนนออกจาก บีตากลูแคน โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบจำเพาะคือ Concavalin A โดยโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะสามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตได้และสามารถชะออกโดยใช้น้ำตาลที่มีความจำเพาะต่อคาร์โบไฮเดรตชนิดนั้น เพื่อเป็นการกำจัดแมนแนนออกจึงใช้ Methylmannoside เป็นตัวชะคอลัมน์ จากนั้นจึงทำการชะบีตากลูแคนออกด้วย Methylglucoside

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัดปริมาณบีตากลูแคนด้วยชุดตรวจสอบปริมาณบีตากลูแคน “YEAST BETA GLUCAN ASSAY KIT’’ (Megazyme Int., Bray, Ireland) ได้ดังตารางที่ 4.2 พบว่าปริมาณบีตากลูแคนที่ได้จากเซลล์ยีสต์ที่มีการกระตุ้นด้วยแทนนินมีปริมาณเท่ากับ 52.5 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักของเซลล์ ในขณะที่ปริมาณบีตากลูแคนที่ได้จากเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยแทนนินมีปริมาณบีตากลูแคนเท่ากับ 12.4 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักของเซลล์ เพราะฉะนั้นแทนนินสามารถกระตุ้นให้เซลล์ยีสต์สามารถสร้างบีตากลูแคนได้ปริมาณมากขึ้น

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณกลูแคนที่กระบวนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ขั้นตอนการสกัด	ปริมาณบีตากลูแคน (มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)	
	ยีสต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแทนนิน	ยีสต์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยแทนนิน
ยีสต์สกัดหยาบ	120.2	84.8
NaOH extraction (glucan-p1)	102.4	76.2
DEAE-toyopearl (glucan-p2)	71.4	42.3
Concanavalin A (glucan-p3)	52.5	12.4

ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (2001) ซึ่งทำการทำบริสุทธิ์บีตากลูแคนที่ละลายได้จากผนังเซลล์ยีสต์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในระบบภูมิคุ้มกัน พบว่า การสกัดขั้นตอนแรกด้วย NaOH การทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE chromatography และทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วย ConA chromatography ได้ปริมาณบีตากลูแคน 31% 13% และ 4% ของน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ ซึ่งปริมาณบีตากลูแคนที่ได้อาจมีค่าแตกต่างจากผลการทดลองเนื่องจากใช้สายพันธุ์ของยีสต์และวิธีการวัดปริมาณบีตากลูแคนที่แตกต่างกัน ซึ่งงานวิจัยของ Lee และคณะ (2001) ใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* และใช้ HPLC ในการวัดปริมาณบีตากลูแคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การศึกษาโครงสร้างของบีตากลูแคนที่ได้จากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01

บีตากลูแคนจากยีสต์ประกอบด้วยพันธะบีตา 1,3 และมีกิ่งก้านที่เชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา 1,6 ไกลโคซิดิก หรือเรียกว่า บีตา 1,3/1,6 กลูแคน (Cabib และคณะ, 2001) ซึ่งอัตราส่วนของบีตา 1,3/1,6 กลูแคน สามารถอธิบายถึงความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันภายในร่างกายได้

การทดลองโดยใช้ความจำเพาะของเอนไซม์ exo-1,3 β-glucanase หรือexo-1,6 β-glucanase ต่อบีตากลูแคนที่สกัดได้และทำให้บริสุทธิ์(บางส่วน) พบว่าเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ exo-1,3 β-glucanase ได้ปริมาณกลูโคส 98 มิลลิกรัม และเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ exo-1,6 β-glucanase ได้ปริมาณกลูโคส 22 มิลลิกรัม ซึ่งสรุปได้ว่าบีตากลูแคนของเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 นั้นมีอัตราส่วนของพันธะบีตา 1,3 และมีกิ่งก้านที่เชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา 1,6 ไกลโคซิดิก เท่ากับ 4:1 ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งการที่มีบีตา 1,3 เป็นโครงสร้างหลักและมีกิ่งก้านที่เชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา 1,6 จะช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ดีขึ้น (Bohn และ Bemiller, 1995)

ตารางที่ 4.3 แสดงสัดส่วนของบีตา 1,3/1,6 กลูแคน ของเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01

ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัม)		สัดส่วนส่วนของ β-1,3: β-1,6
ย่อยด้วย exo-1,3 β-glucanase	ย่อยด้วย exo-1,6 β-glucanase	
98	22	4:1

4.8 การศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาล แอมโมเนียมซัลเฟตและแทนนินในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่ทำให้มีการเจริญและผลิตบีตากลูแคนสูงที่สุด

ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์และปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุด โดยการออกแบบการทดลองโดยใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) ซึ่งเป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติที่นำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวแปรหลายตัวแปร เพื่อหาค่าที่ดีที่สุดของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร ซึ่งจะแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรในรูปกราฟิกสามมิติ การวางแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) เป็นการทดลองที่ 3 ระดับ (-1, 0, +1) จะปรับตัวแปรที่ต้องการศึกษาไป ตัวแปรละ 3 ค่า โดยเลือกสภาวะการทดลองที่จำเป็น เพื่อให้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อมูลเพียงพอต่อการ สร้างแบบจำลองทางสถิติ โดย Model ที่ได้จะยังคงมีทั้ง Main Effect, Interaction และ Quadratic Terms เพื่อใช้ทรัพยากรไม่มากจนเกินไป

ศึกษาตัวแปรอิสระ 3 ตัวแปรที่เลือกใช้ในการศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของกากน้ำตาล (กรัม/ลิตร) (X_1), ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต(กรัม/ลิตร) (X_2) และ ปริมาณแทนนิน(กรัม/ลิตร) (X_3) โดยใช้โปรแกรม Design Expert Software (version 7.0) ในการประมวลผล ได้ปัจจัยค่าแกน (ระดับของตัวแปร) (1.682(+α), 1, 0, -1 และ -1.682(-α)) เมื่อนำปัจจัยค่าแกนทั้ง 3 ระดับ มาใช้ในการกำหนดเป็นค่าของตัวแปรอิสระ โดยค่า 1 และ -1 เป็นค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดในการออกแบบการทดลองของแต่ละตัวแปรตามลำดับ และโดยมีการออกแบบการทดลองทั้งหมด 20 การทดลอง และมีการทำซ้ำจุดกึ่งกลางทั้งหมด 6 ครั้ง

4.8.1 ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ

ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Squared) เป็นค่าที่ใช้บอกร้อยละการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามที่สามารถอธิบายได้ด้วยตัวแปรอิสระในสมการถดถอย (ประไพศรี และพงศ์ชนัน, 2551)

(1) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากตารางที่ 4.5 จะเห็นว่าค่า R-Squared มีค่าเท่ากับ 0.8755 หมายความว่า ตัวแปรอิสระ ได้แก่ กากน้ำตาล แอมโมเนียมซัลเฟต และแทนนิน สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามคือปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งได้ร้อยละ 87.55 แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าผลได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

(2) ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจของปริมาณบีตากลูแคน

จากตารางที่ 4.6 จะเห็นว่าค่า R-Squared มีค่าเท่ากับ 0.8786 หมายความว่า ตัวแปรอิสระ ได้แก่ กากน้ำตาล แอมโมเนียมซัลเฟต และแทนนิน สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามคือปริมาณบีตากลูแคนได้ร้อยละ 87.86 แสดงว่าแบบจำลองสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าผลได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การเก็บข้อมูลของ Central Composite Design สำหรับอาหารที่ความเข้มข้นต่างๆกับปริมาณเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 และปริมาณบีตากลูแคน

ลำดับการทดลอง	ปัจจัยที่ศึกษา			น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	บีตากลูแคน (กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)
	กากน้ำตาล (X_1) (%) (w/v)	แอมโมเนียมซัลเฟต (X_2) (%)(w/v)	แทนนิน (X_3) (%)(w/v)		
1	2.00	0.05	0.1	1.03	0.03
2	5.00	0.05	0.30	4.37	0.13
3	3.50	0.25	0.20	3.00	0.07
4	5.00	0.20	0.10	4.27	0.12
5	2.00	0.05	0.30	2.13	0.05
6	2.00	0.20	0.30	1.93	0.045
7	3.50	0.13	0.20	2.76	0.08
8	6.02	0.13	0.20	4.20	0.16
9	3.50	0.13	0.37	4.40	0.14
10	3.50	0.13	0.20	4.13	0.14
11	5.00	2.0	3.0	5.47	0.14
12	2.00	0.20	0.10	1.90	0.04
13	3.50	0.13	0.20	3.90	0.12
14	3.50	0.13	0.03	1.66	0.09
15	0.98	0.13	0.20	0.83	0.01
16	3.50	0.13	0.20	2.76	0.14
17	3.50	0.00	0.20	1.10	0.08
18	3.50	0.13	0.20	3.03	0.125
19	5.00	0.05	0.10	2.90	0.05
20	3.50	0.13	0.20	2.36	0.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

Factor	Coef	SE Coef	F value	P value
Intercept	3.14	0.26	7.87	0.0017
Molasses (X_1)	1.15	0.17	44.47	<0.0001
Ammonium sulfate (X_2)	0.46	0.17	7.25	0.0226
Tannin (X_3)	0.62	0.17	12.77	0.0051
X_1X_2	0.23	0.22	1.00	0.3410
X_1X_3	0.19	0.22	0.73	0.4124
X_2X_3	-0.17	0.22	0.55	0.4739
X_1^2	-0.12	0.17	0.51	0.4905
X_2^2	-0.29	0.17	2.88	0.1207
X_3^2	0.06	0.17	0.14	0.7191
R-Squared = 0.8755, Adj R- Squared = 0.7634				

4.8.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

การวิเคราะห์ความแปรปรวนเป็นการตรวจสอบแหล่งแปรผันของแบบจำลอง

(1) การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ในตารางที่ 4.7 พบว่า ค่า P-value ของเทอมอัตรกิริยามีค่าเท่ากับ 0.0017 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการทำนายปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งได้

(2) การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณบีตากลูแคน

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณบีตากลูแคน ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ในตารางที่ 4.8 พบว่า ค่า P-value ของเทอมอัตรกิริยามีค่าเท่ากับ 0.0016 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการทำนายปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์การถดถอยของพื้นผิวตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคน

Factor	Coef	SE Coef	F value	P value
Intercept	0.13	0.0091	8.04	0.0016
Molasses (X_1)	0.039	0.0060	41.06	<0.0001
Ammonium sulfate (X_2)	0.0049	0.0060	0.69	0.4267
Tannin (X_3)	0.015	0.0060	6.46	0.0293
X_1X_2	0.0094	0.0079	1.42	0.2612
X_1X_3	0.0094	0.0079	1.42	0.2612
X_2X_3	-0.0094	0.0079	1.42	0.2612
X_1^2	-0.017	0.0059	8.78	0.0142
X_2^2	-0.021	0.0059	12.72	0.0051
X_3^2	-0.0068	0.0059	1.34	0.2747
R-Squared = 0.8786, Adj R- Squared = 0.7694				

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

Source	Degree of Freedom	Sum of Square	Mean of Square	F value	P-value
Regression	9	28.49	3.17	7.81	0.0017
Lack of Fit	5	1.59	0.32	0.64	0.6796
Pure error	5	2.47	0.49		
Total	19	32.55			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคน

Source	Degree of Freedom	Sum of Square	Mean of Square	F value	P-value
Regression	9	0.036	0.0040	8.04	0.0016
Lack of Fit	5	0.0018	0.0004	0.59	0.7125
Pure error	5	0.0031	0.0006		
Total	19	0.041			

4.8.3 การสร้างสมการทำนายปริมาณของผลการทดลอง

การสร้างสมการทำนายปริมาณผลของการทดลองผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาล แอมโมเนียมซัลเฟตและแทนนินในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 โดยนำค่าของปัจจัยที่ได้จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของปริมาณการทดลองในตารางที่ 4.5 และ 4.6 มาเขียนให้อยู่ในรูปของสมการดังนี้

(1) การสร้างสมการทำนายปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง แสดงดังสมการที่ 4.1

$$\text{ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = 0.13 + 0.039X_1 + 0.015X_3 \quad (4.1)$$

เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (Lack of fit) ในตาราง 4.7 พบว่าค่า P-value ของ Lack off fit มีค่าเท่ากับ 0.6797 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 ทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบบจำลองนี้มีความเพียงพอของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งได้

(2) การสร้างสมการทำนายปริมาณบีตากลูแคน แสดงดังสมการที่ 4.2

$$\text{ปริมาณบีตากลูแคน (กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง)} = 3.15 + 1.15X_1 + 0.46X_2 + 0.62X_3 \quad (4.2)$$

เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (Lack of fit) ในตาราง 4.8 พบว่าค่า P-value ของ Lack off fit มีค่าเท่ากับ 0.7125 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 ทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบบจำลองนี้มีความเพียงพอของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายปริมาณบีตากลูแคนได้

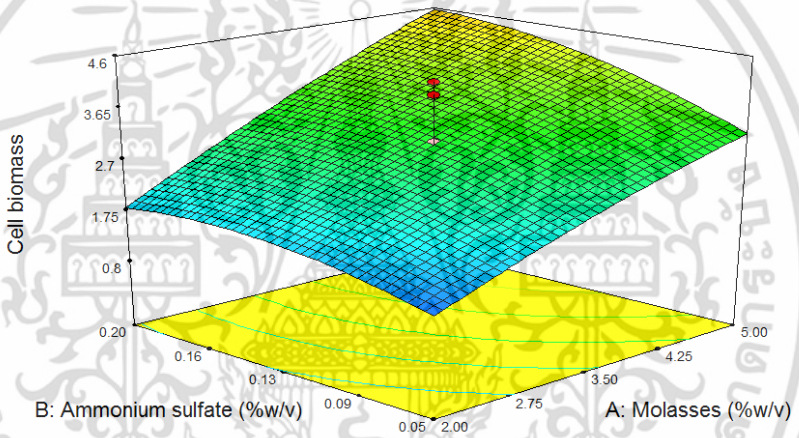
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8.4 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณผลการทดลอง

เมื่อได้สมการสำหรับทำนายผลการทดลอง จึงนำมาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองของผลการทดลอง

4.8.4.1 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง

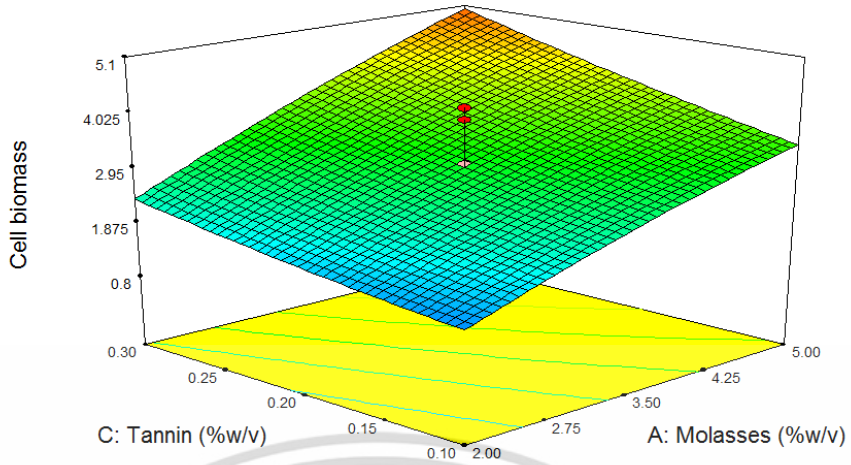
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ระหว่างกากน้ำตาล และแอมโมเนียมซัลเฟต ในภาพที่ 4.12 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด โดยกำหนดให้แทนนินที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.30% (w/v) จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ กากน้ำตาล 5% (w/v) และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.17% (w/v)



ภาพที่ 4.11 พื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นแทนนิน 0.3% (w/v)

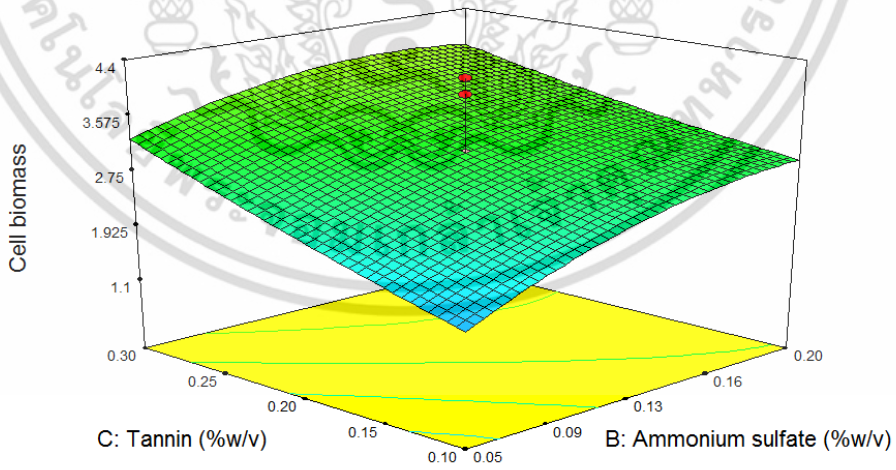
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ระหว่างกากน้ำตาลและแทนนิน ในภาพที่ 4.13 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด โดยกำหนดให้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.17% (w/v) จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ กากน้ำตาล 5% (w/v) และแทนนิน 0.30% (w/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 พื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างกากน้ำตาลและแทนนิน ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.17% (w/v)

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ระหว่างกากน้ำตาลและแทนนิน ในภาพที่ 4.14 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด โดยกำหนดให้กากน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตคงที่ 5% (w/v) จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ แอมโมเนียม 0.17% (w/v) และแทนนิน 0.30% (w/v)

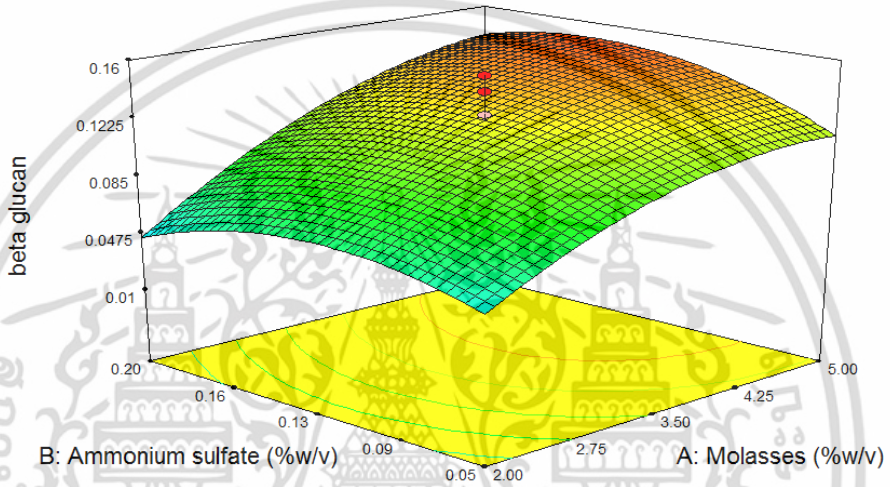


ภาพที่ 4.13 พื้นผิวตอบสนองของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งที่ผลิตได้ระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตและแทนนิน ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% (w/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8.4.2 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคน

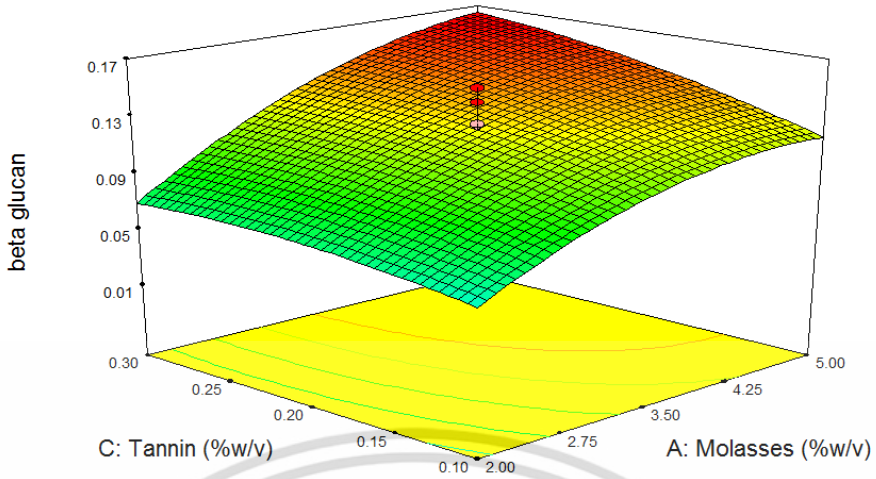
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคนที่ได้ระหว่างกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟต ในภาพที่ 4.15 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณบีตากลูแคนมากที่สุด โดยกำหนดให้แทนนินที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.30%(w/v) จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณบีตากลูแคนมากที่สุด คือ กากน้ำตาล 5%(w/v) และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.17% (w/v)



ภาพที่ 4.14 พื้นผิวตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้ระหว่างกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นแทนนิน 0.3% (w/v)

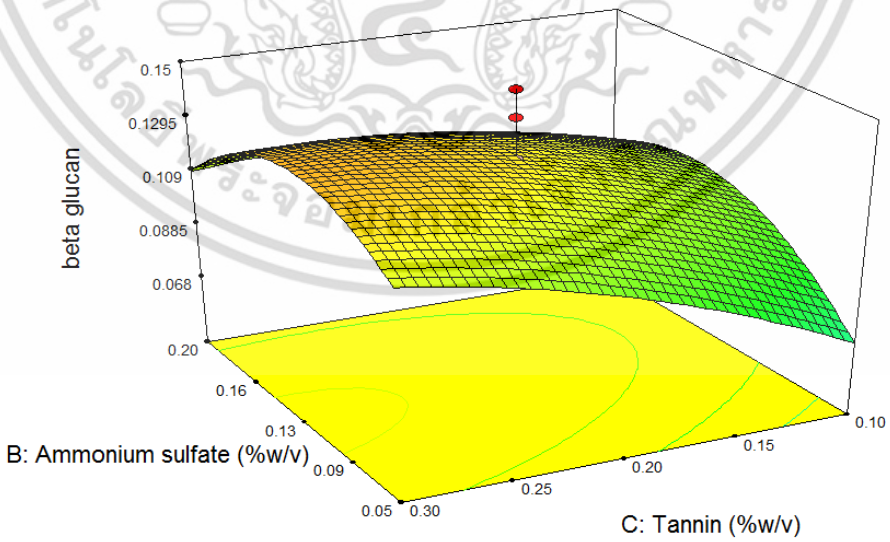
จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคนที่ได้ระหว่างกากน้ำตาล และแทนนิน ในภาพที่ 4.16 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณบีตากลูแคนมากที่สุด โดยกำหนดให้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการผลิตคงที่ 0.17%(w/v) จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณบีตากลูแคนมากที่สุด คือ กากน้ำตาล 5%(w/v) และแทนนิน 0.30%(w/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 พื้นผิวตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้ระหว่างกากน้ำตาลและแทนนิน ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.17% (w/v)

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคนที่ได้ระหว่างกากน้ำตาล และแทนนิน ในภาพที่ 4.17 เป็นกราฟลักษณะที่ให้ผลลัพธ์ดีที่สุด คือ ต้องการปริมาณบีตากลูแคนมากที่สุด โดยกำหนดให้กากน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตคงที่ 5%(w/v) จะพบว่า ค่าผลลัพธ์ที่ทำให้เกิดปริมาณบีตากลูแคนมากที่สุด คือ แอมโมเนียม 0.17%(w/v) และแทนนิน 0.30%(w/v)



ภาพที่ 4.16 พื้นผิวตอบสนองของปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้ระหว่างแอมโมเนียมซัลเฟตและแทนนิน ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 5% (w/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8.5 การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมพื่อให้ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุด ในโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ ใช้การวัดความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบสนอง (Desirability) ซึ่งค่าความพอใจของผลตอบสนองมีค่าอยู่ระหว่าง 0-1 ถ้า D มีค่าเท่ากับ 1 หมายถึง ผลตอบสนองนั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ค่าความพึงพอใจรวม เท่ากับ 0.977

จากการหาค่าปัจจัยที่เหมาะสม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของความเข้มข้นของกากน้ำตาล แอมโมเนียมซัลเฟตและแทนนินในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่ทำให้มีการเจริญและผลิตบีตากลูแคนสูงที่สุด คือ กากน้ำตาล 5%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.17%(w/v) และแทนนิน 0.30% (w/v) ซึ่งทำให้ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 5.26 กรัม/ลิตร และปริมาณบีตากลูแคน 0.16 กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. จากการติดสีของ Congo red เป็นการย้อมสีคาร์โบไฮเดรตพบว่า ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีแทนนินเป็นองค์ประกอบนั้น จะมีการติดสีแดงของ Congo red ที่ชัดเจนขึ้นที่บริเวณผนังเซลล์ แสดงว่าการเติมแทนนินส่งผลให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ยีสต์ที่เพิ่มขึ้นและส่งผลต่อปริมาณบีตากลูแคนที่สูงขึ้นด้วยและเมื่อนำเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร YM และอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% เมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ครบ 36 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาทีเท่ากัน

2. การหาเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ผลการทดลองพบว่าที่เวลาการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด 3.79 กรัมต่อลิตร และลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 36 ชั่วโมง โดยชั่วโมงที่ 48 และ 60 มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.98 และ 2.99 กรัม/ลิตรตามลำดับ ดังนั้นเวลาที่ทำให้ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์สูงที่สุด คือ 36 ชั่วโมง และการเปรียบเทียบผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินและไม่มีแทนนิน ผลการทดลองพบว่ายีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.97 กรัม/ลิตร และปริมาณบีตากลูแคน 119.47 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสูงกว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมแทนนิน คือมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.33 กรัม/ลิตร และปริมาณบีตากลูแคน 86.19 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแทนนิน 0.1% และผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์ (Yp/x) มากกว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมแทนนินประมาณ 1.2 เท่า จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแทนนินสามารถกระตุ้นเซลล์ยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ได้

3. ผลของปริมาณเชื้อต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ และปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 โดยวิธีการหมักแบบกะ ที่ปริมาตร 5 ลิตร ศึกษาความเร็วรอบในการกวน 3 ระดับได้แก่ 100 200 และ 400 รอบต่อนาที และศึกษาอัตราการให้อากาศ 2 ระดับ ได้แก่ 0.5 และ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

vvm เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0 4 8 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าปริมาณยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 แปรผันตรงกับความเร็วรอบในการกวนเป็นหลัก โดยเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการกวนปริมาณเซลล์ยีสต์จะเพิ่มขึ้น โดยความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที ให้ปริมาณเซลล์ยีสต์สูงที่สุด ซึ่งอัตราการให้อากาศที่ 0.5 vvm และ 1 vvm ในระดับการกวน 400 รอบต่อนาที ได้ปริมาณเซลล์ที่เท่ากันที่ชั่วโมงที่ 36 คือ 2.24×10^8 CFU/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าอัตราการให้อากาศไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ในความเร็วรอบสูง แต่อัตราการกวนต่ำ คือ 100 และ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่มากกว่าจะให้ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่สูงกว่า ผลของอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 พบว่าสภาวะการหมักที่ความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm มีค่าผลของอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สูงที่สุด คือ 0.40 h^{-1} แต่ผลของอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) สูงที่สุดในสภาวะการหมักที่ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm คือ 8.96 h^{-1}

ผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolve Oxygen, DO) พบว่าในความเร็วรอบการกวนที่ต่ำ ได้แก่ 100 และ 200 รอบต่อนาที ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่าเกือบเป็นศูนย์ในชั่วโมงที่ 4 แสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนหมด ทำให้ผลิตมวลเซลล์ได้น้อย ในความเร็วรอบการกวนที่สูง คือ 400 รอบต่อนาที ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลงต่ำสุดในชั่วโมงที่ 12 เชื้อเจริญอยู่ในช่วง exponential phase ซึ่งยังเหลือมากพอสำหรับใช้ในการเจริญของเซลล์และการผลิตบีตากลูแคน โดยในชั่วโมงที่ 12 ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 vvm มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำคงเหลือ 54.51 % ส่วนความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำคงเหลือสูงกว่า คือ 63.65% ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่เหลือมากกว่าส่งผลให้มีการเจริญของเชื้อและผลิตบีตากลูแคนได้สูงกว่า

ผลการทดลองของปริมาณบีตากลูแคนที่ผลิตได้จากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่การเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง ในถังหมักแบบกะที่ระดับการผลิต 5 ลิตร พบว่าปริมาณบีตากลูแคนแปรผันตรงกับความเร็วรอบในการกวนและอัตราการให้อากาศ โดยความเร็วรอบการกวนในระดับสูงคือ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm ให้ปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุด คือ 181.94 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง และพบว่าสภาวะการหมักที่ความในการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm ให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์ (Yp/x) สูงที่สุด คือ 30.53 แสดงให้เห็นว่าความเร็วรอบในการกวนและอัตราการให้อากาศที่สูง ทำให้ได้ปริมาณบีตากลูแคนที่สูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาผลของน้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณบีตากลูแคนของยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 เปรียบเทียบระหว่างในอาหารกากน้ำตาลที่มีแทนนินและไม่มีแทนนิน ในสภาพวิธีการหมักแบบกะ ที่ระดับการผลิต 5 ลิตร เมื่อเปรียบเทียบผลของปริมาณเซลล์ และปริมาณบีตากลูแคน ในถังหมักที่มีระดับการผลิต 5 ลิตร ในสภาวะที่มีความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างอาหารที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 3%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%(w/v) ที่เติมแทนนิน 0.1%(w/v) และไม่เติมแทนนิน ผลการทดลองพบว่าเมื่อมีการเติมแทนนินทำให้ได้ปริมาณเซลล์ และปริมาณบีตากลูแคน 2.3×10^8 CFU/มิลลิลิตร และ 237 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ ในขณะที่ไม่มีการเติมแทนนินในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ปริมาณเซลล์ และปริมาณบีตากลูแคนเท่ากับ 2.7×10^8 CFU/มิลลิลิตร และ 181 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเติมแทนนินทำให้ได้ปริมาณบีตากลูแคนสูงกว่าและช่วยให้มีการผลิตบีตากลูแคนที่เสถียรไม่ลดลงเมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมแทนนินที่มีปริมาณบีตากลูแคนลดลงในชั่วโมงที่ 36 นอกจากนี้พบว่ายีสต์ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาลที่เติมแทนนิน 0.1% มีผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อมวลเซลล์ (Yp/x) สูงกว่ายีสต์ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมแทนนิน 1.5 เท่า แสดงให้เห็นว่าแทนนินสามารถกระตุ้นการผลิตบีตากลูแคนได้

5. การศึกษาผลการสกัดบีตากลูแคนและทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 โดยสกัดบีตากลูแคนด้วยวิธี Alkaline extraction และนำไปทำให้บริสุทธิ์(บางส่วน) โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟี คือ DEAE-Toyopearl และ Concavalin A พบว่าปริมาณบีตากลูแคนที่ได้จากเซลล์ยีสต์ที่มีการกระตุ้นด้วยแทนนินมีปริมาณเท่ากับ 52.5 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักของเซลล์ ในขณะที่ปริมาณบีตากลูแคนที่ได้จากเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยแทนนินมีปริมาณเท่ากับ 12.4 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักของเซลล์ เพราะฉะนั้นแทนนินสามารถกระตุ้นให้เซลล์ยีสต์สามารถสร้างบีตากลูแคนได้ปริมาณมากขึ้น

6. การศึกษาโครงสร้างของบีตากลูแคนที่ได้จากยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 การทดลองโดยใช้ความจำเพาะของเอนไซม์ exo-1,3 β-glucanase หรือexo-1,6 β-glucanase ต่อบีตากลูแคนที่สกัดได้และทำให้บริสุทธิ์(บางส่วน) พบว่าเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ exo-1,3 β-glucanase ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณกลูโคส 98 มิลลิกรัม และเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ exo-1,6 β-glucanase ได้ปริมาณกลูโคส 22 มิลลิกรัม ซึ่งสรุปได้ว่าบีตากลูแคนของเซลล์ยีสต์ S. carlsbergensis RU01 นั้นมีอัตราส่วนของพันธะบีตา 1,3 และมีกิ่งก้านที่เชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา 1,6 ไกลโคซิดิก เท่ากับ 4:1 จากอัตราส่วนนี้พบว่าสายบีตา 1,3 เป็นโครงสร้างหลักและมีกิ่งก้านที่เชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา 1,6 จะช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ดีขึ้น

7. การศึกษาศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาล แอมโมเนียมซัลเฟตและแทนนินในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่ทำให้มีการเจริญและผลิตบีตากลูแคนสูงที่สุด แสดงในรูปของสมการสำหรับทำนายปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง คือ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) = $0.13 + 0.039X_1 + 0.015X_3$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เท่ากับ 0.8755 สมการที่ใช้สำหรับทำนายปริมาณบีตากลูแคน คือ ปริมาณบีตากลูแคน (กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง) = $3.15 + 1.15X_1 + 0.46X_2 + 0.62X_3$ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ เท่ากับ 0.8786 เมื่อนำมาหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของความเข้มข้นของกากน้ำตาล แอมโมเนียมซัลเฟต และแทนนินในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงยีสต์ *S. carlsbergensis* RU01 ที่ทำให้มีการเจริญและผลิตบีตากลูแคนสูงที่สุด คือ กากน้ำตาล 5%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.17%(w/v) และแทนนิน 0.30%(w/v) ซึ่งทำให้ได้ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง 5.26 กรัม/ลิตร และปริมาณบีตากลูแคน 0.16 กรัม/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. จากการออกแบบการทดลองแบบผิวสัมผัสพบว่าความเข้มข้นของอาหารที่ประกอบด้วยกากน้ำตาล 5%(w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.17%(w/v) และแทนนิน 0.30%(w/v) น่าจะทำให้การผลิตปริมาณเซลล์และปริมาณบีตากลูแคนสูงที่สุด เพราะฉะนั้นควรใช้ในการปริมาณนี้ในการทดลองต่อไป
2. ควรศึกษาอัตราความเข้มข้นของออกซิเจนและชนิดของถังปฏิกรณ์เพิ่มเติมต่อการปริมาณบีตากลูแคน
3. ควรศึกษาขนาดของบีตากลูแคนที่สกัดได้เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและทางยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กนกวรรณ แก้วแกมเสือ. 2547.การศึกษาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักกากน้ำตาลในโรงงานบริษัทแสงโสม จำกัด จ. กาญจนบุรี. สารนิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2510. กากน้ำตาล. วารสารน้ำตาล

ขวัญใจ กนกเมธากุล. 2535. เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์. 2549. การพิสูจน์เพื่อระบุชื่อยีสต์ที่แยกจากดิน. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวรคณะแพทย์ศาสตร์.

นฤมล โตอ่อน. 2549. ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์. 2547. การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และ พงศ์ชนัน เหลืองไพบูลย์. 2551. การออกแบบและวิเคราะห์หารทดลอง. กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์ท้อป, 277-280

ปาวลี ศรีสุขสมวงศ์. 2550. การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินา พลาเทนซิส ซีเอ็มยู ด้วยน้ำกากส่าเหล้าในระบบบ่อเพาะเลี้ยงน้ำวน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ประกร รามกุล .2553. นวัตกรรมตัวดูดซับแทนนินในการแยกโลหะจากสารละลาย. 72:17–29

สมจิตร อยู่เป็นสุข. 2552. รำวิทยา (Mycology). เชียงใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีและ. 2549. ยีสต์: คุณประโยชน์อุตสาหกรรม (Yeast: valuable assets). กรุงเทพมหานคร: สำนักงานนนวัตกรรมแห่งชาติ.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2541. จุลชีววิทยาทางอาหาร(Food Microbiology). พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: ชัยเจริญ. 248 น.

อัญมณี ปิณฑะบุตร. 2540. การสกัดสารแทนนินจากเปลือกลูกตาล. ภาควิชาเคมี คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบุรี.

Adachi, Y., Ohno, N., Ohsawa, M., Oikawa, S. And Yadomae, T. 1990. Change of Biological Activities of (1⟶3)-β-D-Glucan from Grifola frondosa upon Molecular Weight Reduction by Heat Treatment. Chemical and Pharmaceutical Bu.

Aguilar, U. B. and François, J.M. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letters in Applied Microbiology. 37: 268-274.

Akramiene, D., Kondrotas A., Didziapetriene J. and Kevelaitis E. 2007. Effects of beta-glucans on the immune system. Medicina (Kaunas). 8: 597-606.

Ann, V. M.and Alessandro, M. 1993. A Taxonomic Key for the Genus Saccharomyces. Systematic and Applied Microbiology. 16: 113-119.

Araujo, V. B. D. S., Melo, A. F., Costa, A. G., Magnani, M. 2013. Followed extraction of β-glucan and mannoprotein from spent brewer's yeast (Saccharomyces uvarum) and application of the obtained mannoprotein as a stabilizer in mayonnaise Innovative Food Science & Emerging Technologies.

Babineau, T. J., Hackford, A., Kenler, A., Bistrian, B., Forse, R.A., Fairchild, P. G., Heard, S., Keroack, M., Caushaj. P. and Benotti. P. 1994. A phase II multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of three dosages of an immunomodulator (PGG-glucan) in high-risk surgical patients. Archives of Surgery. 129: 1204–1210.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Banchathanakij, R. and Suphantharika, M. 2009. Effect of different β-glucans on the gelatinisation and retrogradation of rice starch. Food Chemistry. 114: 5-14.

Bandaiphet, C. and Prasertsan, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, KLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. Carbohydrate Polymers. 66: 216-228

Barsanti, L., Passarelli, V., Evangelista, V., Frassanito, A.M. and Gualtieri, P. 2011. Chemistry, physico-chemistry and applications linked to biological activities of β-glucans. Natural Product Reports. 3: 457-466.

Bohn, J. A., BeMiller, J. N., 1995. (1⟶3)-β-d-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. Carbohydrate Polymers. 28: 3-14.

Bohn, J.A., BeMiller, J.N. 1995. (1⟶3)-β-d-glucans as biological response modifiers. A review of structure-fuctional activity relationships. Carbohydrate Polymers. 28: 3-14.

Borsting, C., Hummel, R., Schultz, E. R., Rose, T. M. and Pedersen M. B. 1997. *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional genes encoding the acyl-CoA binding protein, one similar to the ACB1 gene from S. cerevisiae and one identical to the ACB1 gene from *S. monacensis*. Yeast. 13: 1409–1421.

Cabib, E., D. H. Roh, M. Schmidt, L. B. Crotti and A. Varma, 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis.The Journal of Biological Chemistry. 276: 19679–19682.

Cabib, E., Dong-Hyun, R., Schmidt, M., Crotti, L. B. and Varma, A. 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. The Journal of Biological Chemistry. 276: 19679–19682.

Cabib, E., Silverman, . J., Shaw, A., Das Gupta, S., Park, H.M.,Mullins,. T., Mol, P. C and Bowers, B. 1991. Carbohydrates as structural constituents of yeast cell wall and septum. Pure and Applied Chemistry. 63: 483-489

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cabib, E., T. Drgon., J. Drgonova., R. A. and Ford, R. Kollar. 1997. The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. Biochemical Society Transactions. 25: 200–204.

Calik, P., Calik, G. and Ozdamar, T. H. 2000. Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. Biotechnology and Bioengineering. 69: 301-311.

Catley, B. J. 1988. Isolation and analysis of cell walls. In Campbell D. and Duffus. Yeast.163–183

Chachaichaovivat, A. 2010. Yeast beta-glucan: Food supplement for immune system. Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning. 2: 113-118.

Damerow, P. 2012. Sumerian beer: the origins of brewing technology in ancient Mesopotamia. Cineiform Digital Library. 2: 1–20.

Daou, C and Zhang, H. 2012. Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 11: 355–365.

Dellinger, E. P., Babineau, T. J., Bleicher. P., Kaiser. A. B., Seibert. G. B. and Postier, R.G., Vogel SB., Norman J., Kaufman D., Galandiuk S., Condon RE. 1999. Effect of PGG-glucan on the rate of serious postoperative infection or death observed after high-risk gastrointestinal operations. Betafectin Gastrointestinal Study Group. Archives of Surgery. 134: 977-983.

Demir, G., Klein, H. O., Mandel-Molinas, N. and Tuzuner N. 2007. β-glucan induces proliferation and activation of monocytes in peripheral blood of patients with advanced breast cancer. International Immunopharmacology. 7: 113–116.

Dengis, P.B., Nelissen, L. R. and Rouxhet, P. G. 1995. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top and bottom-fermenting strains. Applied and Environmental Microbiology. 61: 718–728.

Diluzio, N.R. 1983. Immunopharmacology of glucan: A broad spectrum enhancer of host defense mechanisms. Trends in Pharmacological Sciences. 4: 344-347.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Diwan, J. J. 1972. Effects of tannic acid on ion transport in rat-liver mitochondria. Archives of Biochemistry and Biophysics. 151: 316–321.

Douaud, C. 2007. Finnish collaboration expands industry uses for beta-glucan. Europe http://www.nutraingradients.com/Industry/Finnish -collaboration-exp.

Du, B., Bian, Z. and Xu B. 2014. Skin health promotion effects of natural beta-glucan derived from cereals and microorganisms: a review. Phytotherapy Research. 28: 159-166.

Du, B., Lin, C.Y., Bian, Z.X. and Xu B.J. 2015. An insight into anti-inflammatory effects of fungal β-glucan. Trends in Food Science & Technology. 41: 49–59.

Ensley, H. E., Tobias, B., Pretus, H. A., McNamee, R. B., Jones, E. L., Browder, I. W. and Williams, D. L. 1994. NMR spectral analysis of a water-insoluble (1⟶3)-beta-D-glucan isolated from Saccharomyces cerevisiae. Carbohydrate Research. 258: 307-311.

Estrada, A., Yun, C. H., Van, K. A., Li, B., Hauta, S. and Laarveld, B. 1997. Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo. Microbiology and Immunology. 41: 991-998.

Fuller, R. 2010. The Importance of Innate Immune Function in Disease Management and Prevention: 1-3, 1-6 Beta glucan Supplementation Advice. Retrieved from Web site: http://www.doveclinic.com/downloads/.../ImmiflexDoveWebsiteInfo.

Garcia, O. F, Santos, V.E, Casas, J.A, Gomez, E. 2000. Xanthan gum: production, recovery, and properties.Biotechnology Advances. 18: 549-579.

Gardiner, T. 2000. A review: Beta-glucan biological activities.

Ha, C. H., Y. T. Kim, S. T. Lim, C. W. Kim, and H. I. Chang. 2002. Analysis of alkali-soluble glucan produced by Saccharomyces cerevisiae wild-type and mutants. Applied Microbiology. Biotechnol. 58: 370-377

Hamill, W. H. and R. R. Williams, Jr. 1959. Principles of Physical Chemistry. Englewood Cliffs, NJ:Prentice-Hall, Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Harris, C.M., and Livingstone, S.E. 1964. Bidentate chelates. In Chelating agents and metal chelates. Edited by F.P. Dwyer and D.P. Mellor. Academic Press, New York. 95–134.

Haslam, E., and Lilley, T.H. 1988. Structural astringency in foodstuffs-A molecular interpretation.Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 27: 1–40.

Hobson, J. C. and Greenshields, R. N. 1996. Water insoluble coloring agent. United States Patent and Trademark Office. 5: 545.557.

Hohmann, S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66: 300-72.

Hong, F., Yan, J., Baran, J. T., Allendorf, D. J., Hansen,R. D. and Ostroff, G. R. 2004. Mechanism by which orally administered β-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. The Journal of Immunology. 173: 797-806.

Jafari, A. R., Sarrafzadeh, M. H., Alemzadeh, I. and Vosoughi, M. 2007. Effect of stirrer speed and aeration rate on the production of glucose oxidase by Aspergillus niger. The Journal of Biological Sciences. 7: 270-275.

Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., De, L.C. J., Llobell, A., Douwes, J. E., Shimoi, H., Lipke, P. N. and Klis, F. M. 1996. Retention of Saccharomyces cerevisiae cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. Glycobiology. 3: 337-345.

Kath, F and Kulicke, W. M. 1999. Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Die Angewandte Makromoleculare Chemie. 268: 59-68.

Keller, G.A. 1967. Molasses. Encyclopedia of Chemical Technology.13

Keynodle, D. S., Gate, H. and Kaiser, A. B. 1998. Prophylactic Anti-Infective Activity of Poly-1-6-β-d-Glucopyranosyl-1-3- β-d-Glucopyranose Glucan in a Guinea Pig Model of Staphylococcal Wound Infection. Antimicrobial agents and chemotherapy. United States: American Society for Microbiology. 42: 545-549.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim, K. H. and Yun, H. S. 2006. Production of soluble β-glucan from the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. Enzyme and Microbial Technology. 39: 496-500

Kim, S., Hwang, H. J., Xu, C. and Yun, J, W. 2003. Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an enthomopathogenic fungus Paecilomices sinclarii. Letters in Applied Microbiology 36: 321-326.

Kim, Y.H., Kang, S. W., Lee, J.H., Chang, H.L., Yun, C. W., Paik, H. D., Kang, C. W. and Kim, S. W. 2007. High Cell Density Fermentation of Saccharomyces cerevisiae JUL3 in Fed-batch Culture for the Production of β-Glucan. Journal of Industrial & Engineering Chemistry. 13: 153-158

Kittisuban, P.. Ritthiruangdej, P. and Suphantharika, M. 2004.Optimization of hydroxypropylmethyl cellulose, yeast β-glucan, and whey protein levels based on physical properties of gluten-free rice bread using response surface methodology. Food Science and Technology. 57:738-748.

Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. and Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. Federation of European Microbiological Societies. 26: 239-256.

Kogan, G. and A. Kocher. 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. Livestock Science. 109:161-165.

Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J.Ashwell, G., Drgonova, J., Kaptein, J.C., Klis, F.M. and Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall β-(1-6)-glucan interconnects mannoprotein, β-(1-3) glucan and chitin. The Journal of Biological Chemistry. 272: 17762-17775.

Kopecka, M. and Gabriel, M. 1992. The influence of congo red on the cell wall and (1→3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Archives of Microbiology. 158: 115-26.

Kwiatkowski S., Thielen, U., Glenny, P. and Moran, C. 2009. A study of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall glucans. The Institute of Brewing and Distilling. 115: 151-158.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Laroche C., Michaud P. 2007. New developments and prospective applications for beta (1,3) glucans. Recent Patents on Biotechnology. 1: 59-73.

Lee S., Inglett G. E., Palmquist D. and Warne K. 2009. Flavor and texture attributes of foods containing beta-glucan-rich hydrocolloids from oats. Food Science and Technology. 42: 350-357.

Lee, J. N., Lee, D. Y., Kim, G. E., Kim, H. N., Sohn, J., Kim, S. and Kim, C.W. 2001. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from cell wall of yeast. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 65: 831-841.

Lee, J.N., Lee, D.Y., Ji, I.H., Kim, G.E., Kim, H.N., Sohn, J., Kim, S. and Kim, C.W. 2001. Purification of soluble beta-glucan with immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 65: 837-941

Lessage, G and Bussey, H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology. 70: 317-343.

Lipke, PN., Ovalle, R. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. Journal of Bacteriology. 180: 3735-3740

Logothetis, S., Graeme, M. Walker. and Elias T. Nerantzis. 2007. Effect of salt hyperosmotic stress on yeast cell viability. Journal Proceedings for Natural Sciences of Matica Srpska Novi Sad 13: 271-284

Logothetis, S., Nerantzis, E.T., Gioulioti, A., Kanelis, T., Panagiotis, T. and Graeme Walker. 2010. Influence of sodium chloride on wine yeast fermentation performance. International Journal of Wine Research. 2: 35–42

Manners, D. J., Masson, A. J., Patterson, J. C., Bjorndal, H. and Lindberg L. 1973. The structure of β-(1⟶6)-D-glucan from Yeast cell wall. Biochemical Journal. 135: 19-30.

Mantzouridou, F., Roukas, T. and Kotzekidou, P. 2002. Effect of the aeration rate and agitation speed on β-carotene production and morphology of Blakeslea trispora in a stirred tank reactor: mathematical modeling. Biochemical Engineering Journal. 10: 123–135.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Marinescu, G., Stoicescu, A, Patrascu, L. 2011. The preparation of mayonnaise spent yeast Beta-glucan as fat replacer. Romanian Biotechnological Letter. 16 :6017-6025.

McGovern, P. E., Zhang J., Tang J., Zhang Z., Hall G. R. and Moreau R. A. 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 101: 17593–17598

Mckinney, R.E. 1953. Staining bacterial polysaccharides.

Mcmurrough I., Rose A. H. 1967. Effect of growth rate and substrate limitation on the composition and structure of the cell wall of Saccharomyces cerevisiae. Biochemical. 1: 189-203.

Megazyme. 2011. Enzymatic yeast betaglucan. Ireland: Megazyme International

Michaela, H., Zuzana, P., Alena, B., Frantisek, G. 2011. Andrea Hlinkova 1,3 and Ernest Sturdík. Cereal β-glucans and their Significance for the Preparation of Functional Foods. Czech Journal of Food Sciences. 29: 1-14

Mila, I., Scalbert, A., and Expert, D. 1996. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots.Phytochemistry (OXF). 42: 1551–1555.

Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31: 426–428

Miura, N. N., Ohno, N., Aketagawa, J., Tamura, H., Tanaka, S. and Yadomae, T. 1996. Blood clearance of (1-->3)-beta-D-glucan in MRL lpr/lpr miceFEMS Immunology and Medical Microbiology. 13: 51-57.

Mizuno, T. 1996. Development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. Foods & food ingredients journal of Japan. 167: 69–85.

Mongkontanawat, N., Sanguandeekul, R.,Prakitchaiwattana, C., Xiao, H., McLandsborough, L.A. and Methacanon, P. 2011. Effect of three additives on the cell morphology and β-glucan production in Saccharomyces cerevisiae. Research Journal of Phamaceutical, Biological and Chemical Science. 2: 283-295.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Morris, G. J., Winters, L., Coulson, G. E. & Clarke, K. D. 1986. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Journal of General Microbiology .132: 2023–2034.

Naruemon, M., Romanee, S., Cheunjit, P. and Pawadee, M. 2013. Influence od Additives on Saccharomyces cerevisiae β-glucan production. International Food Research Journal. 20: 1953-1959

Nemoto, J., Ohno, N., Saito, K., Adachi, Y. and Yadomae T. 1993. Expression of interleukin 1 family mRNAs by a highly branched (1-->3)-beta-D-glucan, OL-2. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 16: 1046-1050.

Novak, M. and Vetvicka, V. 2008. Beta-glucans, history, and the present: immunomodulatory aspects and mechanisms of action. Journal of Immunotoxicology. 5: 47-57.

Oda, Y. and K. Tonomura. 1993. Selection of a novel baking strain from the Torulaspora yeasts. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 57: 1320-1322.

Onderdonk, A. B., Cisneros, R. L., Hinkson, P and Ostroff, G. 1992. Anti-infective effect of poly-beta 1-6-glucotriosyl-beta 1-3-glucopyranose glucan in vivo. Infection and immunity. 1642-1647.

Osumi, M. 1998. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. Micron. 2-3: 207-233.

Patchen, M. L., D Alesandro, M. M. and Brook I. 1987. Glucan: mechanisms involved in its ‘radioprotective’ effect. Journal of Leukocyte Biology. 42: 95–105.

Pramanik, M., Mondal, S., Chakraborty, I., Rout, D. and Islam S.S. 2005. Structural investigation of a polysaccharide (FR. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, Pleurotus sajor-caju. Carbohydrate Research. 340: 629-636.

Quirce, S., Caballero, P. A., Vela, A. J., Villanueva, M. and Ronda Felicida. 2018. Impact of yeast and fungi (1 ⟶ 3)(1 ⟶ 6)-β-glucan concentrates on viscoelastic behavior and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bread making performance of gluten-free rice-based doughs. Food Hydrocolloids. 79: 382-390.

Raikos, V., Grant, S. B., Ranawana, H.V. 2018. Use of β-glucan from spent brewer's yeast as a thickener in skimmed yogurt: Physicochemical, textural, and structural properties related to sensory perception. Journal of Dairy Science.

Raja, P.B., Rahim, A. A., Quresh, A.K. and Awing K. 2014. Green synthesis of silver nanoparticles using tannins. Materials science-Poland. 408-413.

Reed, G., Nagodawithana, T. W. 1991. Yeast-derived products and food and feed yeast. In: Yeast Technology. 369-440.

Reess, M. 1870. Botanische Untersuchungen uber die Alkoholgarhungspilze. Leipzig: Felix.

Rinaldi, A., Blaiotta, G., Aponte, M. and Moio, L. 2016. Effect of yeast strain and some nutritional factors on tannin composition and potential astringency of model wines. Food Microbiology. 53: 128-134

Rodriguez, Navarro A, Ortega MD. 1982. The mechanism of sodium efflux in yeast. FEBS Lett. 138: 205–208.

Roh, D. H., Bowers, B., Riezman, H. and Cabib, E. 2002a. Rho1p mutations specific for regulation of β(1—>3)glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. Microbiology. 44: 1167–1183.

Ross, G.D., Vetvicka, V., Yan, J., Xia, Y., Vetvickova, J. 1999. Immunopharmacology, 42: 61-74.

Salvador, C., Li, B., Hansen R., Cramer, D.E., Kong, M. and Jun Y. 2008. Yeast-Derived {beta}-Glucan Augments the Therapeutic Efficacy Mediated by Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody in Human Carcinoma Xenograft Models. Clinical Cancer Research. 14: 1239–1247.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Samragy, E.L. and Y.A.Zall, R.R. 1988. The influence of sodium chloride on the activity of yeast in the production of single cell protein in whey permeate. Journal of Dairy Science

Schnierda, T., Bauer, F. F, Divol, B., Van, R. E, Gorgens, J.F. Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-Saccharomyces wine yeasts. Letters in Applied Microbiology. 58: 478-485.

Seeley, R. D. 1977. Fractionation and utilization of baker's yeast. Technical Quarterly. 14: 35-39.

Shahinian, S. 1998. Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 149: 843–856.

Shematek, E.M. 1980. Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of beta-(1 leads to 3) glucan synthetase. The Journal of Biological Chemistry. 255: 888-894

Singleton, V. L., and Eseau, P. 1969. Processing and phenolic inter-actions. In Phenolic substances in grapes and wine and their sig-nificance. Advances in food technology (Suppl. I). AcademicPress, New York. 1–282.

Stack , H. M., Kearney, N., Stanton, C., Fitzgerald, F. G. and Ross, P. R. 2010. Association of Beta-Glucan Endogenous Production with Increased Stress Tolerance of Intestinal Lactobacilli. Applied and Environmental Microbiology. 76: 500–507.

Stone and Clarke. 1992. Chemistry and biology of (1,3)-β-D-glucan, La Trobe University Press, Victoria, Australia

Stone, B.A. 2009. Chemistry, Biochemistry and Biology of (1⟶3)-β-Glucans and Related Polysaccharides. 5–47

Sucher, R. E., Robbins, E. A., Sidoti, D. R., Schuldt Jr. E. H. and Seeley R. D. 1975. Yeast glucan and process of making the same. US Patent.

Takahashi, T., Yamazaki, Y., Kato, K. 1978. β-1,3-glucan derivatives US Patent

Tam, T. M., N. Q. Duy, N. P. Minh, D. T. A. Dao. 2013. Optimization of BetaGlucan extraction from waste brewer's yeast Saccharomyces cerevisiae using autolysis, enzyme, ultrasonic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and combined enzyme-ultrasonic treatment, American Journal of Research Communication. 11: 149-158.

Thabet, S., Gayet, M., Dappozze, F., Cotton, P. and Guillard, C. 2013. Photocatalysis on yeast cells: Toward targets and mechanisms. Applied Catalysis B: Environmental. 140-141: 169-178.

Thammakiti, S., Suphantharika,, M., Phaesuwan, T. and Verduyn, C. 2004. Preparation of spent brewer's yeast ß-glucans for potential applications in the food industry. International Journal of Food Science & Technology. 39: 21-29

The National Innovation Agency (NIA). 2005. Yeast Products. Chonburi, Thailand.

ThermoSpectroni .2002. Spectronic Educator Spectrophotometer Operator's Manual. ThermoSpectronic, Inc.

Thomas, M. J. and Christopher C. N. 1987. Acceleration of the rate of ethanol fermentation by addition of nitrogen in high tannin grain sorghum. Biotechnol. And Bioengineering. 30: 1073-1076

Tzianabos, A. O., Gibson, F. C., Cisneros, R. L., Kasper, D. L. 1998. Protection against experimental intraabdominal sepsis by two polysaccharide immunomodulators. The Journal of Infectious Diseases. 178: 200-206.

Uscanga A. B., François JM. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letters in Applied Microbiology. 3: 268-274.

Varela, C., Borneman, A.R. 2017. Yeasts found in vineyards and wineries. Yeast. 34:111-128

Varelas V., Tataridis P., Liouni1 M., Nerantzis E.T. 2016 Application of different methods for the extraction of yeast β-glucan. Journal of Science & Technology. 75-89

Vetvicka ,V., Dvorak, B., Vetvickova, J., Richter, J., Krizan, J., Sima, P. and Yvin J. C. 2007. Orally administered marine (1-->3)-beta-D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. International Journal of Biological Macromolecules. 40: 291-298.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vetvicka V. 2007. Orally administered marine (1-->3)-beta-D-glucan Phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. International Journal of Biological Macromolecules

Vetvicka, V., K. Aterrayama, R. Mandeville, P. Brousseau and B. Kournikakis. 2002. Pilot study: Orally-administered yeast β1, 3-glucan prophylactically protects against anthrax infection and cancer in mice. American Nutrition Association. 5: 1-5.

Vetvicka, V., Terayama, K., Mandeville, R., Brousseau, P., Kournikakis, B., Ostroff, G., 2002. Pilot Study: Orally-Administered Yeast β1,3-glucan Prophylactically Protects Against Anthrax Infection and Cancer in Mice. The Journal of the American Nutraceutical Association. 5

Vizhi, V.K. and Many, J.N. 2014. Study on estimation, extraction and analysis of barley beta-glucan. International Journal of Science and Research. 3: 1480–1484

Volman JJ., Helsper JP., Wei S., Baars JJ., van Griensven LJ., Sonnenberg AS., Mensink RP., Plat J. 2010. Effects of mushroom-derived beta-glucan-rich polysaccharide extracts on nitric oxide production by bone marrow-derived macrophages and nuclear factor-kappa B transactivation in Caco-2 reporter cells: can effects be explained by structure. Molecular Nutrition & Food Research. 54: 268-76.

Vu, V. H. and Kim, K.. High-cell-density fed-batch culture of Saccharomyces cerevisiae KV-25 using molasses and corn steep liquor.

Wagner, H., Stuppner, H., Schafer, W., and Zenk, M. 1988. Immunologically active polysaccharides ofEchinacea purpurea cell cultures. Phytochem. 27: 119–126

Wakui, A., Kasai, M., Konno, K., Abe, R., Kanamaru, R., Takahashi, K., Nakai, Y., Yoshida, Y., Koie, H., Masuda, H. 1986. Randomized study of lentinan on patients with advanced gastric and colorectal cancer. Tohoku Lentinan Study Group. Gan To Kagaku Ryoho. 4: 1050-1059.

Walker, G.M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. Wiley, New York.

Wasser, S. P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology. 60: 258-274.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wauters, T., Verachtert, H. and Iserentant, D. 1999. Isolation of Mutants of Saccharomyces cerevisiae with a Changed Cell Wall Composition by Screening on Resistance to Tannic Acid. Food Technology and Biotechnology. 37: 271-275

Wauters, T., Iserentant, D., Verachtert, H. 2001. Sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to tannic acid is due to iron deprivation. Canadian Journal of Microbiology. 47: 290–293

Wheatcroft, R. J., Kulandai, J., Gilbert, R. W., Sime, K.J., Smith, C. G., Langeris, W. H. 2002. Production of β -glucan-mannan pre-parations by autolysis of cells under certain pH, temperature and time conditions.

Widdel, F. 2010. Theory and Measurement of Bacterial Growth Grundpraktikum Mikrobiologie,

Wood, P.J., Siddiqui, I.R., Paton, D. 1978. Extraction of high-viscosity gums from oats. Cereal Chemistry. 55: 1038-1049.

Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., Jamnong, P. 2006. β-glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. Food Hydrocolloid. 20: 68-78.

Yan, J., Allendorf, D. J., Brandley, B. 2005. Yeast whole glucan particle (WGP) beta-glucan in conjunction with antitumour monoclonal antibodies to treat cancer. Expert Opinion on Biological Therapy. 5: 691-702.

Yoshida, T.2014. Selective isolation of β-glucan from corn pericarp hemicelluloses by affinity chromatography on cellulose column. Carbohydr Polym.

Zekovi, DB., Kwiatkowski, S., Vrvi, MM., Jakovljevi, D. and Moran CA. 2005. Natural and modified (1-->3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. Critical Reviews in Biotechnology. 25: 205-230.

Zhang, L., Li, X., Xu, X. and Zeng F. 2005. Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan. Carbohydrate Research. 340: 1515–1521.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhu, F. M., Du, B., Bian, Z. X., & Xu, B. J. 2015. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: characteristics, physicochemical and biological activities. Journal of Food Composition and Analysis. 41: 165-173.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก-1

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt medium (YM)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt medium (YM) เป็นอาหารเหลวซึ่งเป็นอาหารที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 โดยในส่วนผสมของอาหาร (ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร) ประกอบด้วย

Yeast extract	3 กรัม
Malt extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Glucose	10 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จนส่วนผสมต่างๆละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ก-2

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจามจุรี

อาหารเลี้ยงเชื้อจามจุรี เป็นอาหารที่ใช้กดดันการเจริญของยีสต์ *S. carlsbergensis RU01* เพื่อคัดแยกยีสต์เบื้องต้นให้ทนแทนนินในจามจุรีได้ มีส่วนผสมของอาหารดังนี้

ฝักจามจุรี	20 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร
Agar	1.5 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หั่นฝักจามจุรีเป็นชิ้นเล็กๆผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแช่ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที หลังจากนั้นกรองเนื้อจามจุรีออกด้วยผ้าขาวบาง เติม agar 1.5 กรัม ผสมจนเข้ากัน แล้วฆ่าเชื้อซ้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

ภาคผนวก ข-1

การเตรียมซิเตรตเมทิลลีนไวโอเลต

สารละลาย

1. สารละลายโซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 2% (w/v)

เตรียมโดยชั่งโซเดียมซิเตรตมา 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เลเวปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายเมทิลลีนไวโอเลต (Methylene Violet 3RAX) 0.01 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรต 100 มิลลิลิตรจากข้อ 1

ภาคผนวก ข-2

การเตรียมสารเคมีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid Method (DNS)

เตรียมโดยการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆเติม 3,5-Dinitrosalocylic acid 10 กรัม, โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต 200 กรัม เติมฟีนอล 0.2 กรัม โดยค่อยๆละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์

ภาคผนวก ค-1

การตรวจนับเซลล์ยีสต์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

ฮีโมซิโตมิเตอร์ พัฒนาขึ้นโดย Louis-Charles Malassez เป็นอุปกรณ์ที่ใช้เพื่อนับจำนวนเซลล์ มีลักษณะเป็นแผ่นเพลทแก้วหนาและมีแผ่นปิด สไลด์มีแอ่ง (chamber) และพื้นที่ของ chamber ที่มี cover glass ปิดอยู่ ตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาเซลล์ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่างได้

1.1 เตรียมตัวอย่างที่ต้องการตรวจนับ โดยเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์

1.2 ดูดตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กับสารละลายเมทิลไวโอเลต 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.3 นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดหลัง 5 นาที

หมายเหตุ ต้องนับเซลล์ให้เสร็จภายใน 15 นาที เนื่องจากน้ำในตัวอย่างจะระเหยออกไปตลอดเวลา ถ้าทิ้งไว้นานจะแห้งทำให้ความเข้มข้นของตัวอย่างผิดไป และการนับจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็กควรนับไม่น้อยกว่า 9 ช่อง

การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจนับได้

ตัวอย่าง 1 ช่องใหญ่ มีปริมาตร 4×10^{-6}

จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่าง $\frac{A}{4 \times 10^{-6}}$ เซลล์ มิลลิลิตร

เมื่อ A คือ ค่าเฉลี่ยของเซลล์จุลินทรีย์ที่นับได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค-2

การหาความเข้มข้นของเซลล์

2.1 ค่าความขุ่น

หลักการวัดการดูดกลืนแสง (Hamill และคณะ, 1959; ThermoSpectronic และคณะ, 2002)

การหาปริมาณสารมีหลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้คือ การวัดความเข้มของสี (Colorimetry) หรือการวัดความเข้มของแสง โดยการเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน (Standard solution)

การวัดความเข้มของแสง แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ การวัดแสงที่เปล่งออกมา (Emission light) การวัดแสงที่ถูกดูดกลืน (absorption light) และการวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence light)

การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารนิยมวัด 2วิธี คือ

1. การวัดค่าการดูดกลืนแสงสมบูรณ์ (Absolute absorbance) เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารเมื่อเทียบกับอากาศหรือน้ำกลั่นในคิวเวทท์ที่มีความกว้าง 1 เซนติเมตร แล้วหารค่าที่ได้ด้วย ε จะได้ค่าความเข้มข้นสารเท่ากับ $A = \varepsilon ct$

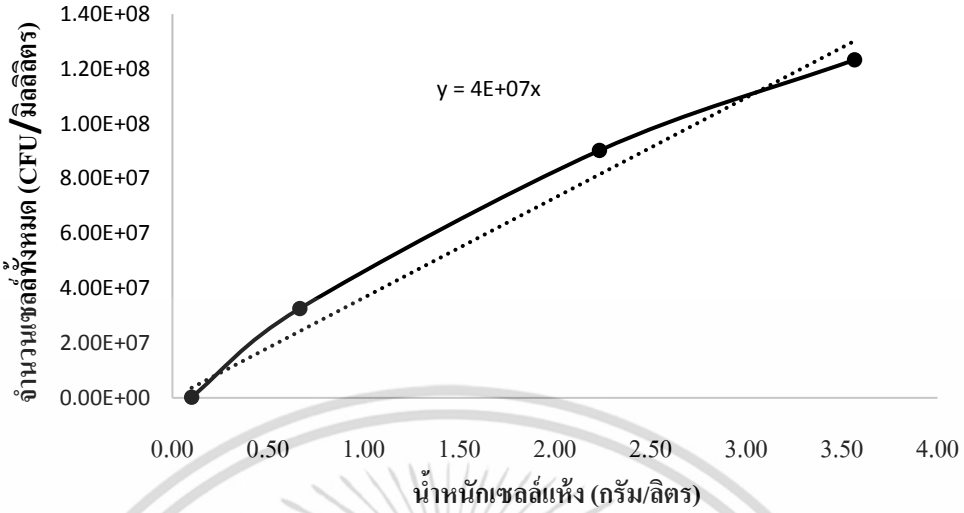
2. การวัดค่าการดูดกลืนแสงสัมพันธ์ (Relative absorbance) เป็นการวัดค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบระหว่างสารละลายมาตรฐานที่ทราบค่า (Standard solution) กับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณ

2.1.1 การทำกราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์ทั้งหมด (CFU/ml) กับค่า OD_{600} นาโนเมตร

เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความหนาแน่นของเซลล์เหมาะสมก่อนนำไปวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ ที่มีความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) โดยค่าที่วัดได้มีควรมีค่าไม่เกิน 0.8

ค่าความขุ่นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ทั้งหมด ดังนั้นการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์ยีสต์ทั้งหมด (CFU/ml) กับค่า OD_{600} จะช่วยให้สามารถประมาณค่าจำนวนเซลล์ยีสต์ทั้งหมดได้อย่างรวดเร็ว การสร้างกราฟมาตรฐานทำได้โดยนำตัวอย่างน้ำหมักเก็บทุกๆ 2 ชั่วโมง เจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ ดูดตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรกับสารละลายเมทิลไวโอเลต 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดด้วยฮีมาไซโตรมิเตอร์ นำตัวอย่างอีกส่วนไปวัดค่า OD_{600} เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ทั้งหมดกับค่า OD_{600} เพื่อใช้คำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดจากตัวอย่างที่วัดค่าเป็น OD_{600} แทนการหาน้ำหนักเซลล์โดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์ทั้งหมด (CFU/ml) กับค่า OD_{600} นาโนเมตร

2.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง

การหาค่าน้ำหนักแห้งมีความสำคัญมากต่อการวิเคราะห์หาพารามิเตอร์อื่นๆ เช่น ผลได้ และอัตราการผลิต ซึ่งมีขั้นตอนการหาโดยตรง ดังนี้

1. เตรียมหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน 3 หลอด
2. ดูดน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
3. นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
4. รินเอาส่วนใสออกแล้วทำการล้างเซลล์ 2 รอบ โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% หลอดละ 1 มิลลิลิตร และล้างเซลล์รอบสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปเหวี่ยงแยกซ้ำอีกครั้ง
5. อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (หรือจนน้ำหนักคงที่) ทิ้งให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

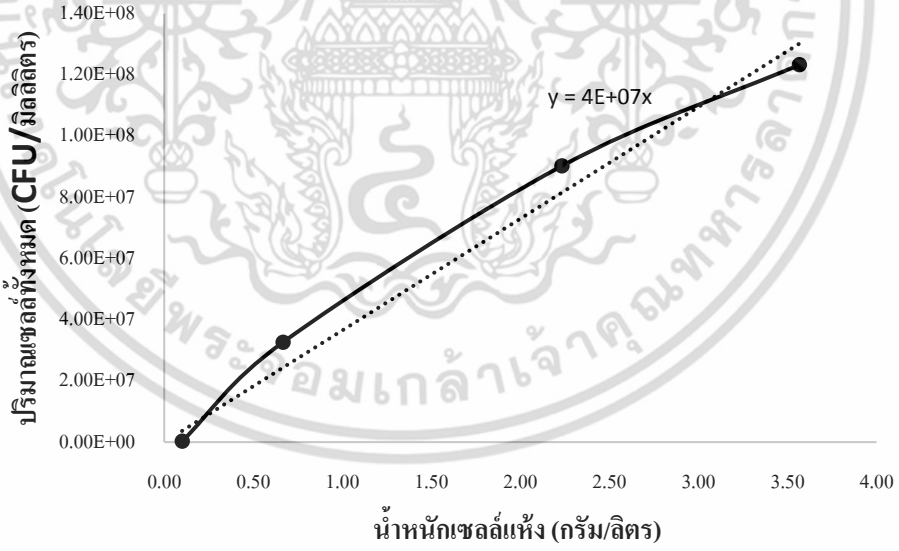
คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตรโดยใช้สูตร

$$X \text{ (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดทดสอบและเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอดทดสอบ (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} * 10^{-3}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 การทำกราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์ทั้งหมด (CFU/มิลลิลิตร) กับน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)

ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนเซลล์ทั้งหมด ดังนั้นการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าน้ำหนักเซลล์แห้งกับจำนวนเซลล์ยีสต์ทั้งหมด จะช่วยให้สามารถประมาณค่าจำนวนเซลล์ยีสต์ทั้งหมดได้อย่างรวดเร็ว การสร้างกราฟมาตรฐานทำได้โดยนำตัวอย่างน้ำหมักเก็บทุกๆ 2 ชั่วโมง เตรียมหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน 3 หลอด ดูดน้ำหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที รินเอาส่วนใสออกแล้วทำการล้างเซลล์ 2 รอบ โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% หลอดละ 1 มิลลิลิตร และล้างเซลล์รอบสุดท้ายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและนำไปเหวี่ยงแยกซ้ำอีกครั้ง อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (หรือจนน้ำหนักคงที่) ทิ้งให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร นำตัวอย่างอีกส่วนไปวัดค่า OD_{600} เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ทั้งหมดกับค่า OD_{600} เพื่อใช้คำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดจากตัวอย่างที่วัดค่าเป็น OD_{600} แทนการหาน้ำหนักเซลล์โดยตรง



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐาน น้ำหนักเซลล์แห้ง กับ จำนวนเซลล์ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค-3

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

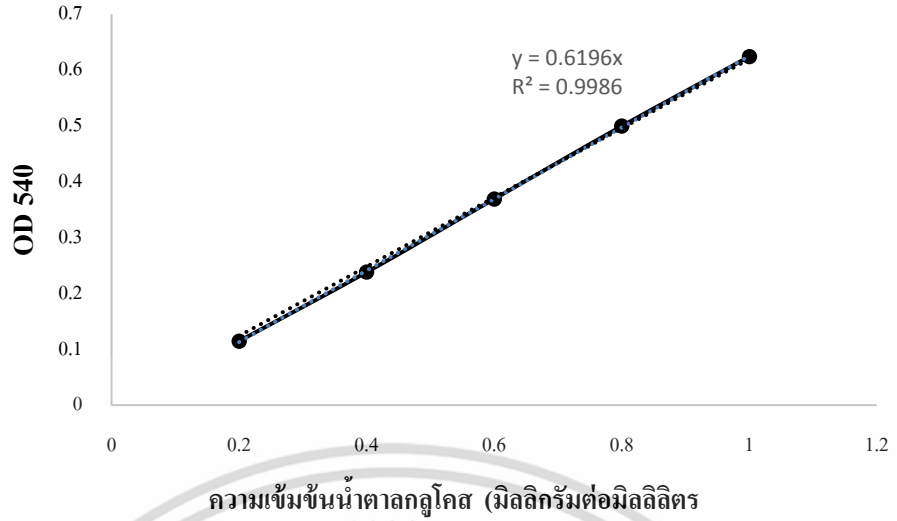
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid Method (DNS) (Miller และคณะ, 1959)

1. ดูดตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที พร้อมวางลูกแก้วปิดปากหลอด เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำแล้วหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการแช่น้ำแข็งทันที
3. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
4. เตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ดำเนินการเหมือนการทดลอง
5. นำค่า OD ที่ได้เทียบหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

1. เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที พร้อมวางลูกแก้วปดปากหลอด เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ แล้วหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการแช่น้ำแข็งทันที
3. เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
4. นำค่า OD ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

ภาคผนวก ค-4

การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคน

1. เตรียมตัวอย่างโดยการทำให้เซลล์แตกโดยใช้ความดันและความร้อนสูง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. ละลายและไฮโดรไลซ์กลูแคนทั้งหมด โดยเติม 12M HCl ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ปิดฝาและผสมให้เข้ากัน นำหลอดไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

3. เติมน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตรในแต่ละหลอด เพื่อเจือจางให้ได้ 2M ปิดฝาและผสมให้เข้ากัน คลายฝาออกและนำหลอดไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและปรับพีเอชให้เป็นกลาง โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

5. นำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

6. วัดปริมาณกลูแคนทั้งหมด (total glucan) โดยนำของเหลวที่ได้จากการปั่นแยกปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้ว เติมเอนไซม์ผสม exo-1,3-β-glucanase 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml) และเอนไซม์ β-glucosidase 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. เติมเอนไซม์ GOPOD Reagent (glucose oxidase ผสม peroxidase และ 4-aminoantipyrine) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงในแต่ละหลอด และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียสต่ออีก 20 นาที

8. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ 510 นาโนเมตร เทียบกับ blank reagent

การคำนวณปริมาณบีตากลูแคน

การคำนวณปริมาณบีตากลูแคนทั้งหมด(ร้อยละโดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) สามารถวิเคราะห์ได้จากสมการโดย Megazyme (2011) หน่วยเป็น %w/w ดังนี้

$$\beta\text{-glucan} = \Delta E \times F \times \frac{12.04}{0.1} \times \frac{100}{w} \times \frac{1}{1{,}000} \times \frac{162}{180}$$

$$= \Delta E \times \frac{F}{W} \times 10.836$$

โดยที่ ΔE = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างเทียบกับแบลงก์รีเอเจนต์

F = ค่าใช้เปลี่ยนจากค่าการดูดกลืนแสงไปเป็นไมโครกรัม

12.04/0.1 = ค่าปรับปริมาตรให้ถูกต้อง

1/1,000 = ค่าที่ใช้เปลี่ยนหน่วยไมโครกรัมเป็นมิลลิกรัม

w = น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

100/w = ค่าที่ใช้แสดงบีตากลูแคนเป็นร้อยละของน้ำหนักตัวอย่าง

162/180 = ค่าที่ใช้ปรับจากดีกลูโคสอิสระ ไปเป็นแอนไฮโดรดีกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวณัฐพร โชติกาวินทร์

วัน เดือน ปีเกิด 29 พฤศจิกายน 2536

ที่อยู่ 533 ถนนริมทางรถไฟ แขวงบางยี่เรือ เขตธนบุรี กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10600

E-mail monatthaporn@gmail.com

ประวัติการศึกษา 2559 จบการศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีการหมักอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2559 เข้าศึกษาปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การนำเสนอผลงาน **เรื่อง** "Stimulation of Beta-glucan production from *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 by tannin" The 7th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, 25-28th July 2017, Khon Kaen, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้