สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการผลิตยีสต์แห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์เพื่อใช้ในการหมักไวน์ผลไม้

(Study on production of wine active dry yeast by lyophilization for fruit wine fermentation)

นางสาวกฤษณา วงศ์มณี	รหัสนักศึกษา	47040837
นางสาวมณิสรา อุดมสิน	รหัสนักศึกษา	47040846
นายสกานต์ เหลืองเกรียงไกร	รหัสนักศึกษา	47040854

วพ.
ก2821ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 85396
วัน,เดือน,ปี 11 พ.ย. 2551

b 12010273
i.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาการผลิตยีสต์แห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์เพื่อใช้ในการหมักไวน์ผลไม้

(Study on production of wine active dry yeast by lyophilization for fruit wine fermentation)

จัดทำโดย

นางสาวกฤษณา วงศ์มณี	รหัสนักศึกษา 47040837
นางสาวมณิสรา อุดมสิน	รหัสนักศึกษา 47040846
นายสกานต์ เหลืองเกรียงไกร	รหัสนักศึกษา 47040854

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... ๓ ม.ค. ๒๕๕๑

(ดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็ง) ...../...../..... อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผู้เรียบเรียง กฤษณา วงศ์มณี, มณิสรา อุดมสิน และ สกานต์ เหลืองเกรียงไกร. 2550
ชื่อเรื่องปัญหาพิเศษ การศึกษาการผลิตยีสต์แห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์เพื่อใช้ในการหมักไวน์ผลไม้
(Study on production of wine active dry yeast by lyophilization for fruit wine fermentation)
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง

บทคัดย่อ

การใช้ยีสต์แห้งในการทำไวน์ปัจจุบันเป็นที่นิยมมาก เนื่องจากมีความสะดวกต่อการใช้งาน มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ๆ น้อย เก็บรักษาได้ง่ายโดยแช่ตู้เย็น การทำแห้งของยีสต์ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ต้องศึกษาช่วงเวลาการเจริญของเชื้อยีสต์ให้อยู่ในสภาพสมบูรณ์ก่อน จึงได้ศึกษาระยะเวลาการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* Champagne ในอาหาร YM broth พบว่า ชั่วโมงที่ 84 เหมาะสมกับการนำมาทำไลโอฟิไลซ์ จากนั้นจึงทำการศึกษาหาความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมพบว่าอัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักยีสต์สด คือ 50 : 50 มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ 8.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสมพบว่าการเติมทรีฮาโลสลงในสารไลโอโพรเทคแทนต์ชนิดอื่นๆ ทำให้เซลล์ยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าสารไลโอโพรเทคแทนต์เพียงชนิดเดียวโดยหางนมผงผสมทรีฮาโลสเป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่ทำให้เซลล์ยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 78.4 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบแอคทิวิตี้การหมัก พบว่ายีสต์แห้งที่ใช้มอลต์สกัดผสมทรีฮาโลสเป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์มีแอคทิวิตี้ของการหมัก 22.86 มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าหางนมผงผสมทรีฮาโลส เมื่อนำยีสต์แห้งมาทำการทดสอบการหมักไวน์สับปะรดพบว่าชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์มอลต์สกัดผสมทรีฮาโลส ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงที่สุด ดังนั้นมอลต์สกัดผสมทรีฮาโลสเป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสม

สกานต์ เหลืองเกรียงไกร
มณิสรา อุดมสิน
กฤษณา วงศ์มณี .... ๑ มี.ค. ๒๕๕๗

ลายมือชื่อนักศึกษา ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การทำปัญหาพิเศษเรื่อง การศึกษาการผลิตทำยีสต์แห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์เพื่อใช้ในการหมักไวน์ผลไม้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษของคณะผู้จัดทำ ซึ่งท่านได้สละเวลาอันมีค่า ให้คำปรึกษาและคำแนะนำพร้อมทั้งให้ความรู้เพิ่มเติมในส่วนที่ยังบกพร่อง ทำให้รายงานฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ช่วยให้การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณท่านผู้มีอุปการคุณทุกท่านที่ให้กำลังใจ กำลังทรัพย์ และสิ่งอำนวยความสะดวกต่างๆ จนทำให้งานสำเร็จลงได้เป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือมาโดยตลอด

คณะผู้จัดทำ

14 มีนาคม 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ..... ก

กิตติกรรมประกาศ..... ข

สารบัญ..... ค

สารบัญตาราง..... จ

สารบัญภาพ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์..... 1

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์..... 2

2.1 ยีสต์แห้ง (active dry wine yeast หรือ ADWY)..... 2

2.2 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying หรือ lyophilization)..... 6

2.3 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง..... 7

2.4 ขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง..... 8

2.5 การรอดชีวิตของเซลล์ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (viability of freeze dried cells)..... 10

2.6 ผลของน้ำภายในเซลล์ที่มีต่อการรอดชีวิตของเชื้อ..... 10

2.7 ไลโอโพรเทคแทนต์และไครโอโปรเทคแทนต์..... 11

2.8 ชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่ใช้ในการทดลอง..... 13

2.9 หน้าที่ของสารไลโอโพรเทคแทนต์..... 15

2.10 ผลของสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ..... 16

2.11 การวัดความสามารถในการหมัก..... 18

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 19

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 19

3.2 เชื้อจุลินทรีย์..... 20

3.3 การเตรียมเชื้อยีสต์และอุปกรณ์ในการทดลอง..... 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์..... 22
3.5 วิธีการทดลอง..... 23

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 29
4.1 การศึกษาระยะการเจริญของเซลล์ยีสต์..... 29
4.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักยีสต์สดที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ภายหลังการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์..... 34
4.3 การศึกษาชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์..... 34
4.4 การทดสอบแอคทิวิตี้การหมักของยีสต์แห้ง..... 35
4.5 การทดสอบการหมักไวน์สับปะรด..... 36

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 37

บรรณานุกรม..... 38

ภาคผนวก..... 39
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี..... 40
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง..... 42
ภาคผนวก ค ภาพแสดงการทำไลโอฟิไลซ์..... 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 สารไลโอโพรแทคแทนต์ที่ใช้กับจุลินทรีย์..... 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 2.1	ส่วนประกอบของเครื่องแช่แข็งและผลิตภัณฑ์จากการแช่แข็ง.....	7
ภาพที่ 2.2	กลไกการทำงานของทรีฮาโลส.....	14
ภาพที่ 3.1	หน้าจอแสดงผลของเครื่องไลโอฟิไลซ์.....	22
ภาพที่ 4.1	แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ช่วงเวลาต่างๆ.....	29
ภาพที่ 4.2	แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 12.....	30
ภาพที่ 4.3	แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 24.....	30
ภาพที่ 4.4	แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 36.....	31
ภาพที่ 4.5	แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 48.....	31
ภาพที่ 4.6	แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 60.....	32
ภาพที่ 4.7	แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 72.....	32
ภาพที่ 4.8	แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 84.....	33
ภาพที่ 4.9	แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 96.....	33
ภาพที่ 4.10	แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ยีสต์ในการศึกษาปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมในการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์.....	34
ภาพที่ 4.11	แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ยีสต์ในการศึกษาชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์.....	35
ภาพที่ 4.12	การทดสอบแอคทิวิตี้การหมักของยีสต์แห้ง.....	36
ภาพที่ 4.13	แสดงการทดสอบหมักไวน์สับปะรดด้วยยีสต์แห้งที่ใช้สารไลโอโพรเทคแทนต์ต่างกัน.....	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีผลไม้หลากหลาย มีให้เลือกมากมาย และมีราคาตกต่ำ จึงมีการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งเป็นวิธีการแก้ปัญหาผลไม้ล้นตลาด หนึ่งในนั้นก็คือ ไวน์ผลไม้ การใช้เชื้อในการทำไวน์นั้น มีอยู่ 2 วิธี วิธีแรกคือ การใช้ยีสต์สด ถ้าคนที่ทำไวน์ไม่รู้เทคนิคในการทำไวน์ จะทำให้ไวน์ออกไม่ดี และการใช้กล้าเชื้อยีสต์สดจะยุ่งยาก และหลายขั้นตอน ปัจจุบันจึงมีการใช้ยีสต์แห้งนำมาใช้ในการทำไวน์ ซึ่งสะดวก ใช้ง่าย แค่เพียงใส่ยีสต์แห้งลงไปในน้ำผลไม้ตามอัตราส่วนที่กำหนด และไม่เสี่ยงต่อการปนเปื้อน

ยีสต์แห้งตามท้องตลาดนั้น ส่วนใหญ่มีวิธีการผลิตโดยใช้ความร้อน ซึ่งจะทำให้ยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตที่น้อย ส่วนวิธีไลโอฟิไลซ์ (lyophilization) เป็นวิธีเก็บรักษาจุลินทรีย์โดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งซึ่งจำเป็นต้องใช้สารไลโอโพรเทคแทนต์ (lyoprotectants) ที่เหมาะสมเพื่อป้องกันเซลล์ไม่ให้เซลล์ได้รับอันตรายเนื่องจากความเย็น ความแห้ง และความเป็นสุญญากาศในระหว่างการทำไลโอฟิไลซ์ ซึ่งจะทำให้ยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตที่มากกว่า

ปัญหาพิเศษนี้มุ่งทำการทดลองผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ โดยทำการศึกษาระยะการเจริญของเซลล์ยีสต์ ปริมาณของเซลล์ยีสต์ และชนิดของสารสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ และคุณภาพของยีสต์แห้งที่ได้ เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตรอดหลังการทำไลโอฟิไลซ์ได้จำนวนมากที่สุด เพื่อลดต้นทุนในการผลิตยีสต์แห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ได้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาระยะการเจริญของเซลล์ยีสต์ อัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักยีสต์สดต่อการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ภายหลังการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์และชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณภาพของยีสต์แห้งที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 ยีสต์แห้ง (active dry wine yeast หรือ ADWY)

ยีสต์แห้ง (active dry wine yeast หรือ ADWY) การใช้ยีสต์แห้งทำไวน์จะได้ไวน์ที่มีคุณภาพดี มีกลิ่นหอมเนื่องจากเป็นยีสต์ที่ถูกคัดเลือกและผสมจากยีสต์หลาย ๆ สายพันธุ์และมีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการในไวน์ด้วย จึงทำให้การหมักเป็นไปอย่างสมบูรณ์ ไม่เกิดการเน่าเสียง่าย

ในศตวรรษที่ 19 การใช้ยีสต์ที่มีการคัดเลือกมาเตรียมกล้าเชื้อในน้ำเวิร์ท (wort) และโดขนมปัง (bread dough) นั้นเป็นวิธีการทำที่กว้างขวาง ซึ่งไม่ได้ใช้การหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ทำให้มี pH ที่สูง (ประมาณ 5.2) และมีการเจริญของเชื้อที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียสูง ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ การเลือกใช้สายพันธุ์ที่นำมาผลิตยังไม่มีขอบเขตที่แน่ชัด จนถึงศตวรรษที่ 20 ช่วงทศวรรษที่ 1950 การเลือกใช้สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ทำไวน์เริ่มแพร่หลายใน สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และ ประเทศแอฟริกาใต้ เช่นเดียวกับในยุโรปที่แม้ว่าจะยังไม่เป็นที่ยอมรับ ช่วงทศวรรษที่ 1960 ยีสต์แห้งเริ่มเข้ามาในสหรัฐอเมริกาและเป็นที่แพร่หลายอย่างรวดเร็วไปยังออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และ ประเทศแอฟริกาใต้ ช่วงปลายทศวรรษที่ 1970 ยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์เริ่มมีการนำมาใช้ในยุโรป โดยมีการใช้ในเยอรมัน อิตาลี และฝรั่งเศส อีกทั้งเริ่มมีการนำมาใช้ในประเทศอื่นๆ ที่ผลิตไวน์ในทวีปยุโรปและอเมริกาใต้ในเวลาต่อมา

Ulbrich and saller (1951) ได้มีการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อใช้เป็นยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ในสภาพให้อากาศ และไม่ให้อากาศของยีสต์สำหรับทำไวน์หลายสายพันธุ์พบว่าให้ผลของกำลังการหมัก (fermenting power) ไม่แตกต่าง Caster(1953) ได้เสนอการผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ด้วยวิธีให้อากาศเช่นเดียวกับการผลิตยีสต์ทำขนมปัง Adam (1953/1954) ได้ผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ด้วยถังหมักขนาด 1 ลิตร โดยการให้อากาศแล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์ทำเป็นยีสต์ก้อน (wet press cake) พบว่าเมื่อเก็บไว้ที่ -29 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นานหลายสัปดาห์ Feircher (1963) ได้ผลิตโดยใช้ถังหมักขนาด 10ลิตร ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามขณะนั้นก็ยังไม่มีการนำการทดลองที่ได้ไปผลิตเป็นการค้า

ต่อมาช่วงทศวรรษที่ 1960 อุตสาหกรรมการผลิตไวน์ของสหรัฐอเมริกาได้ให้ความสนใจในการผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ในปริมาณมากๆ และประสบความสำเร็จในการผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์หลายสายพันธุ์ซึ่งได้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ตั้งโต๊ะ (table wine) (Thoukis, Reed and Boutilet 1963) การผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ในขนาดใหญ่ระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุตสาหกรรมใช้วิธี fed-batch และให้อากาศเช่นเดียวกับวิธีการผลิตยีสต์ขนมปัง (Reed 1974; Kraus, Reed and Villettaz 1983/1984) การผลิตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์โดยทั่วไปมักเลี้ยงยีสต์ในสภาพที่มีไบซัลไฟท์ (bisulfite) เพื่อให้ยีสต์ปรับตัวให้คุ้นเคยกับ SO_2 ในน้ำองุ่นที่เตรียมทำไวน์ ยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ที่ผลิตเป็นการค้าแบบที่เป็นยีสต์แห้งมีความชื้น 5-7.5 เปอร์เซ็นต์และต้องบรรจุในห่อที่เป็นสุญญากาศหรือห่อที่มีบรรยากาศเป็นก๊าซไนโตรเจน หรือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน 1 ปีอย่างน้อย กล้าเชื้อยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์จะต้องนำมารีไฮเดรต (rehydrate) ก่อนใช้โดยใส่ลงในน้ำหรือน้ำองุ่นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Kraus, Scopp,and Chen 1981)

สายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ต้องเหมาะสมโดยคุณภาพของยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ยีสต์ ที่มีชีวิตรอด (viability) ความสามารถในการหมัก (fermentation activity) การปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์อื่นน้อย Radler, Dietrich, and Schong (1985) ได้รายงานผลการตรวจนับจำนวนเซลล์ยีสต์ในยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ 3 ตรา มีประมาณ 10 - 39 x 10^9 cfu ต่อกรัม

2.1.1 การทดสอบความสามารถในการหมัก (fermentation activity)

สามารถทดสอบได้ด้วยวิธี gasometric method เพื่อควบคุมคุณภาพของยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ วิธีนี้ใช้กันมากในการทดสอบยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์โดยใช้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้นเพียง 2.5 ชั่วโมง การปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ในยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ Radler, Dietrich, and Schong (1985) ได้รายงานผลว่ามีการปนเปื้อนที่ไม่ใช่เซลล์ *Saccharomyces* น้อยกว่า 10^4 ถึง 6x 10^5 ต่อกรัม ในยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ 3 ตรา และมีปริมาณแบคทีเรียที่ใช้อากาศนับได้ 0.3 - 15 x 10^6 ต่อกรัม

ช่วงระยะเวลา 20 ปีแรก ของการผลิตไวน์ ยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ได้ผลิตถึง 200 ตัน ในปี 1983 โดยบริษัทต่าง ๆ ในหลายประเทศ ส่วนใหญ่ทำการเลี้ยงในสภาพที่ให้อากาศบนอาหารซึ่งมีแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำไปใช้ได้ทันที เช่น กากน้ำตาล เสริมด้วยก๊าซ NH_3 ฟอสเฟต (phosphate) และสารที่ช่วยในการเจริญต่างๆ การทำแห้งโดยยีสต์จะถูกทำอยู่ในรูปทรงกระบอกเล็กๆ หรือเป็นเส้นเล็กๆ ก่อนบรรจุ ในสภาพสุญญากาศ โดยเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นอยู่ที่ 1-4 x 10^{10} เซลล์ต่อกรัมยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส แต่จะมีปริมาณลดลงอยู่ที่ต่ำกว่า 10^3 ต่อกรัม ถ้าเก็บรักษาที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

2.1.2 การประเมินคุณภาพยีสต์แห้งทางการค้าด้วยแอคติวิตีการหมัก

แต่เดิมการหมักไวน์ดั้งเดิมจะใช้ยีสต์ที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาติ ต่อมาใช้เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งแต่ 1963 มีการใช้ยีสต์แห้งที่ผลิตเป็นการค้าแล้วก็ได้มีการเพิ่มการใช้ในผู้ผลิตไวน์ที่สำคัญๆ ในส่วนต่างๆ ทั่วโลก ซึ่งจำเป็นจะต้องมีวิธีที่ผู้ทำไวน์ที่จะทราบว่ายีสต์ที่จะใช้มีคุณภาพมากน้อยอย่างไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์แห้งทางการค้ามีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกเล็กๆ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร แต่อาจมีรูปแตกต่างกันไปตามวิธีการทำแห้ง ยีสต์มีส่วนประกอบทางเคมี คือ ประกอบด้วยไนโตรเจนประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์, P_2O_5 ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์, มีความชื้นประมาณ 7.5 - 8 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สำหรับทำไวน์หลายสายพันธุ์จึงถูกนำมาทำเป็นการค้า ในยีสต์บางสายพันธุ์จะถูกคัดแยกและเก็บข้อมูลตามลักษณะ โดยสถาบันที่เก็บรวบรวมที่เป็นสาธารณะ

การกำหนดแอคทิวิตี้การหมักของยีสต์สำหรับทำไวน์ ค่าแอคทิวิตี้สามารถบอกด้วยอัตราของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลลงไป โดยแสดงในรูปของโมล ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อชั่วโมงต่อปริมาณยีสต์ที่ใส่ลงไปเป็นกรัม หรือ การเปรียบเทียบกับยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์มาตรฐาน โดย 2 ทางเลือกนี้เป็นที่นิยมใช้กันเนื่องจากรวดเร็ว ทำได้ง่ายและเหมาะกับยีสต์ โดยในรายงานนี้ใช้ยีสต์แห้งสำหรับทำขนมปังเป็นยีสต์มาตรฐาน ยีสต์ที่ใช้ได้บรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟอยด์ (aluminum foil) ที่บรรจุก๊าซไนโตรเจน ซึ่งสามารถเก็บรักษาโดยช่วยให้ไม่สูญเสียแอคทิวิตี้ของยีสต์เป็นเวลา 1 ปี ภายใต้การเก็บในตู้เย็นหรือนานกว่านั้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบแอคทิวิตี้ของยีสต์จะเหมือนกับอาหารที่ใช้ผลิตทางการค้า ถ้าอาหารนั้นมีองค์ประกอบที่เหมาะสม รายงานนี้ได้ใช้น้ำองุ่นที่ผลิตทางการค้าของ Vistis labrusca ปราศจากการเติมน้ำตาล มีความหวาน 15 องศาบริกซ์

เครื่อง gasometric นำมาใช้วัดแอคทิวิตี้ของยีสต์ เป็นเครื่องที่บันทึกค่าได้อัตโนมัติ เครื่องชนิดนี้สามารถนำมาใช้กับเครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการได้ สารละลายยีสต์เข้มข้นที่นำมาให้ผลหลังการหมักผ่านไป 2 ชั่วโมง 30 นาที ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ใช้มีประมาณ 360 ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามเป็นปริมาณที่สูงมากเมื่อเทียบกับการหมักไวน์ จากข้อมูลได้แสดงแอคทิวิตี้การหมักของยีสต์แห้งทางการค้ามีค่า 10 มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง

โดยยีสต์แห้งสายพันธุ์ Montrachet ให้ผลที่ดีเมื่อมีการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ โดยผลได้แสดงถึงการไม่ถูกยับยั้งหรือมีเพียงเล็กน้อยต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์อิสระที่ปริมาณสูงถึง 50 ppm ที่ความเข้มข้นของยีสต์ 0.15 กรัม/30 มิลลิลิตรในน้ำองุ่น อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของยีสต์ที่ 0.05 กรัมที่ 30 มิลลิลิตรในน้ำองุ่น แอคทิวิตี้การหมักที่มี SO_2 50 ppm มีการยับยั้งอย่างนัยสำคัญ โดยเฉพาะจะไม่มีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มี SO_2 100 ppm โดยความเข้มข้นของยีสต์ต่ำกว่า 2.5 กรัม ต่อ 30 มิลลิลิตรในน้ำองุ่น ผลการยับยั้งของ SO_2 ในการหมักไวน์มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของยีสต์ต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การรีไฮเดรตยีสต์แห้ง

อุณหภูมิของการรีไฮเดรตมีผลต่อแอคทิวิตี้ของยีสต์ที่ใช้สำหรับทำไวน์เช่นเดียวกัน เป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งในการรีไฮเดรตยีสต์แห้งสำหรับทำไวน์ น้ำหรือน้ำผลไม้ที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ในระหว่างการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำยีสต์จะสูญเสียสารละลายแข็งให้กับสารละลายโดยรอบ ช่วงการสูญเสียที่น้อยที่สุดอยู่ที่ 38 และ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการรีไฮเดรตที่สุด ผลที่ได้จากการระบุในยีสต์ขนมปัง Herrera etal. ได้ประยุกต์ใช้กับยีสต์สำหรับทำไวน์ ตัวอย่าง เช่น ปริมาณสารละลายของแข็ง (เปอร์เซ็นต์ปริมาณเซลล์ยีสต์ทั้งหมด) มีค่าเท่ากับ 8.65 เปอร์เซ็นต์ ที่ 27 องศาเซลเซียส, 7.38 เปอร์เซ็นต์ ที่ 32 องศาเซลเซียส, 6.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ 38 องศาเซลเซียส และ 6.21 เปอร์เซ็นต์ ที่ 43 องศาเซลเซียส

2.1.4 ระยะเวลาการเก็บรักษาของยีสต์แห้ง

สำหรับช่วงการเก็บรักษาในระยะสั้นของยีสต์แห้งสายพันธุ์ Montrachet ไม่ทำให้สูญเสียแอคทิวิตี้การหมักที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ จากการวัดด้วยวิธีข้างต้น การเก็บที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ มีการสูญเสีย 12 เปอร์เซ็นต์ และมีการสูญเสีย 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ 48 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน การเก็บรักษาระยะยาว เมื่อผ่านไป 6 เดือน มีการสูญเสีย 2 เปอร์เซ็นต์ ต่อเดือนที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) และมีการสูญเสีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ต่อเดือนที่ 12 องศาเซลเซียส

สำหรับการเก็บภายใต้สุญญากาศเกิน 12 เดือน ยีสต์สายพันธุ์ Montrachet มีการสูญเสียแอคทิวิตี้ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ต่อเดือนที่ 5 องศาเซลเซียส, 1 เปอร์เซ็นต์ต่อเดือน ที่ 23 องศาเซลเซียส, และสูญเสียทั้งหมดที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 เดือน สำหรับการเก็บเป็นเวลา 12 เดือนของยีสต์สายพันธุ์ Champagne มีการสูญเสียแอคทิวิตี้ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ 5 องศาเซลเซียส, 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ 23 องศาเซลเซียส และสูญเสียทั้งหมดที่ 40 องศาเซลเซียส

สรุปได้ว่าการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือนจะไม่ต้องใช้บรรจุภัณฑ์ช่วยป้องกันหรือการเก็บที่อุณหภูมิต่ำแต่แนะนำสำหรับการเก็บระยะยาวให้ใช้บรรจุภัณฑ์ช่วยป้องกัน (สุญญากาศหรือก๊าซไนโตรเจน) และ/หรือ เก็บในตู้เย็น

ยีสต์แห้งปัจจุบันบรรจุในซองหรือกระป๋องที่สามารถเก็บไว้ได้นานนับปีในตู้เย็น การใช้ยีสต์แห้งนั้นก่อนใช้ต้องนำยีสต์มารีไฮเดรตโดยแช่น้ำอุ่น อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เขย่าเล็กน้อยนานประมาณ 10-20 นาที เพื่อเป็นการปลุกเซลล์ยีสต์ แล้วนำสารละลายยีสต์มาใส่ในน้ำผลไม้ตามอัตราส่วนของคำแนะนำที่ขึ้นอยู่กับผู้ผลิตกำหนด สารละลายยีสต์นี้ไม่สามารถเก็บไว้ได้นานนักควรรีบใช้ทันที อย่างไรก็ตามยีสต์แห้งควรทดสอบการเจริญเติบโตของยีสต์ก่อน โดยเติมยีสต์ในสารละลายน้ำตาลทรายเล็กน้อย ทิ้งไว้ 2- 3 ชั่วโมง ให้สังเกตการณ์เกิดฟองและความขุ่นที่มากขึ้นแสดงว่ายีสต์แห้งยังใช้ได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ยีสต์แห้งจะสะดวกมากเพราะไม่ต้องเตรียมหัวเชื้อ (starter) สามารถเติมลงไปในน้ำหมักไวน์ได้เลย แต่จะมีราคาค่อนข้างแพง การเตรียมเชื้อยีสต์แห้ง ปกติใช้ 2 กรัม ต่อน้ำผลไม้ 10 ลิตร โดยนำยีสต์แห้งมาละลายในน้ำอุ่น ทิ้งตั้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อรีไฮเดรต ก็สามารถเติมลงไปในน้ำผลไม้โดยตรง

ยีสต์สด เป็นยีสต์ที่มีราคาค่อนข้างถูก เพราะใช้ในปริมาณน้อยในการหมักแต่ละครั้ง และสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นได้นาน 3 - 4 เดือน น้ำหมักในไวน์ขนาด 5 ลิตร ใช้ยีสต์สด 1 ขวด หรือ 1 หลอด แต่ถ้าต้องการทำไวน์จำนวนมากต้องเพาะเลี้ยงขยายเชื้อยีสต์ในลักษณะของหัวเชื้อหรือสตาร์ทเตอร์ (starter) เสียก่อน

2.2 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying or lyophilization)

เป็นขบวนการทำให้น้ำระเหยไปจากซัสเพนชันเชื้อที่เยือกแข็งแล้วโดยเตรียมซัสเพนชันเชื้อนำไปทำให้เยือกแข็งและต่อเข้าสู่ระบบสุญญากาศ ไอน้ำที่ระเหยไปจะถูกจับไว้ที่เครื่องควบแน่นซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ (refrigerates condenser) หรือฟอสฟอรัสเพนตาออกไซด์ หลักการทำแห้งแล้ว เก็บเชื้อไว้ภายใต้สุญญากาศหรือในแก๊สเฉื่อย โดยทั่วไปเชื้ออยู่ในขวด (vial) หรือหลอด (ampoule)

ถึงแม้จะมีการทดลองทำแห้งแบบเยือกแข็งหลายวิธี และทราบข้อผิดพลาดแล้ว โดยสามารถควบคุมพารามิเตอร์หลายอย่างเท่าที่ทำได้เวลาหนึ่งและเหมาะสมต่อเชื้ออชนิดนั้น แต่มีแฟคเตอร์ทางกายภาพที่ต้องควบคุม เช่น ช่วงการเจริญของเชื้อ อุณหภูมิของการเจริญ องค์ประกอบของซัสเพนชันเชื้อ อัตราการทำแห้ง อุณหภูมิการทำเยือกแข็ง อัตราและระยะเวลาการทำแห้ง ความชื้นสุดท้าย เป็นต้น

ข้อดีของการทำแห้งแบบเยือกแข็งนั้นเหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อจำนวนมากและการแจกจ่ายเชื้อ สามารถเก็บรักษาได้นานไม่ต้องเอาใจใส่อีกและไม่สิ้นเปลืองระหว่างการเก็บ พบว่านิยมใช้ในศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อ วิธีการนี้มีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายสูงถ้าซื้อเครื่องมืออย่างดี ต้องใช้แรงงานมากถ้าเก็บเชื้อจำนวนมาก แต่ค่าเฉลี่ยแรงงานต่อชั่วโมงและต่อหลอดเชื้อค่อนข้างต่ำ โดยทั่วไปเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะ แต่อาจเกิดการคัดเลือกประชากรเพิ่มขึ้นในการเตรียมเชื้อเพื่อเก็บครั้งต่อๆไป เช่น การเก็บเชื้อครั้งที่สองจากเชื้อที่เก็บรักษาครั้งแรก การเก็บเชื้อครั้งที่สามจากครั้งที่สอง และครั้งต่อไปเรื่อยๆ หลีกเลี่ยงวิธีนี้โดยการเตรียมเชื้อสำหรับเก็บครั้งต่อไปจากเชื้อที่เก็บไว้ครั้งแรก ระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็งของเชื้อบางชนิด อาจพบการเปลี่ยนของประชากร การกลายพันธุ์และการสูญเสียพลาสมิด วิธีนี้ต้องเสียเวลาเปิดหลอดและนำไปเพาะเลี้ยงและต้องต่อเชื้อหลายครั้ง เพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของเชื้อนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง

เครื่องไลโอฟิไลซ์ (lyophilizer) คือ เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง เป็นเครื่องมือที่ใช้ในกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญ ดังนี้

2.3.1 แชมเบอร์ใส่ตัวอย่าง (sample chamber)

เป็นภาชนะสำหรับใส่สารที่ต้องการทำแห้งแบบเยือกแข็ง อาจมีลักษณะเป็นหลอดหรือถ้วย หรืออาจเป็นห้องทำแห้งและมีถาด สำหรับใส่สารเพื่อทำแห้ง และอาจมีระบบทำความเย็นเพื่อแช่แข็งตัวอย่างได้ด้วย

2.3.2 ตัวควบแน่น (condenser)

จะทำหน้าที่ดักจับไอน้ำที่อยู่เหนือผิวของผลิตภัณฑ์ โดยไอน้ำที่เกิดจากการระเหิดของน้ำแข็งจะเคลื่อนตัวไปสู่พื้นที่ที่มีความดันต่ำกว่า (low pressure area) คือ บริเวณรอบๆ ผิวตัวควบแน่น และจะทำให้ไอน้ำแยกออกมาจากระบบ ทำให้ความชื้นในระบบลดลง

ภาพที่ 2.1 ส่วนประกอบของเครื่องแช่แข็งและผลิตภัณฑ์จากการแช่แข็ง
ที่มา : http://www.thaiscience.com/lab_vol/p30/freeze%20dryer.asp

2.3.3 ปั๊มสุญญากาศ (high vacuum pump)

ปั๊มเป็นอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับดูดอากาศออกจากแชมเบอร์ ปั๊มที่มีประสิทธิภาพสูงจะทำให้ความดันในระบบลดลงจนเกิดสภาพสุญญากาศเพียงพอ (0.1 มิลลิเมตรปรอท) ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้เกิดการระเหิดของน้ำในผลิตภัณฑ์ และเป็นการกำจัดอากาศที่ไม่เกิดการควบแน่นออกไป ลดแรงเสียดทานภายในระบบ ช่วยทำให้การเคลื่อนที่ของไอน้ำเกิดได้ดีและยังเป็นการป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นระหว่างกระบวนการทำแห้งและช่วงเวลาเก็บรักษาได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยปกติที่สภาพสุญญากาศประมาณ 5-50 มิลลิทอร์ (0.005-0.05 มิลลิเมตรปรอท) จะเป็นสภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด แต่ในเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งโดยทั่วไป จะสามารถลดความดันได้ที่ประมาณ 100-120 มิลลิทอร์ (0.1-0.12 มิลลิเมตรปรอท) หรือต่ำกว่านี้เล็กน้อย ซึ่งนับว่าเพียงพอสำหรับการทำแห้งแล้ว

2.4 ขั้นตอนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

2.4.1 การเยือกแข็งหรือแช่แข็ง (freezing)

เป็นการทำให้ตัวอย่างเยือกแข็ง คือ น้ำที่มีอยู่ กลายเป็นน้ำแข็ง ตามความจริงจะมีน้ำยึดแน่นอยู่กับของแข็ง เช่น ยึดเป็นส่วนประกอบของเซลล์ ซึ่งน้ำนี้อาจไม่แข็งตัวด้วย การเยือกแข็งกระทำได้ในอ่าง (shelling bath) ที่มีแอลกอฮอล์หรืออะซิโตน ทำให้อุณหภูมิต่ำประมาณ -40 °ซ โดยเครื่องทำความเย็นหรือจะใช้น้ำแข็งแห้งละลายในแอลกอฮอล์ อุณหภูมิประมาณ -70 °ซ หรือในไนโตรเจนเหลว และทำเยือกแข็งได้ในตู้อุณหภูมิต่ำ (deep freezer) อุปกรณ์ที่กล่าวนี้ไม่รวมอยู่กับเครื่องทำแห้ง แต่เครื่องบางชนิดทำเยือกแข็งได้ด้วย การจะเลือกใช้เครื่องมือใดจึงขึ้นอยู่กับค่าใช้จ่ายและความสะดวก การเยือกแข็งต้องสมบูรณ์ก่อนเริ่มขั้นตอนต่อไป

การเยือกแข็งตัวอย่างเกิดผลต่อตัวอย่าง 3 ประการ คือ

ตัวอย่างถูกขจัดน้ำออกบางส่วน (partial dehydration) ของแข็งบางชนิดที่ยังมีน้ำอยู่จะเข้มข้นมากขึ้นจึงต้องรักษาอุณหภูมิให้ต่ำพอเพื่อให้ตัวอย่างเยือกแข็งตลอดกระบวนการ นอกจากนี้ชนิดของวัสดุและอุณหภูมิของตัวอย่างก็มีผลด้วย พวก glass formers จะยังคงมีส่วนที่ไม่เยือกแข็ง

ความแข็งตึงของโครงร่างของตัวอย่าง (stiffening of structure) ขึ้นอยู่กับส่วนผสมของการเยือกแข็งของน้ำและส่วนที่ไม่เยือกแข็ง (concentrated solution) ซึ่งสัมพันธ์กับอุณหภูมิ ความแข็งตึง (stiffness) ของวัสดุส่วนที่ไม่เยือกแข็ง (ของแข็งยึดกับน้ำที่ไม่เยือกแข็ง) ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของสารรวมทั้งอุณหภูมิ และน้ำที่ประกอบอยู่

สัณฐานวิทยาของตัวอย่าง (sample morphology) ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างทั้งขนาด ตำแหน่งและทิศทางของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจะมีผลต่อการทำแห้ง สัณฐานวิทยาของตัวอย่างจึงขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่าง เช่นความเข้มข้น ความหนืด การเยือกแข็งอย่างช้าๆจะทำให้ เกิดผลึกน้ำแข็งเรียงตัวมีทิศทางแต่การเยือกแข็งอย่างรวดเร็วจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งไม่เรียงอยู่ในทิศทางเดียวกันและอาจเป็นผลเสียต่อเซลล์จุลินทรีย์ด้วย ตัวอย่างที่หนืดจะให้ผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กไม่เป็นระเบียบ ทำให้ต้านทานต่อการขนส่งมวลระหว่างขั้นตอนการระเหิด (sublimation) จึงทำให้แห้งช้าและโครงสร้างเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ตัวอย่างที่เข้มข้นควรทำให้เจือจาง เพื่อให้เกิดการเยือกแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การระเหิด (sublimation)

คือการกลายเป็นไอของน้ำแข็ง โดยไม่ผ่านสภาวะของเหลว การระเหิดไม่เกี่ยวข้องกับน้ำที่ไม่แข็งตัว (unfrozen water) ที่ยึดติดอยู่กับของแข็ง ผลึกของแข็งต้องการพลังงาน คือ ความร้อนในการเปลี่ยนเป็นไอ ไอน้ำจะถูกนำออกไปโดยการขนส่งมวล (mass transport) ซึ่งมีปั๊มดูดอากาศช่วยนำออก การระเหิดจะเกิดขึ้นที่ผิวของตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง ตัวอย่างบางส่วนจะแห้ง (dry layer) และเหลือส่วนที่เยือกแข็ง (frozen layer) ระหว่างชั้นทั้งสอง เรียกว่า interface การระเหิดจะดำเนินต่อไปที่ interface โดยพลังงานจากตัวอย่าง ความแตกต่างของอุณหภูมิ (temperature gradient) ระหว่างแหล่งให้ความร้อน และ interface การขนส่งความร้อนจากชั้นเยือกแข็งเกิดโดยการนำ (conduction) หรืออาจเกิดจากการพา (convection) และการแผ่รังสี (radiation) ขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่อง เมื่อน้ำแข็งละลายน้ำแล้วเกิดไอน้ำที่ interface ซึ่งจะถูกนำไปยังเครื่องควบแน่นโดยการขนส่งมวล ซึ่งต้องอาศัยความแตกต่างของความกดดัน (pressure gradient) ระหว่าง interface การรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ต้องควบคุมอัตราการขนส่งความร้อนต่อ interface

2.4.3 การคาย (desorption)

หลังจากผลึกน้ำแข็งระเหิดออกจากตัวอย่างแล้ว ส่วนที่เหลือเป็นสารละลายเข้มข้นอยู่กับส่วนที่แห้ง (dry layer) ซึ่งจะเป็นผลิตภัณฑ์ของเรา ส่วนที่เหลือนี้จะมีน้ำอยู่ 25-30 กรัม/ 100 กรัม ของแข็ง จะยึดแน่นและไม่เยือกแข็ง น้ำซึ่งยึดแน่นกับของแข็งที่เป็นองค์ประกอบของตัวอย่างจะถูกเปลี่ยนเป็นไอน้ำและถูกนำออกไปโดยการคาย (desorption) ซึ่งเป็นส่วนสุดท้ายในการทำแห้ง ความคงที่ของโครงสร้าง หรือเคมีของวัสดุจะขึ้นอยู่กับน้ำที่ยึดอยู่ น้ำที่ยึดอยู่กับของแข็งเป็นน้ำที่ต้องใช้ความกดดันต่ำกว่าน้ำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิเดียวกัน การลดความกดดันมีผลต่อการยึดระหว่างน้ำและของแข็งการลดความกดดันลงเท่าใดขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของการยึด ตามทฤษฎีแล้วผลิตภัณฑ์ของเราจะหยุดปล่อยน้ำ (mass transport stop) เมื่อความกดดันของน้ำที่ตัวอย่างเท่ากับความกดดันของน้ำที่เครื่องควบแน่น ซึ่งแรงขับเคลื่อน (driving force) จะเท่ากับศูนย์

เราสามารถลดอุณหภูมิของเครื่องควบแน่นได้จาก -50 ° ซ ถึง -80 ° ซ ทำให้ความกดดันของน้ำลดลง และจะทำให้ความแตกต่างของความกดดัน (pressure gradient) เป็นศูนย์ที่ความกดดันของน้ำของตัวอย่างเมื่อมีความชื้นน้อยลง นอกจากนี้เราสามารถเพิ่มอุณหภูมิของตัวอย่าง ซึ่งก็ทำให้เกิดความแตกต่างของความกดดันด้วย เมื่อเครื่องควบแน่นมีอุณหภูมิคงที่ เช่น เพิ่มอุณหภูมิจาก 20 ° ซ เป็น 30 ° ซ จะเพิ่มความกดดันจาก 23.2 mbar เป็น 42.3 mbar อย่างไรก็ตามควรคำนึงถึงความคงที่ของโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การรอดชีวิตของเซลล์ที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง (viability of freeze dried cells)

การเก็บรักษาเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dried) นั้นจะสามารถรักษาเชื้อให้รอดได้ชีวิตได้เป็นระยะเวลายาวนาน และสะดวกในการจัดส่งเชื้อไปยังแหล่งที่ต้องการใช้ศึกษาและวิจัย รวมทั้งสามารถเก็บรักษาเชื้อได้เป็นจำนวนมากอีกด้วย โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีนี้ในการเก็บรักษาเซลล์ของแบคทีเรีย ยีสต์และรา และอาจใช้เก็บสาหร่าย โปรตัวซัวและไวรัสได้บางจำนวนเท่านั้น สิ่งจำเป็นที่ใช้ในการทำแห้งแบบเยือกแข็งซึ่งนอกเหนือจากการปั๊มดูดอากาศ และเครื่องทำความเย็นแล้ว การใช้หลอดบรรจุเชื้อตามขนาดที่เหมาะสมและการเลือกใช้สารป้องกันความเย็น(lyoprtectants หรือ protective substances) ที่เหมาะสมต่อเชื้อแต่ละประเภทจะสามารถทำให้เชื้อมีชีวิตรอดได้นานแตกต่างกัน สารประกอบที่นิยมใช้เป็นตัวเคลือบเซลล์หรือป้องกันเชื้อจากความเย็นและอันตรายอื่นๆระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็งนี้ ได้แก่ สคิมมิลค์ น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล (glyccrol) โซเดียมกลูตาเมต (sodium glutamate) หรือส่วนผสมของน้ำตาลซูโครสกับซีรัม

การรอดชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์ที่ทำแห้งนั้น ส่วนประกอบที่เป็นโครงสร้างเซลล์จะเกี่ยวข้องด้วย เซลล์ของแบคทีเรีย ยีสต์และรามีองค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกัน โดยทั่วไปผนังเซลล์แบคทีเรีย (ยกเว้นมัยโคพลาสมา) ประกอบด้วยเปปติโดไกลเคน (peptidoglycan) ซึ่งมีกรดอะมิโน (amino acid) และอะมิโนชูการ์(amino sugar) ต่อโยงกัน มีกรดไตรโคอิค (teichoic acid) หรือ ลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ลิพิด โปรตีน ลิโพโปรตีน (lipoprotein) และคาร์โบไฮเดรต ผนังของเซลล์ยีสต์และราประกอบด้วยไคติน (chitin) กลูเคน (glucan) แมนแนน (mannan) ลิพิด โปรตีน และบางพวกอาจมีเซลลูโลสประกอบด้วย และเชื้อไวรัสเป็นเพียงกรดนิวคลีอิกและโปรตีน สปอร์ของแบคทีเรีย ยีสต์และราก็มีส่วนประกอบคล้ายคลึงกับตัวเซลล์ โดยเฉพาะสปอร์ของแบคทีเรียจะมีสารแคลเซียมไดปิโคลิเนต (calcium dipicolinate) ประกอบอยู่ด้วยสารประกอบที่อยู่บริเวณผิวเซลล์จึงน่าจะมีปฏิกิริยาเกี่ยวข้องกับสารป้องกันความเย็นที่ใช้เคลือบเซลล์ นอกจากนี้น้ำของเซลล์จุลินทรีย์ก็มีบทบาทต่อการรอดชีวิตทั้งในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งและภายหลังกระบวนการ

2.6 ผลของน้ำภายในเซลล์ที่มีต่อการรอดชีวิตของเชื้อ

น้ำของเซลล์พืชและสัตว์รวมทั้งจุลินทรีย์แสดงบทบาทสำคัญในแง่ของปฏิกิริยาภายในเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ของพืชและสัตว์ การทำให้เซลล์เยือกแข็งพร้อมไปกับการทำเซลล์แห้งเป็นการขจัดเอาน้ำภายในเซลล์ออกไป พบว่าเซลล์ของจุลินทรีย์จะทนทานมากกว่าเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เราอาจวัดปริมาณของเซลล์ได้ในรูปของค่า water activity (a_w) เช่น เซลล์จุลินทรีย์ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งจะมีค่า a_w น้อยกว่า 0.05 ซึ่งจะทำให้หยุดปฏิกิริยาภายในเซลล์เซลล์โดยทั่วไปจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการน้ำเพื่อใช้ในการเจริญสูง เราอาจวัดปริมาณน้ำทั้งหมดของเซลล์และน้ำภายในเซลล์ได้ด้วยวิธีการของ White พบว่าในเชื้อแบคทีเรียจำพวก *Escherichia coli* จะมีน้ำภายในเซลล์ 76 เปอร์เซ็นต์ และในเชื้อยีสต์จำพวก *Saccharomyces cerevisiae* จะมีน้ำภายในเซลล์เพียง 66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลงถึง -20 ° ซ น้ำของเซลล์ทั้งภายนอกและภายในจะเยือกแข็ง พบว่าใน *E. coli* จะเยือกแข็งเพียง 69 เปอร์เซ็นต์ และในเชื้อ *S. cerevisiae* เยือกแข็งเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ น้ำส่วนที่เหลือจะไม่เยือกแข็งอีก ถึงแม้จะลดอุณหภูมิไปอีกก็ตาม ในระหว่างการเยือกแข็งจะทำให้เกิดน้ำแข็งภายในเซลล์ซึ่งจะก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ จากการตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อไปพร้อมๆกับการทำให้เยือกแข็งอย่างช้าๆคือการลดอุณหภูมิลงที่ละน้อย แต่เซลล์ส่วนใหญ่จะตายในกรณีที่ทำให้เยือกแข็งโดยลดอุณหภูมิลงทันที นอกจากนี้การเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์จะทำให้อิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) เข้มข้นขึ้น การเติมสารป้องกันความเย็นจะช่วยให้อิเล็กโทรไลต์ และลดการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์ จึงทำให้มีน้ำเหลืออยู่บ้าง (residual water) จึงจะทำให้เชื้อรอดชีวิตมากขึ้น

2.7 ไลโอโพรเทคแทนต์และไครโอโปรเทคแทนต์

ไลโอโพรเทคแทนต์ (lyoprotectant) คือสารประกอบใดๆ ที่เคลือบเซลล์และป้องกันเซลล์จากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากความเย็นและอันตรายอื่นๆในระหว่างกระบวนการทำแห้ง ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มอายุการเก็บรักษาและทำให้กิจกรรมของสิ่งมีชีวิตดำเนินไปได้อย่างปกติ

ไครโอโพรเทคแทนต์ (cryoprotactant) คือสารประกอบใดๆ ที่สามารถช่วยป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษาแบบเยือกแข็ง ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มอายุการเก็บรักษาและการทำให้กิจกรรมของสิ่งมีชีวิตดำเนินไปได้อย่างตามปกติ

สารไครโอโพรเทคแทนต์สามารถใช้ในการแช่แข็งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งไวรัส, แบคทีเรีย, รา, สาหร่าย และโปรโตซัว รวมทั้งตัวอย่างและสารประกอบทางเคมีที่หลากหลาย แต่มีสารไครโอโพรเทคแทนต์เพียงบางชนิดเท่านั้นที่ถูกใช้อย่างกว้างขวางและให้ผลที่น่าพึงพอใจ ได้แก่ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide Me_2SO), กลีเซอรอล (glycerol), ซีรัมอัลบูมิน (blood serum - serum albumin), สคิมมิลค์ (skimmed milk), เพปโตน (peptone), ยีสต์สกัด (yeast extract), แซคคาโรซ (saccharose), กลูโคส, เมทานอล, โพลีไวนิลไพรโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone PVP), ซอร์บิทอล และมอล์ทสกัด (malt extract) การเปรียบเทียบความเป็นไครโอโพรเทคแทนต์ของแต่ละคู่ที่ใช้มีพื้นฐานรายงานจากผลการทดลองที่ได้รับการตีพิมพ์ชี้ให้เห็นว่า สารไครโอโพรเทคแทนต์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด คือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์, เมทานอล, เอทีลีนไกลคอล (ethylene glycol), โพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) และซีรัมอัลบูมิน ขณะที่กลีเซอรอล, โพลิเอทีลีนไกลคอล,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพลิไวนิลไพโรลิโดนและซูโครส มีประสิทธิภาพน้อยกว่า และน้ำตาลอื่นๆ, เด็กซ์แทรน, ไฮดร็อกซีเอทิลสตาร์ช (hydroxyethyl starch), ซอร์บิทอลและนมมีประสิทธิภาพต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามไดออล (diols) และสารไครโอโพรเทคแทนต์อื่นๆ บางตัว เป็นพิษต่อจุลินทรีย์หลายชนิด ไดเมทิลซัลฟอกไซด์อาจจัดว่าเป็นสารไครโอโพรเทคแทนต์ที่มีประสิทธิภาพที่สุดในโลก ถึงแม้ว่าบางครั้งสารไครโอโพรเทคแทนต์ตัวอื่นจะสามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์บางตัวได้ดีกว่า การเก็บรักษาโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนต์มีปัจจัยจำนวนมากมีผลต่อประสิทธิภาพในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น สปีชีส์ (species), สายพันธุ์จุลินทรีย์, ขนาดของเซลล์ และรูปแบบการเจริญเติบโต (growth phase), อัตรา, อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม, องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต (growth medium), พีเอช (pH), การให้อากาศ (aeration), ปริมาณน้ำในเซลล์ (cell water content), ปริมาณไขมัน (lipid content) และองค์ประกอบของเซลล์, ความหนาแน่นของอากาศขณะทำการแช่แข็ง, องค์ประกอบของส่วนที่แช่แข็ง (freezing medium), อัตราการทำให้เย็น (cooling rate), อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บและระหว่างการเก็บ, อัตราการทำให้อุ่น (warming rate), อาหารที่ใช้ในการเก็บ (recovery medium) และสิ่งที่สำคัญที่สุด คือ องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เป็นตัวทำให้เชื้อจุลินทรีย์แขวนลอยเพื่อทำการแช่แข็งถึงแม้จุลินทรีย์ (แบคทีเรียและสปอร์ของจุลินทรีย์) จะมีการรอดชีวิตที่ดีในการแช่แข็ง (deep-frozen) แต่บางครั้งสังเกตได้ว่าไม่มีสารที่เหมาะสมช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ มีการค้นพบว่ากลีเซอรอลและไดเมทิลซัลฟอกไซด์สามารถป้องกันเซลล์ยูคาริโอต (cell eukaryotic) รวมทั้งเซลล์จุลินทรีย์ต่อการทำลายจากการแช่แข็ง ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของเทคโนโลยีการใช้สารไครโอโพรเทคแทนต์สมัยใหม่

2.7.1 ประเภทของไครโอโพรเทคแทนต์แบ่งตามการออกฤทธิ์

2.7.1.1 ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้จะซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นในขณะแช่แข็งเซลล์ ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ ได้แก่ กลีเซลรอล ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และแอลกอฮอล์หลายตัว เช่น เมธานอล, เอทานอล, โพรเพนไดออล เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์ แอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่สูงที่สุดรองลงมา ได้แก่ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และกลีเซอรอล ตามลำดับ สารเคมีในกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่ง คือ เป็นพิษต่อเซลล์ และเนื้อเยื่อ

2.7.1.2 ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่ภายนอกเซลล์ และใช้ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำมากกว่าพวกแรก และมีความเป็นพิษน้อยกว่า ตัวอย่างสารกลุ่มนี้ ได้แก่ โพลีไวนิลไพรโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone PVP) และน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส, กลูโคส, แมนนิทอล เป็นต้น

2.7.2 ประเภทของไครโอโพรเทคแทนต์แบ่งตามคุณสมบัติความเป็นกรด-เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2.1 สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกกรด (acid monomers) เช่น กลูตาเมต แอสปาราจีน (asparagine) มาเลต (malate) และแอสปาเตต (aspartate)

2.7.2.2 สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกเป็นกลาง (neutral monomers) เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แลคโตส ซูโครส แรฟฟีโนส(raffinose) ซอร์บิตอล (sorbitol) ไซลิทอล(xylitol) อินอซิตอล และดีแอล-ทรีโอนีน(DL-threonine)

2.7.2.3 สารประกอบจำพวกพอลิเมอร์และดีเกรดเดทีฟ (polymers and its degradatives) เช่น อัลบูมิน(albumin) เจลาติน มิวซิน (mucin) เปปตา แป้ง เดกตริน (dextrin) เพคติน(pectin) พอลิเมอร์ของซูโครสเดกสแตรน (dextran) ส่วนสกัดจากเนื้อ ส่วนสกัดจากยีสต์ พอลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinylpyrolidone) คาร์บอซีเมทิลเซลลูโลส (carboxy methylcellulose) และฟีคอล(phccol)

2.7.2.4 สารประกอบธรรมชาติ (natural substances) เช่น สคิมมิลค์ และ ซีรัม

2.7.2.5 สารประกอบจำพวกรีดิวส์ (reducing agents) เช่น แอสคอร์เบต (ascorbate) ซีสทีอีน (cysteine) ไฮดรอกซิลามีน (hydroxylamine) และ เซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide)

2.8 ชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่ใช้ในการทดลอง

2.8.1 หางนมผง (skim milk)

คือ นมที่แยกเอาไขมันออก มีสารอาหารครบเกือบทุกตัว ยกเว้น ไขมัน และวิตามินที่ละลายในไขมัน หางนมเป็นแหล่งที่ดีที่สุดของโปรตีนจากสัตว์ ซึ่งมีคุณภาพสูง และมีแร่ธาตุพวก Ca และ P ด้วย นอกจากนี้ยังมีแลคโตส อยู่เกือบเท่ากับที่มีอยู่ในน้ำนม ดังนั้นหางนมจึงใช้เป็นอาหารที่ดีที่สุดของ สัตว์อ่อน และยังเป็นอาหารที่ดีที่สุด และเป็นแหล่งของโปรตีนนม และแร่ธาตุราคาถูกสำหรับมนุษย์ด้วย

2.8.2 ยีสต์สกัด (yeast extract)

เป็นผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยโปรตีน และองค์ประกอบชนิดอื่นๆภายในเซลล์ที่แยกได้จากเซลล์ยีสต์ด้วยกระบวนการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของยีสต์หรือได้จากการย่อยสลายโดยสารเคมีและเอนไซม์ ยีสต์สกัดที่ได้จากการย่อยสลายตัวเองของยีสต์มีชื่อเรียกว่า "ยีสต์ออโตโลเสท" (yeast autolysate) ดังนั้นยีสต์สกัดบางครั้งอาจเรียกเป็นยีสต์ออโตโลเสท ซึ่งหมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ย่อยสลาย โปรตีนที่ละลายได้ และผนังเซลล์ แต่ถ้ากระบวนการผลิตมีการแยกเอาส่วนของผนังเซลล์ที่ไม่ละลาย (insoluble cell wall) ออกด้วยวิธีการกรอง เรียกผลิตภัณฑ์ที่ได้ว่า "autolysed yeast extract" (Dziezak, 1987)

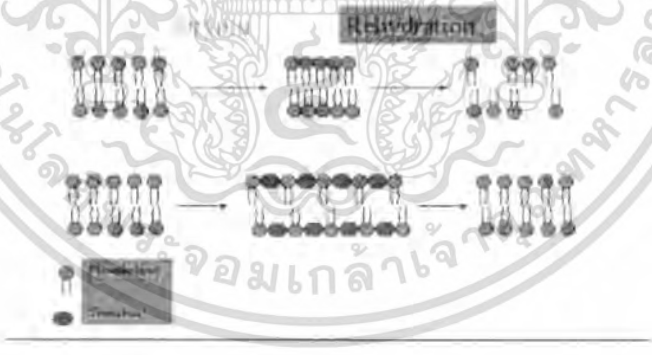
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3 มอลต์สกัด (malt extract)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่อาจจะผลิตได้จากยอดอ่อนของเมล็ดธัญพืชชนิดใดก็ได้แต่ส่วนใหญ่แล้วจะผลิตมาจากข้าวบาร์เลย์ โดยการเพาะเป็นยอดอ่อน เริ่มจากการนำมอลต์มาโม่ให้เมล็ดแตก นำไปผสมน้ำในถังซึ่งนิยมทำด้วยทองแดงเพราะเป็นวัสดุที่สามารถนำมาดัดให้ได้รูปทรงสวยงาม และทองแดงยังเป็นตัวนำความร้อนที่ดี การต้มเบียร์ในขั้นตอนนี้จะต้องให้ความร้อนที่เหมาะสมเพื่อให้เอนไซม์ในมอลต์เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล จากนั้นจึงแยกของเหลวออกจากกาก ของเหลวดังกล่าวเรียกว่า วอร์ต ซึ่งมีความหวานของน้ำตาลมอลโตสวอร์ต (wort) จากนั้นนำวอร์ตมาทำให้แห้งภายใต้สุญญากาศ จึงได้ มอลต์สกัด ออกมาซึ่งมอลต์สกัด จะประกอบไปด้วย maltose 45-55 เปอร์เซ็นต์ ,dextrins 20 เปอร์เซ็นต์ ,proteins 5-6 เปอร์เซ็นต์ and xBrix 80-83 (1.47 specific gravity)

2.8.4 ทรีฮาโลส (trehalose)

สามารถเข้าไปภายในเซลล์เพื่อปกป้องโปรตีนระหว่างการทำแห้ง โดยทรีฮาโลสสามารถลดความเข้มข้นลงภายในเซลล์ ซึ่งเซลล์ถูกรีซัสเพนชันในทรีฮาโลส 10 มิลลิโมล ที่ 28 องศาเซลเซียส และเพิ่มเป็น 0.43 มิลลิโมลต่อมิลลิกรัม (น้ำหนักแห้ง) ของเซลล์ ขณะที่เซลล์ถูกรีซัสเพนชันที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของทรีฮาโลสภายในเซลล์



ภาพที่ 2.2 กลไกการทำงานของทรีฮาโลส
ที่มา : http://www.netthandelen.no/visProdukt.aspx?id=90891

ทรีฮาโลสสามารถปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์อย่างสมบูรณ์และปกป้องโครงสร้างของโปรตีนระหว่างการทำแห้งและการรีไฮเดรชัน (rehydration) ของน้ำ เพื่อเข้าใจว่าทรีฮาโลสปกป้องเซลล์ได้อย่างไร จึงควรเข้าใจสิ่งที่เกิดขึ้นต่อเยื่อหุ้มเซลล์ระหว่างการทำแห้งและการรีไฮเดรชัน ขณะที่น้ำถูกเคลื่อนย้ายออกจากชั้นไขมันจะมีผลในการเพิ่มแรงวัลเดอวาลล์ (van der waals interactions) ระหว่างสายโซ่เอคิล (acyl chains) การเพิ่มแรงระหว่างสายโซ่เอคิลทำให้ชั้นไบเลเยอร์ที่ถูกทำแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนสถานะไปเป็นเจลที่อุณหภูมิห้อง ทำให้เกิดการแยกชั้นขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อไขมันที่ถูกทำให้แห้ง ถูกรีไฮเดรชันอาจจะก่อให้เกิดรูรั่วขึ้นได้ ทรีฮาโลสจึงสามารถปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์จากการถูกทำลายจากปฏิกิริยาการทำแห้งและการรีไฮเดรชันโดยยังคงไขมันไว้ภายในชั้นไขมันที่อุณหภูมิห้อง ถึงแม้ว่าจะถูกทำแห้ง ทรีฮาโลสก็จะเข้าไปแทนที่ชั้นฟอสโฟไลปิดที่ถูกทำแห้งโดยสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกลุ่มที่มีขั้ว

ทรีฮาโลสเป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่พบในพืชและเซลล์สัตว์ มักใช้ที่ความเข้มข้นที่ 5 – 1 9 เปอร์เซ็นต์ (ค่ามัธยฐาน 10 เปอร์เซนต์) เหมาะสำหรับไวรัส, *S. cerevisiae*, psychrophilic yeast, Lactobacillus bulgaricus และ mycorrhizal fungus ทรีฮาโลสก่อให้เกิดหลุมภายในจุลินทรีย์ ยูคาริโอตขนาดใหญ่หลายชนิด (มากกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนัก/น้ำหนัก) ซึ่งอาจเป็นบทบาทการป้องกันเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง ปริมาณทรีฮาโลสสัมพันธ์กับการรอดชีวิตของยีสต์ภายหลังการทำแห้ง เมื่อยีสต์เจริญในสภาพไม่มีอากาศ ประสิทธิภาพของทรีฮาโลสในการเป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์จะเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะพบว่าทรีฮาโลสที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงอย่างมาก ภายใต้สภาพที่มีอากาศบ้าง เมื่อเปรียบเทียบกับทรีฮาโลสที่ระดับปกติ

2.9 หน้าที่ของสารไลโอโพรเทคแทนต์

สารไลโอโพรเทคแทนต์ในกระบวนการระเหิดแห้งมีหน้าที่ 2 อย่างเกี่ยวกับการเก็บรักษาความมีชีวิตรอดของยีสต์ อย่างแรกคือ ให้ส่วนที่แห้งซึ่งมีโครงสร้างแน่นอนที่ทำหน้าที่เป็นสารค้ำจุนและเป็นตัวรับสำหรับการกลับให้มีความชื้นขึ้นใหม่ และหน้าที่อย่างที่สองคือ ป้องกันไม่ให้เกิดความเสียหายทางชีวเคมีของเซลล์มีชีวิตระหว่างการแช่แข็งหรือการทำแห้งหรือทั้งจากการแช่แข็งและการทำให้แห้ง (Berny and Hennebert, 1991) โดย Berny และ Hennebert, (1991) พบว่าการใช้นมขาดมันเนยเป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์ร่วมกับสารอื่นๆ อีก 2 ชนิด ซึ่งอาจเป็นน้ำผึ้ง โมโนโซเดียมกลูทาเมต ทรีฮาโลส หรือราฟฟิโนส นั้น ทำให้ความมีชีวิตของ *S. cerevisiae* เพิ่มจาก 30 เปอร์เซ็นต์เป็น 96-98 เปอร์เซ็นต์ โดยสารตัวกลางที่ใช้เป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์สำหรับการระเหิดแห้งนี้ยังต้องมีคุณสมบัติไม่ทำให้เซลล์แตกและทำให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ง่าย นอกจากนี้ยังต้องสามารถดึงน้ำจากเซลล์จุลินทรีย์ให้คงเหลือไว้อย่างน้อย 1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากปริมาณน้ำที่เหลือนี้มีความสำคัญต่ออายุการเก็บรักษา ถ้ามีน้ำมากไปหรือไม่เหลือเลย อายุการเก็บรักษาจะสั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารไลโอโพรแทคแทนต์ ที่ใช้กับจุลินทรีย์

Compound	Formula	MW
Sulphoxides		
Dimethylsulfoxide	$(CH_3)_2SO$	78.13
Monohydric alcohols and derivatives		
Methanol	CH_3OH	32.04
Ethanol	C_2H_5OH	46.07
Polyvinyl alcohol	$(-CH_2CH(OH)-)_n$	$2–12 \times 10^4$
Diols and derivatives		
Ethylene glycol	$(CH_2OH)_2$	62.07
Propylene glycol	$CH_3CH(OH)CH_2OH$	76.09
Trimethylene glycol	$CH_2(CH_2OH)_2$	76.09
Diethylene glycol	$O(CH_2CH_2OH)_2$	106.12
Polyethylene glycol	$HOCH_2(CH_2O)_nCH_2OH$	$2–600 \times 10^3$
Polypropylene glycol	$HO(CH(CH_3)CH_2O)_nH$	$4–90 \times 10^3$
Polyethylene oxide	$(-CH_2CH_2O-)_n$	$1–900 \times 10^4$
Triols		
Glycerol	$C_3H_5(OH)_3$	92.09
Polyalcohols		
Mannitol, sorbitol, dulcitol	$C_6H_8(OH)_6$	182.17
Monosaccharides		
Glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.16
Xylose	$C_5H_{10}O_5$	150.13
Disaccharides		
Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30
Lactose, maltose	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$	360.31
Trehalose	$C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$	378.33
Trisaccharides		
Raffinose	$C_{18}H_{32}O_{16} \cdot 5H_2O$	594.52
Polysaccharides		
Dextran, mannan	$(C_6H_{10}O_5)_n$	$1–200 \times 10^4$
Dextrin	$(C_6H_{10}O_5)_n \cdot nH_2O$	
Hydroxyethyl starch		
Ficoll		$3–40 \times 10^4$
Gum arabic (acacia)		25×10^4
Amides, N-alkylamides, imides		
Acetamide	NH_2COCH_3	59.07
Methylacetamide	$CH_3NHCOCH_3$	73.09
Dimethylformamide	$(CH_3)_2NCOH$	73.09
Dimethylacetamide	$(CH_3)_2NCOCH_3$	87.12
Succinamide	$NH_2CO(CH_2)_2CONH_2$	99.09
Heterocyclic compounds		
Methylpyrrolidone	$CH_3N(CH_2)_3CO$	99.13
Polyvinylpyrrolidone	$(CHN(CH_2)_3CO)_n$	$3–70 \times 10^4$
Amino acids and carbonic acids		
Proline	$(CH_2)_3NHCHCOOH$	115.13
Glycine	CH_2NH_2COOH	75.07
Glutamic acid	$(CH_2)_2NH_2CH(COOH)_2$	147.13
Aminobutyric acid	$(CH_2)_3NH_2COOH$	103.12
Glutaric acid	$(CH_2)_3(COOH)_2$	132.12
Ammonium acetate	CH_3COONH_4	77.08
EDTA	$(CH_2N(CH_2COOH)_2)_2$	292.24
Proteins, peptides, polypeptides, and glycoproteins		
Blood serum, albumins		
Gelatin, peptones		

ที่มา : Zdenek Hubálek (2003)

2.10 ผลของสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อ

การเติมสารป้องกันความเย็นนั้นสามารถเลือกใช้ได้แตกต่างกัน โดยอาจเตรียมเป็นสารละลายชนิดเดียวสำหรับผสมกับเชื้อ เช่น สารละลายของสคิมมิลค์ กลูโคส ซูโครส อินอซิตอล เดกแตรน เจลาติน พอลิไวนิลไพโรลิโดน กลูตาเมต และเปปโตน หรืออาจเตรียมเป็นส่วนผสมของคาร์โบไฮเดรตกับซีรัม การจะเลือกใช้สารชนิดใด และต่อเชื้อประเภทใดนั้นควรมีการตรวจสอบการรอดชีวิตภายหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็งเสียก่อน ตัวอย่างเช่น การตรวจสอบการรอดชีวิตของเชื้อ *Haemophilussuis* เมื่อเก็บรักษาเชื้อที่ทำแห้งไว้ ณ อุณหภูมิ 45° ซ โดยตรวจสอบผลเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ช่วงๆภายในระยะเวลา 3 เดือน การทดลองนี้ใช้คาร์โบไฮเดรตเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ หรือตามที่ระบุไว้ผสมกับซีรัมของม้า ผลการตรวจสอบพบว่าส่วนผสมของอินอซิตอลกับซีรัมจะทำให้เชื้อรอดชีวิตมากที่สุด แต่ส่วนผสมของอะราบิโนสไซโลสกับซีรัม (arabinose-xylose-serum) จะทำให้เชื้อรอดชีวิตน้อยที่สุด

กิจกรรมของสารป้องกันความเย็นจะสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น โดยทั่วไปสารที่ช่วยป้องกันได้ดีจะต้องมีหมู่ไฮโดรเจนคาร์บอนอยู่ในโมเลกุลสามหมู่หรือมากกว่าและมีหมู่ที่ไอโอไนสได้อยู่ด้วย คือ มีหมู่อะมิโนอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟ่าคาร์บอล มีหมู่คาร์บอซีและหมู่ไฮโดรเจนบอนด์ พบว่าการเติมสารจำพวกที่มีหมู่อะมิโน จะมีส่วนลดพิษของอนุมูลคาร์บอนิลได้ ในสารประกอบจำพวกน้ำตาลและพอลิแอลกอฮอล์มีหมู่ไฮดรอกซีมากกว่าห้าหมู่ ซึ่งอาจช่วยในการป้องกัน เช่น ไซลิตอลมีผลในการป้องกัน แต่อีริทรีตอลไม่มีผลป้องกัน นอกจากนี้ขนาดของโมเลกุลก็มีส่วนสำคัญ เช่น กลูตาเมต มีกิจกรรมสูงเมื่อเทียบกับสารพวกแอลฟ่าอะมิโนไดคาร์บอกซิเลต ซอร์บิตอล สามารถช่วยป้องกันได้แต่แมนนิตอลและดูลซิตอลไม่มีผลในการป้องกัน สิ่งสำคัญซึ่งค่อนข้างซับซ้อนอีกประการหนึ่ง ก็คือ สารป้องกันความเย็น ต้องสามารถป้องกันเชื้อแห้งจากผลทางกายภาพระหว่างที่สภาวะแวดล้อมของกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเช่น กลีเซอรอลและ dimethylsulfoxide ความเข้มข้น 0.5 M จะซึมเข่าสู่เซลล์ช่วยลดความเสียหายเมื่อน้ำถูกขจัดออก สารประกอบขนาดใหญ่เช่น ซีรัม อัลบูมิน เดกสแตรนและ polyvinylpyrrolidone ความเข้มข้น 10^{-5}-10^{-3} M จะไม่เข้าสู่เซลล์แต่รวมอยู่ที่ผิวของเซลล์ และป้องกันการสัมผัสกับอากาศในขณะที่เปิดหลอดเพื่อนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงใหม่ เชื้อที่ทำแห้งต้องมีลักษณะเป็นเค้ก (cake) ไม่ควรเป็นผง (powder) การเลือกอาหารที่สมบูรณ์เพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำแห้งหลังจากที่เก็บรักษาไว้นาน ก็จะมีผลให้เชื้อรอดชีวิตได้มากขึ้น

การใช้สารป้องกันความเย็นของศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์โดยเฉพาะ ACTT ประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้สคิมมิลค์ 20 เปอร์เซ็นต์ ผสมเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ การใช้สารพวกนี้ต้องไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ใช้เก็บรักษา และไม่นิยมเก็บรักษาเชื้อที่เจริญได้เฉพาะในอาหารที่ทราบองค์ประกอบทางเคมี (chemically defined media) และอาจใช้สารละลายซูโครส 24 เปอร์เซ็นต์ แทนสคิมมิลค์เพื่อเก็บรักษาเชื้อบางจำพวก โดยให้ส่วนผสมของเชื้อมีความเข้มข้นของน้ำตาลช่วงสุดท้ายเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจใช้กลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับให้ได้ความเข้มข้นช่วงสุดท้ายเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ศูนย์เก็บรักษาเชื้อ National Collection of Type Cultur (NCTC) ประเทศอังกฤษนิยมใช้ส่วนผสมซีรัมกับน้ำตาลกลูโคส 7.5 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย (รวมทั้งไมโคพลาสมา) ยีสต์และรา เชื้อแบคทีเรียซึ่งทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ NCTC สามารถรอดชีวิตได้สูง

การรอดชีวิตของเชื้อที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งนั้นขึ้นอยู่กับน้ำที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์และผลของปฏิกิริยาของสารป้องกันความเย็นกับองค์ประกอบของผิวเซลล์หรือสารที่มีอยู่ภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลง 85396 ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ สารป้องกันความเย็นจะทำให้อิเล็กโทรไลต์เป็นกลางไม่ทำให้ความสามารถเลือกนำสารเข้าออกของเมมเบรนเปลี่ยนแปลงหรือสูญไป และสารป้องกันความเย็นยังป้องกันไม่ให้เชื้อสัมผัสกับอากาศในขณะที่เปิดหลอดเพื่อนำไปเพาะเชื้อใหม่การจะเลือกใช้สารป้องกันความเย็นชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับผลการทดลองโดยสัมผัสกับประสิทธิภาพของเครื่องทำความเย็นและเครื่องดูดแห้ง การเก็บรักษาเครื่องที่ทำแห้งไว้ ณ อุณหภูมิที่ไม่เป็นอันตรายและการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำแห้งหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลานาน โดยใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงใหม่อย่างเหมาะสม ก็จะทำให้เชื้อมีชีวิตรอดเป็นจำนวนมาก

2.11 การวัดความสามารถในการหมัก

การวัดการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์สำหรับการหมักขนาดเล็ก เป็นสิ่งที่แสดงถึงชีวิตของยีสต์ ซึ่งอ้างถึงการวัดกิจกรรมเมแทบอลิซึมของยีสต์ (yeast vitality) นั้นยากกว่าที่จะกำหนดความสมบูรณ์หรือความแข็งแรงของเชื้อ ปกติใช้การประเมินทางอ้อมโดยการวัดกิจกรรมเมแทบอลิซึมหรือกิจกรรมการหมัก โมเลกุลที่สารสะสมภายในเซลล์ pHภายนอกและภายในเซลล์ สัมประสิทธิ์การแลกเปลี่ยนแก๊ส (gaseous exchange coefficient) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้แสดงความสัมพันธ์กับการเจริญและการหมักหลายระดับ นอกจากนั้นไม่มีวิธีใดวิธีหนึ่งที่ใช้เดี่ยวๆแล้วสามารถประเมินกิจกรรมทางสรีรวิทยาของยีสต์ได้อย่างแม่นยำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

1. ชุดอุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
3. เครื่องทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์ (lyophilizer)
4. หลอดทดลอง
5. ขวดไลโอฟิไลซ์
6. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
7. กล้องจุลทรรศน์
8. ฮีมาไซโตมิเตอร์
9. เครื่องชั่งน้ำหนัก
10. ตู้ปลอดเชื้อ

3.1.2 สารเคมี

1. หางนมผง (skim milk)
2. ยีสต์สกัด (yeast extract)
3. มอลต์สกัด (malt extract)
4. ทรีฮาโลส (trehalose)
5. แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth (yeast extract malt extract broth)
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar (yeast extract malt extract agar)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar (yeast extract peptone dextrose agar)
9. กรดทราทาริค (tartaric acid)
10. สารละลาย 0.003 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2

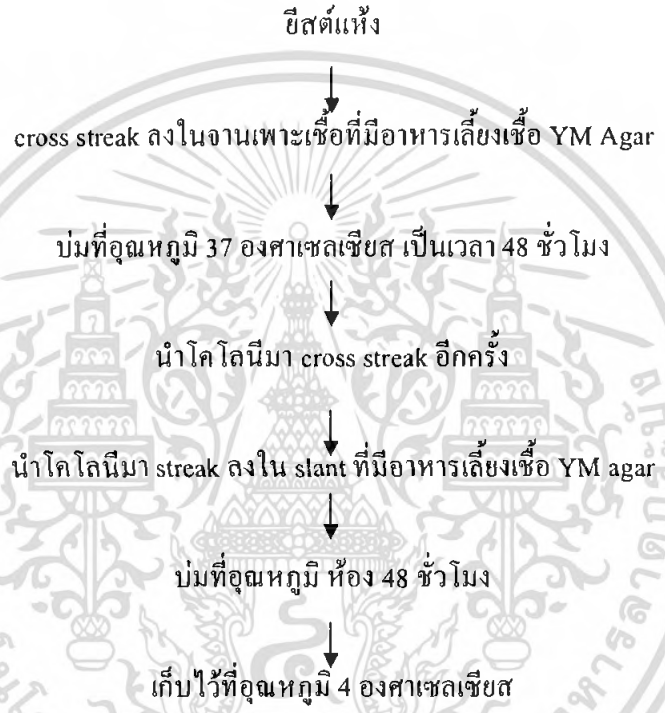
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Champagne

3.3 การเตรียมเชื้อยีสต์และอุปกรณ์ในการทดลอง

3.3.1 การแยกเชื้อยีสต์บริสุทธิ์จากยีสต์แห้ง



3.3.2 การเตรียมสารไลโอโพรเทคแทนต์

3.3.2.1 การเตรียมหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์

1. ชั่งหางนมผง 10 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ100 มิลลิลิตร

2. นำไปใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝา

3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อครั้งที่ 1 ที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เมื่อได้เวลา ให้นำหางนมผงออกจากเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อทันทีโดยค่อยๆ เปิดไล่ให้ความดันค่อยๆลดลงจนใกล้ 0 แล้วจึงค่อยเปิดฝาเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อเอาหางนมผงออกมาโดยไม่ต้องรอให้อุณหภูมิลดลงเอง ไม่เช่นนั้น หางนมผง จะเกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้)

4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นเป็นเวลา 1 คืน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออีกครั้งที่อุณหภูมิและเวลาเท่าเดิม
6. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปเก็บแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส

3.3.2.2 การเตรียมมอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์

1. ชั่งมอลต์สกัด 10 กรัม
2. นำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลี
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. เก็บแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส

3.3.2.3 การเตรียมยีสต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์

1. ชั่งมอลต์สกัด 10 กรัม
2. นำมาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลี
3. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
4. เก็บแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส

3.3.2.4 การเตรียมทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์

1. ชั่งทรีฮาโลส 0.4 กรัม
2. ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร
3. นำทรีฮาโลสที่ได้มาฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร
4. เก็บแช่เย็น

3.3.2.5 การเตรียมหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์

1. นำ หางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 100 มิลลิลิตร มาผสมกับทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2.4 0.04 มิลลิลิตร
2. นำ หางนมผงผสมทรีฮาโลส เก็บแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส

3.3.2.6 การเตรียมมอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์

1. นำมอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 100 มิลลิลิตร มาผสมกับทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2.4 0.04 มิลลิลิตร
2. นำมอลต์สกัดผสมทรีฮาโลส เก็บแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส

3.3.2.7 การเตรียมยีสต์สกัด10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์

1. นำยีสต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 100 มิลลิลิตร มาผสมกับทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.2.4 0.04 มิลลิลิตร
2. นำยีสต์สกัดผสมทรีฮาโลส เก็บแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส

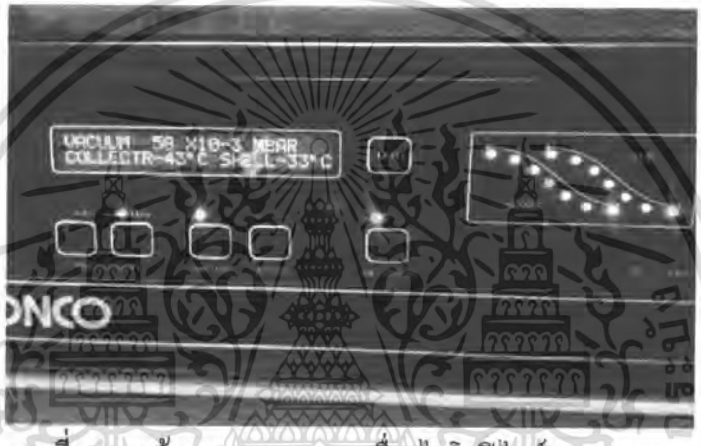
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์

3.4.1 การเตรียมเครื่องไลโอฟิไลซ์

3.4.1.1 เสียบปลั๊กรอ 5 นาที จากนั้นเปิดสวิทส์

3.4.1.2 กดปุ่ม MAN รอจนกราฟแสดงอุณหภูมิแสดงไฟสีเขียวขึ้นมาจนครบทุกช่อง (อุณหภูมิจะต้องมีค่าต่ำกว่า -40 องศาเซลเซียส) จากนั้นกดปุ่ม Vacuum เครื่องจึงจะเริ่มทำงาน รอจนค่าความดันลดลงจนทำให้กราฟของเครื่องแสดงค่าครบทุกช่อง จึงเริ่มทำการบรรจุตัวอย่างลงเครื่องได้ (ความดันมากที่สุดที่กราฟจะแสดงผลครบทุกช่องคือ $133x10^{-3}$ มิลลิบาร์)



ภาพที่ 3.1 หน้าจอแสดงผลของเครื่องไลโอฟิไลซ์

3.4.2 การใส่ตัวอย่างลงหลอดทดลองหรือขวดไลโอฟิไลซ์

3.4.2.1 นำตะกอนยีสต์ที่ผ่านการเลี้ยงมา 96 ชั่วโมง มาผสมกับสารไลโอโพรเทคแทนต์ตามอัตราส่วนที่ต้องการ

3.4.2.2 นำตะกอนยีสต์ที่ผสมกับสารไลโอโพรเทคแทนต์มาใส่ลงในหลอดทดลองหรือขวดไลโอฟิไลซ์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.4.2.3 นำไปทำให้แข็งโดยใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -30 องศาเซลเซียส แช่หลอดทดลองหรือขวดไลโอฟิไลซ์ ไว้จนกว่าสารละลายยีสต์จะแข็งทั้งหมด เป็นเวลาประมาณ 1-3 ชั่วโมง

3.4.2.4 นำหลอดหรือขวดสารละลายยีสต์ที่แข็งแล้วใส่เครื่องไลโอฟิไลซ์ ก่อนใส่แต่ละหลอดหรือขวดต้องรอให้สุญญากาศ $\leq$ ขนาด $133x\ 10^{-3}$ มิลลิบาร์

3.4.2.5 รอให้เชื้อแห้งทิ้งไว้ประมาณ 4 - 12 ชั่วโมง (สังเกตโดยดูสุญญากาศจะคงที่และมีค่าใกล้เคียงกับค่าสุญญากาศเริ่มต้น)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.6 ดึงหลอดหรือขวดออกมา 1- 2 หลอดหรือขวด แล้วกดสุญญากาศออก แล้วดึงหลอดและขวดทั้งหมดออกมา

3.4.2.7 เก็บยีสต์แห้งที่ได้ ใส่ถุงพลาสติก

3.4.2.8 นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การศึกษาระยะการเจริญของเซลล์ยีสต์

3.5.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

นำเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Champagne ที่ผ่านการแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้วถ่ายลงใน YM broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

เชื้อยีสต์ที่ผ่านการแยกเชื้อบริสุทธิ์

↓

ถ่ายเชื้อยีสต์ลงใน YM Broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

↓

เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.5.1.2 การเลี้ยงเชื้อยีสต์

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ในอัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร YM broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง ตรวจดูเซลล์ยีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ในอัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหาร YM Broth ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร

↓

เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

↓

เก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง

ตรวจดูเซลล์ยีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือกระยะเวลาการเจริญของเซลล์ยีสต์ที่อยู่ในช่วงระยะจี 1 (G1) ของวงจรเซลล์ยีสต์ (cell cycle) คือลักษณะของเซลล์ไม่เกิดการแตกหน่อ และขนาดของเซลล์มีขนาดเท่ากัน เพื่อใช้ในการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ และใช้ในการศึกษาในข้อ 3.5.2 ต่อไป

3.5.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักยีสต์สดที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ภายหลังการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

3.5.2.1 เลี้ยงเชื้อยีสต์เช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 และเลี้ยงเป็นระยะเวลาตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.5.1

3.5.2.2 นำเซลล์ยีสต์มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

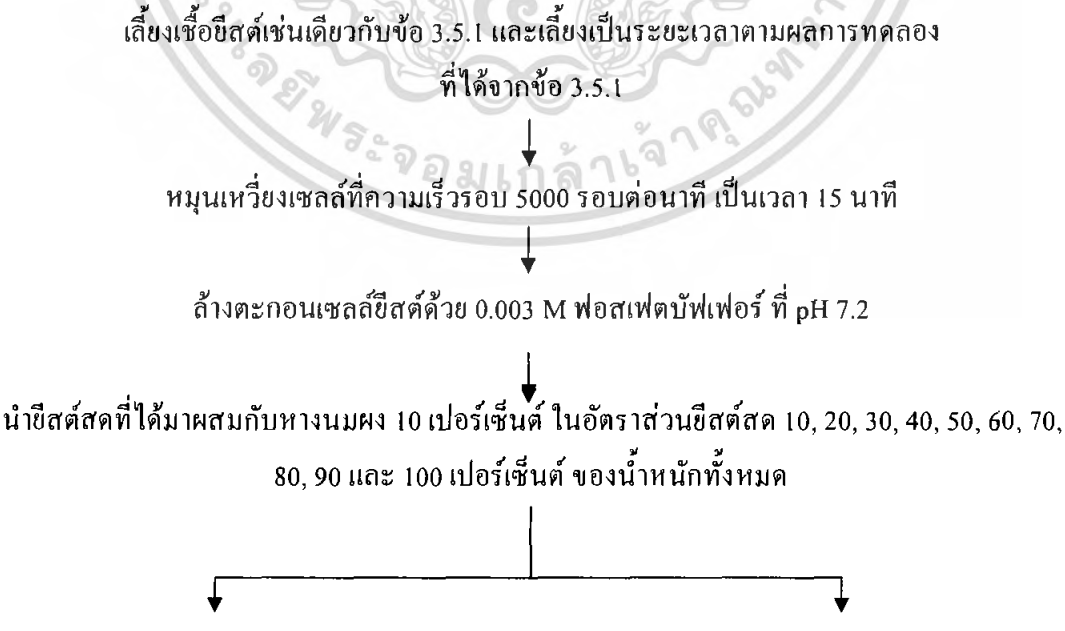
3.5.2.3 เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนยีสต์สดด้วย 0.003 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.2 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเทส่วนใสทิ้ง

3.5.2.4 นำยีสต์สดที่ได้มาผสมกับหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนยีสต์สด 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักทั้งหมด

3.5.2.5 ใส่ลงในหลอดไลโอฟิไลซ์หลอดละ 2 กรัม แล้วนำไปทำไลโอฟิไลซ์ และนับปริมาณเซลล์ยีสต์เริ่มต้นด้วยวิธีสเปรดเพลทก่อนทำไลโอฟิไลซ์ ด้วยอาหาร YPD agar

3.5.2.6 นำไปทำไลโอฟิไลซ์

3.5.2.7 เมื่อทำไลโอฟิไลซ์เสร็จ นำยีสต์ผงมาตรวจนับปริมาณยีสต์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธีสเปรดเพลทด้วยอาหาร YPD agar



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

↓ ↓

นับปริมาณเซลล์ยีสต์เริ่มต้น ด้วยวิธีสเปรดเพลทก่อนทำไลโอฟิไลซ์ บนอาหาร YPD Agar

ใส่ลงในขวดไลโอฟิไลซ์ แล้วนำไปทำไลโอฟิไลซ์

↓

นับปริมาณเยีสต์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธี spread plate หลังทำไลโอฟิไลซ์ บนอาหาร YPD Agar

เลือกปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ทำให้ เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์สูงที่สุด ในการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ เพื่อใช้ในการศึกษาในข้อ 3.5.3 ต่อไป

3.5.3 การศึกษาชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

3.5.3.1 เลี้ยงเชื้อยีสต์เช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 และเลี้ยงเป็นระยะเวลาตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.5.1

3.5.3.2 นำเซลล์ยีสต์มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.3.3 เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนเซลล์ยีสต์ด้วย 0.003 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.2 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเทส่วนใสทิ้ง

3.5.3.4 นำยีสต์สดผสมกับสารไลโอโพรเทคแทนต์ โดยปริมาณตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ผสมได้จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักยีสต์สดจากข้อ 3.5.2 และสารไลโอโพรเทคแทนต์ ที่ใช้มีดังนี้

- หางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์
- ยีสต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์
- มอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์
- หางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์
- ยีสต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์
- มอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์

3.5.3.5 นับปริมาณเซลล์ยีสต์เริ่มต้นด้วยวิธีสเปรดเพลท (spread plate) ก่อนทำไลโอฟิไลซ์ด้วยอาหาร YPD agar

3.5.3.6 แล้วนำไปทำไลโอฟิไลซ์

3.5.3.7 นับปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตรอดด้วยวิธีสเปรดเพลทหลังทำไลโอฟิไลซ์ ด้วยอาหาร YPD agar และตรวจการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงเชื้อยีสต์เช่นเดียวกับข้อ 3.5.1 และเลี้ยงเป็นระยะเวลาตามผลการทดลอง
ที่ได้จากข้อ 3.5.1

↓

หมุนเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

↓

ล้างตะกอนเซลล์ยีสต์ด้วย 0.003 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.2

↓

นำยีสต์สดผสมกับสารไลโอโพรเทคแทนต์ โดยปริมาณตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ผสมได้จาก
การศึกษาอัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักยีสต์สดจากข้อ 3.5.2
และสารไลโอโพรเทคแทนต์ ที่ใช้มีดังนี้

- หางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์
- ยีสต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์
- มอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์
- หางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์
- ยีสต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์
- มอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์

นับปริมาณเซลล์ยีสต์เริ่มต้น
ด้วยวิธีสเปรดเพลทก่อน
ทำไลโอฟิไลซ์ ด้วยอาหาร
YPD Agar

ใส่ลงในขวดไลโอฟิไลซ์
แล้วนำไปทำไลโอฟิไลซ์

↓

นับปริมาณยีสต์ที่มีชีวิตรอด
ด้วยวิธีสเปรดเพลทหลัง
ทำไลโอฟิไลซ์ ด้วยอาหาร
YPD Agar

เลือกชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ ที่ทำให้ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์สูงที่สุด ในการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ เพื่อใช้ในการศึกษาในข้อ 3.5.4 ต่อไป

3.5.4 การทดสอบแอคทิวิตี้การหมักของยีสต์แห้ง

3.5.4.1 การรีไฮเดรตยีสต์ (rehydrate)

ชั่งยีสต์แห้ง 1 กรัม ใส่ลงในน้ำปริมาตร 40 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 15 นาที นำมาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.2 การทดสอบการหมัก (gasometric method) (ดัดแปลงจาก G. Reed. and S.L. Chen., 1978)

1. นำสารละลายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1 ปิเปตมา 7.5 มิลลิลิตร ถ่ายเชื้อลงในน้ำสับปะรดสำหรับทำไวน์เข้มข้น 16 องศาบริกซ์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร
2. ปิดด้วยจุกที่บรรจุกรดซัลฟูริกเข้มข้น เพื่อดักไอน้ำและก๊าซอื่นๆ ยกเว้น CO_2
3. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็ว 100 รอบต่อนาที
4. นำขวดรูปชมพู่ออกมาชั่งทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

สารละลายเชื้อจากข้อ 3.5.4.1

↓

ถ่ายเชื้อปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำสับปะรดสำหรับทำไวน์เข้มข้น 16 องศาบริกซ์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร

↓

ปิดด้วยจุกที่บรรจุกรดซัลฟูริกเข้มข้น เพื่อดักไอน้ำและก๊าซอื่นๆ ยกเว้น CO_2

↓

เขย่าด้วยเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็ว 140 รอบต่อนาที

↓

นำขวดรูปชมพู่ หมักออกมาชั่งทุกๆ 30 นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที

เลือกแอคติวิตีการหมักของยีสต์แห้งที่ทำให้ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์สูงที่สุดในการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ เพื่อใช้ในการศึกษาในข้อ 3.5.5 ต่อไป

3.5.5. การทดสอบการหมักไวน์สับปะรด

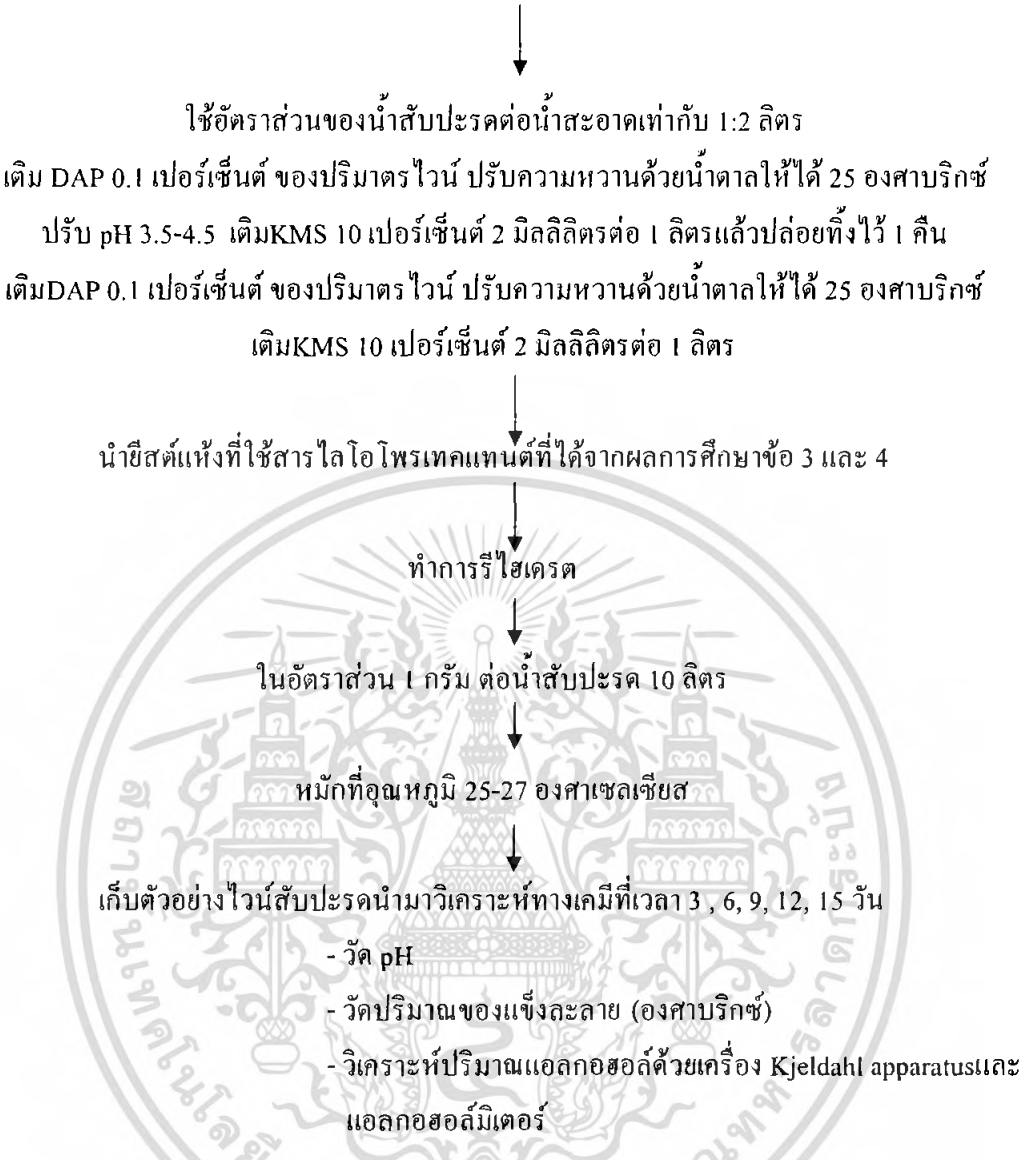
ล้างสับปะรดด้วยน้ำเปล่าแล้วนำมาแช่น้ำที่ผสมกับ KMS 10 เปอร์เซ็นต์ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที

↓

นำมาปลอกเปลือกแล้วคั้นเอาน้ำสับปะรดด้วยเครื่องสกรูเพลต

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

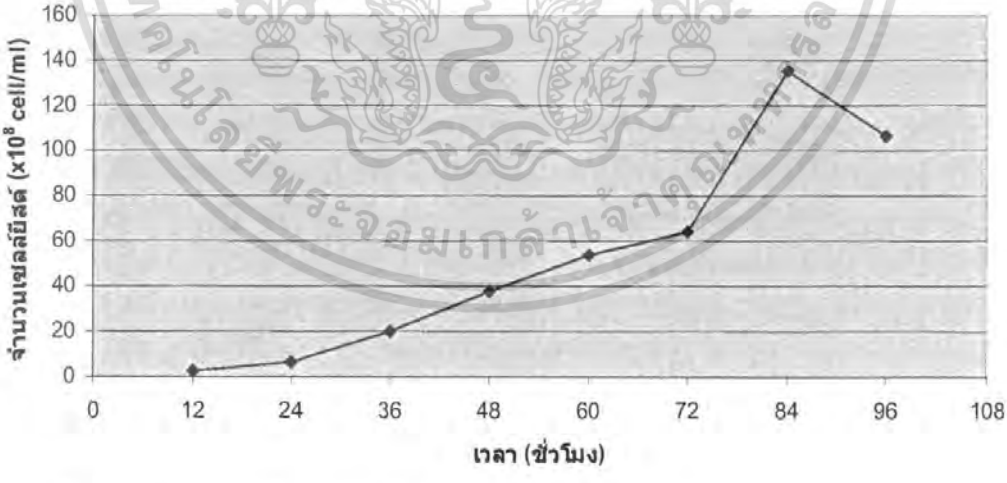


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

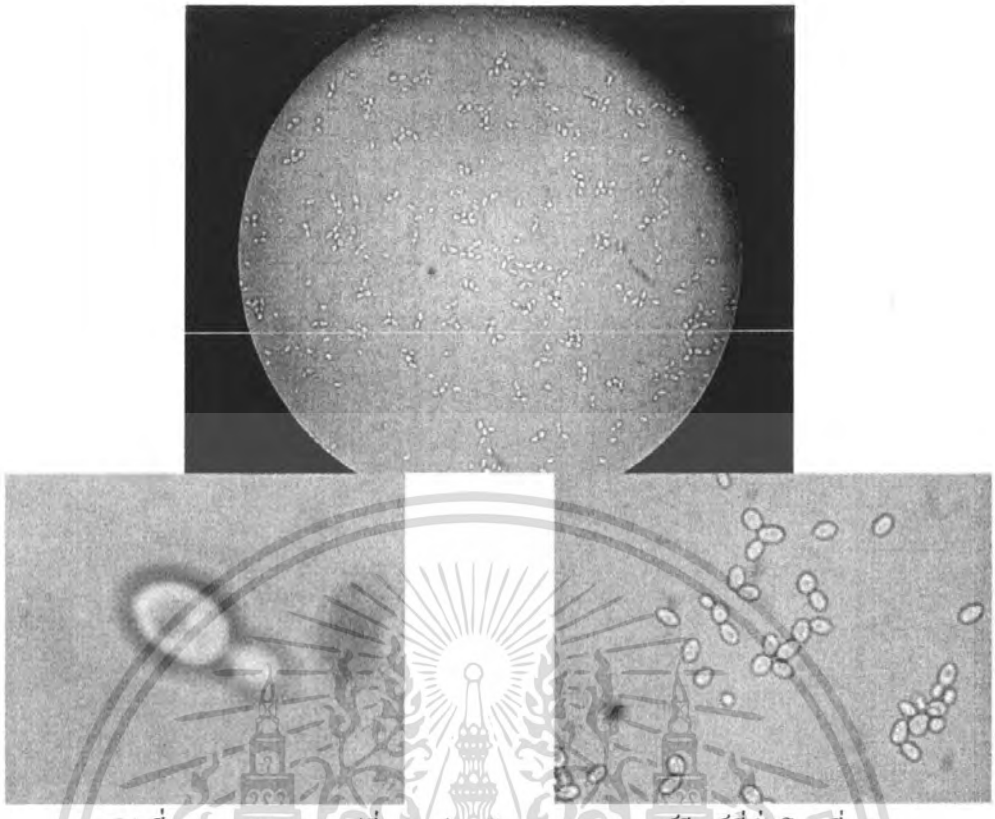
4.1 การศึกษาระยะการเจริญของเซลล์ยีสต์

จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องดูลักษณะของเซลล์ยีสต์ ได้เลือกช่วงระยะเวลาที่ 84 ชั่วโมง เพราะว่าการเจริญของเซลล์ยีสต์ที่อยู่ในช่วงระยะจี 1 (G1) ของวงจรเซลล์ยีสต์ คือลักษณะของเซลล์ไม่เกิดการแตกหน่อ และขนาดของเซลล์มีขนาดเท่ากัน ซึ่งสังเกตได้จากภาพที่ 4.1 และ 4.2 ที่ชั่วโมงที่ 84 เมื่อสารอาหารหมดเซลล์ยีสต์จะไม่มีการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน จึงทำให้โปรตีนมีปริมาณที่น้อย ซึ่งจะทำให้เมื่อนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเป็นยีสต์สดออกมา จะทำให้เซลล์ยีสต์ไม่แตก และจากการที่เซลล์ยีสต์ใช้อาหารจนหมดนี้ ทำให้แหล่งไนโตรเจนไม่มี เซลล์ยีสต์จึงเกิดการขาดแคลนแหล่งไนโตรเจน ซึ่งจะทำให้มีเซลล์มีแต่แหล่งคาร์บอน ซึ่งเซลล์จะเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่สะสมอยู่นี้ไปเป็นกลีเซอรอล ซึ่งกลีเซอรอลนี้จะช่วยลดแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ยีสต์ ช่วยลดเซลล์ยีสต์แตกระหว่างการแช่เยือกแข็ง ซึ่งการแช่เยือกแข็งเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการไลโอฟิไลซ์และจากการที่สารอาหารหมดนี้ ยังทำให้เซลล์ยีสต์สร้างสารตัวนึงขึ้นมา นั่นก็คือ ทรีฮาโลส ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

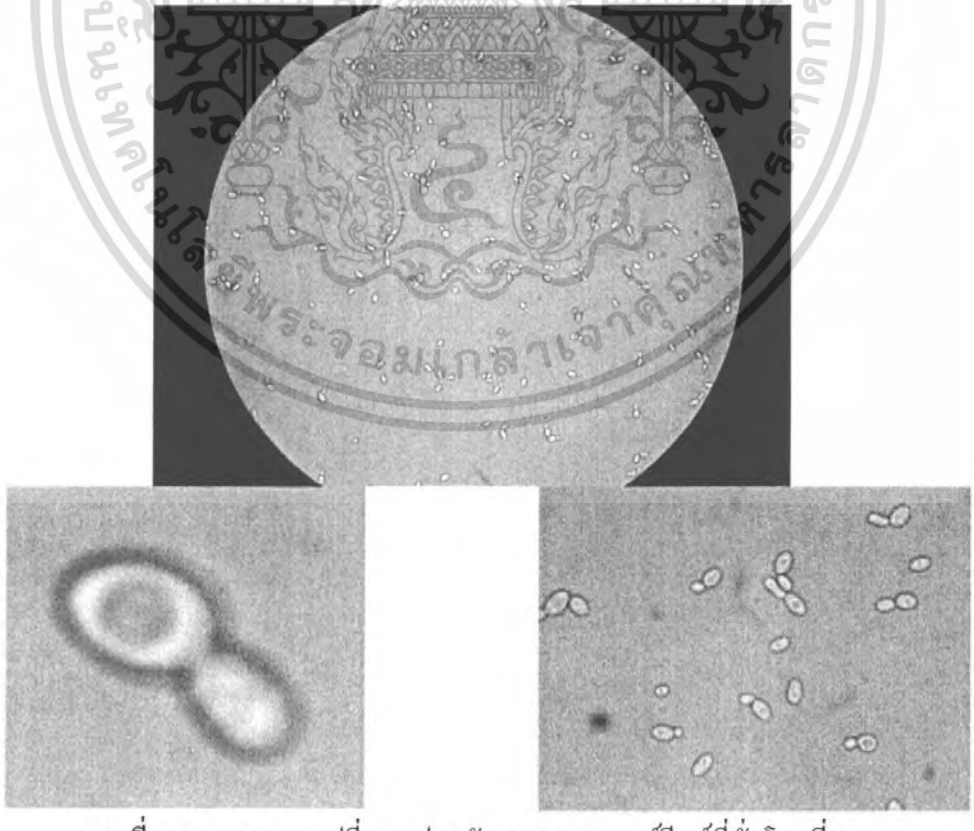


ภาพที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ช่วงเวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

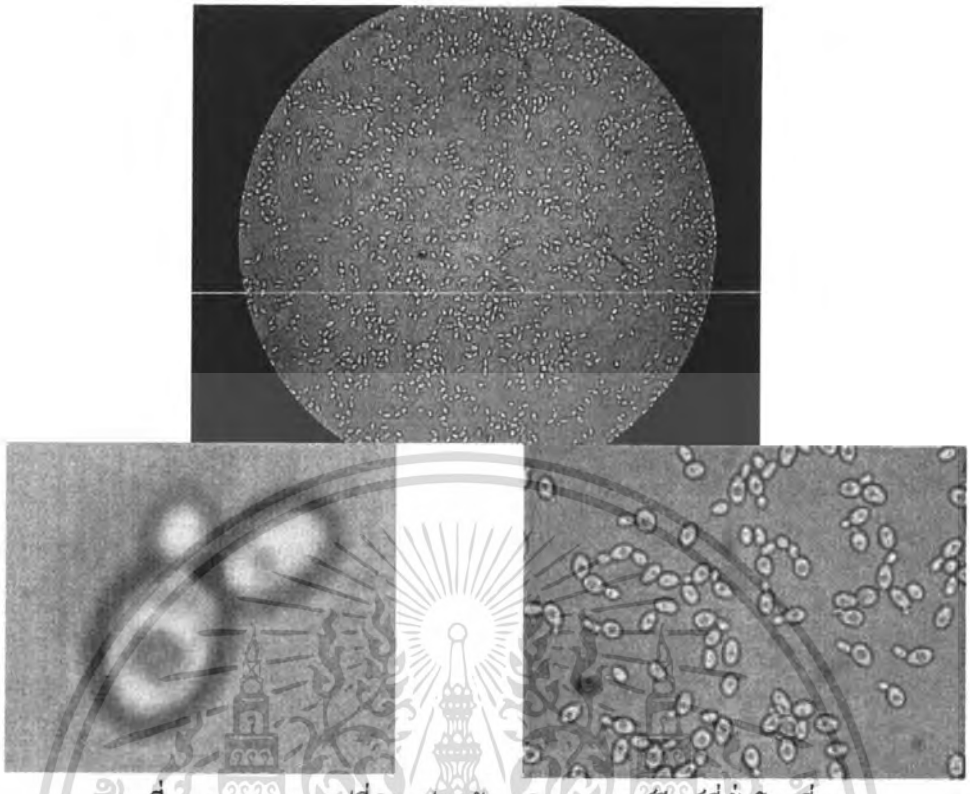


ภาพที่ 4.2 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 12

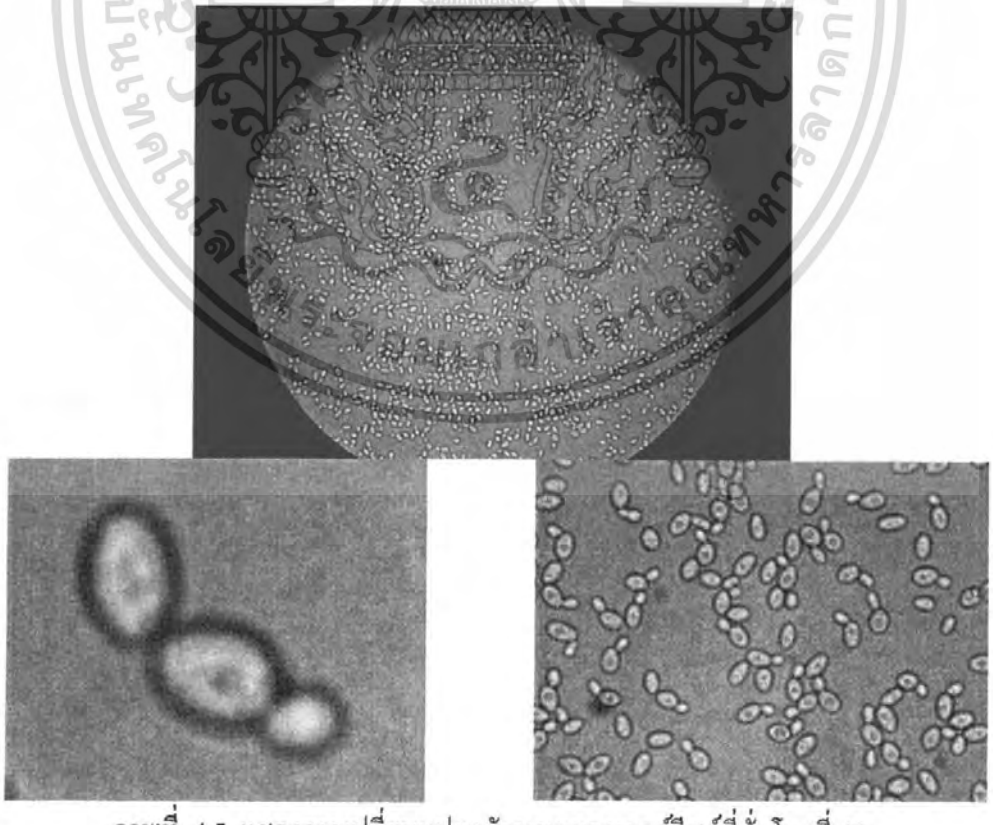


ภาพที่ 4.3 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

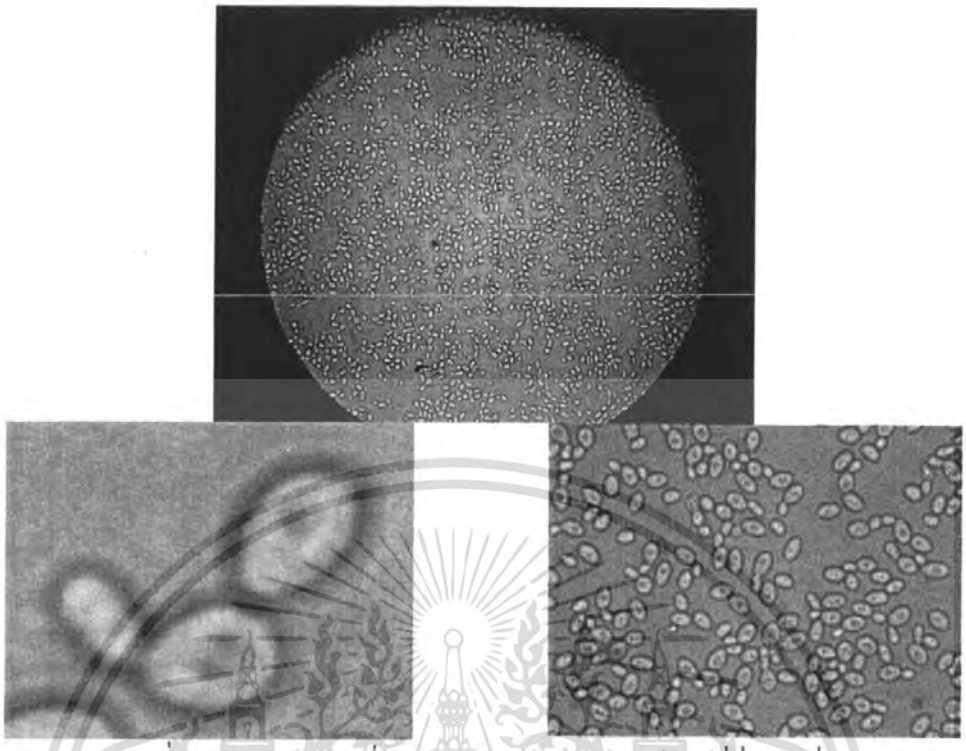


ภาพที่ 4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 36

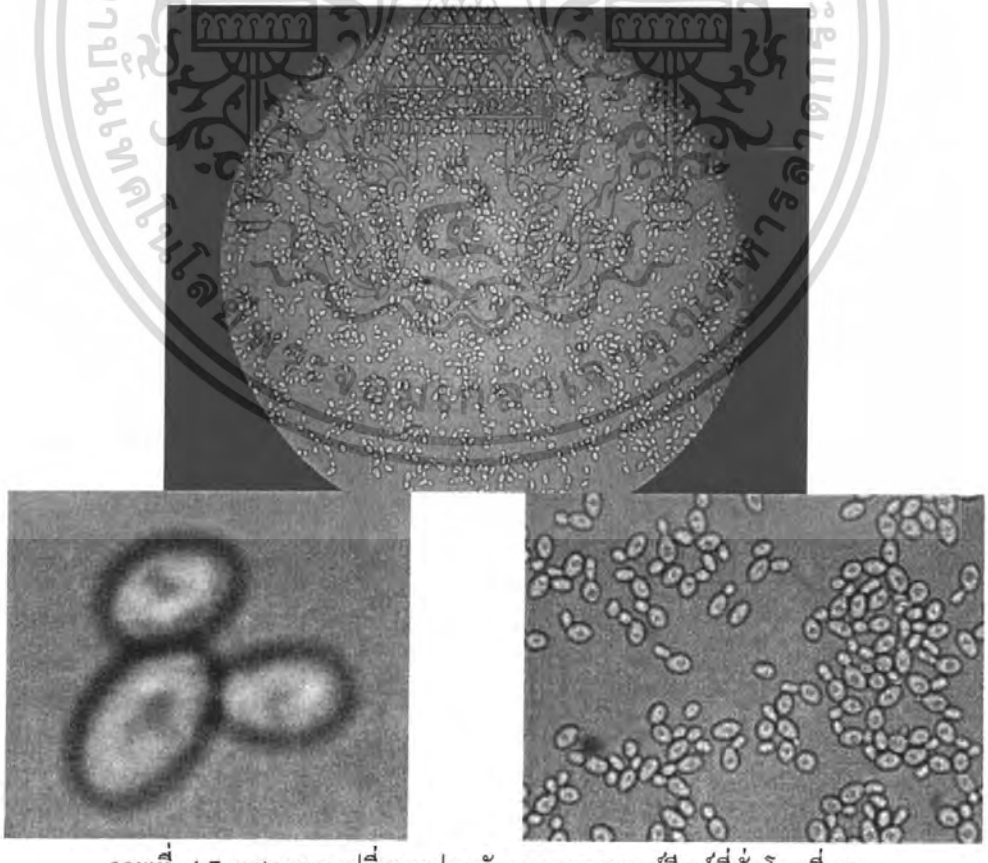


ภาพที่ 4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

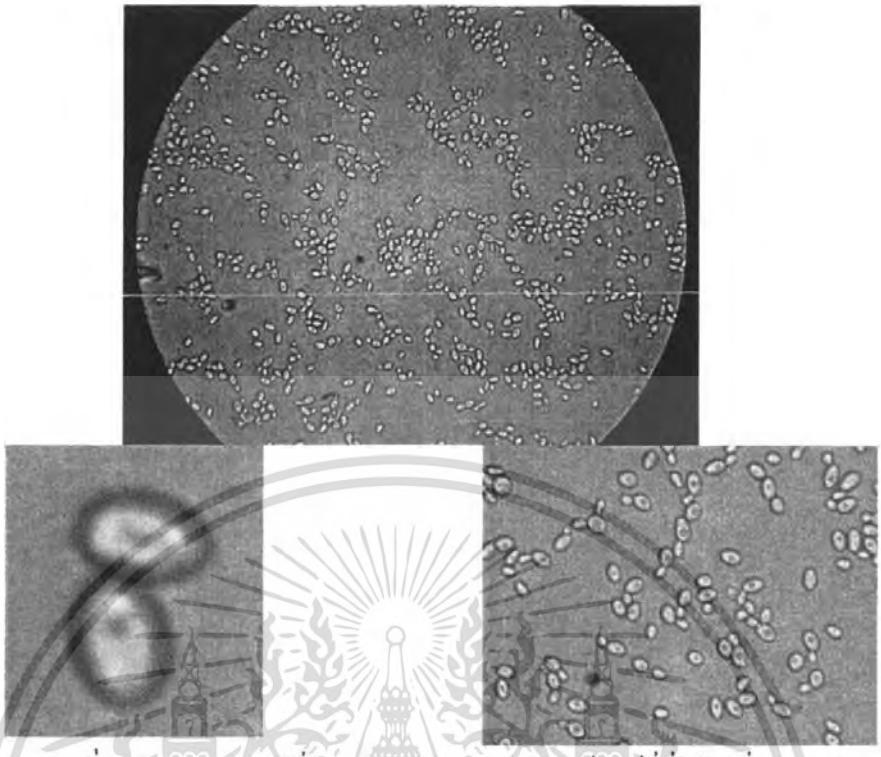


ภาพที่ 4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 60

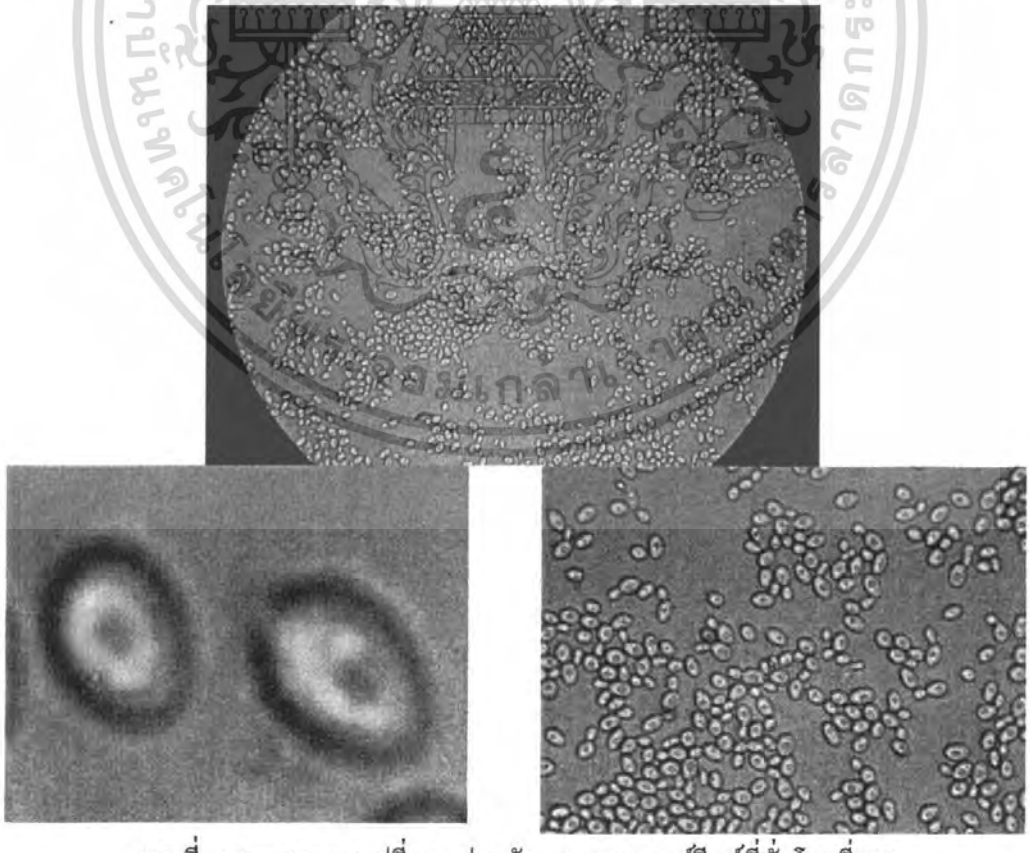


ภาพที่ 4.7 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 84

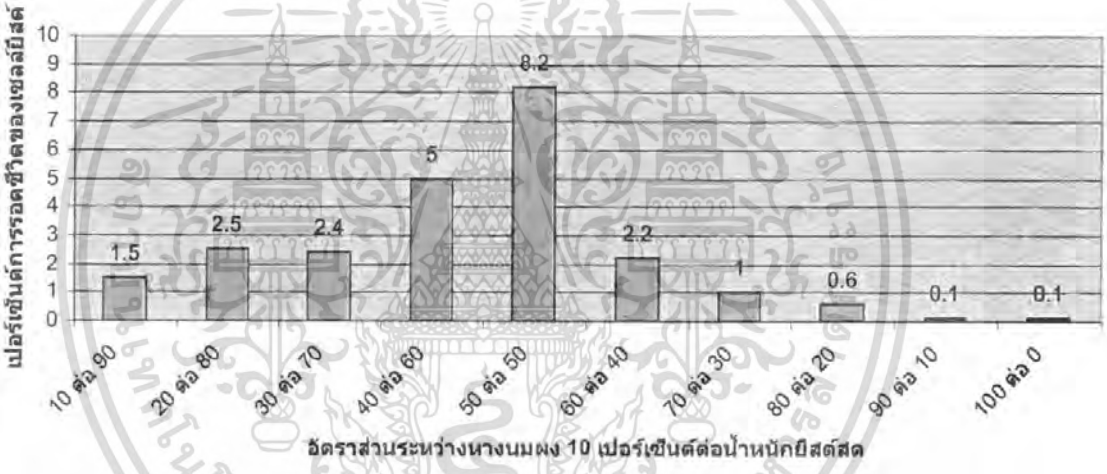


ภาพที่ 4.9 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาอัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักยีสต์สดที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ภายหลังการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

จากผลการทดลองที่ 4.1 ซึ่งจะใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ เป็นเวลา 84 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาหมุนเหวี่ยง เพื่อแยกตะกอนยีสต์ออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำมาเข้าสู่กระบวนการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ซึ่งจะต้องทราบอัตราส่วนระหว่างสารไลโอโพรเทคแทนต์ต่อน้ำหนักยีสต์สด จึงได้ทำการทดลองศึกษาอัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักยีสต์สดต่อการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ภายหลังการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ได้ผลออกมาดังภาพที่ 4.10 จากภาพอัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักยีสต์สด คือ 50 : 50 มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ 8.2 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น การใช้ยีสต์สดกับสารไลโอโพรเทคแทนต์ จึงใช้ในอัตรา 1 ต่อ 1



ภาพที่ 4.10 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ยีสต์ในการศึกษาปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมในการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

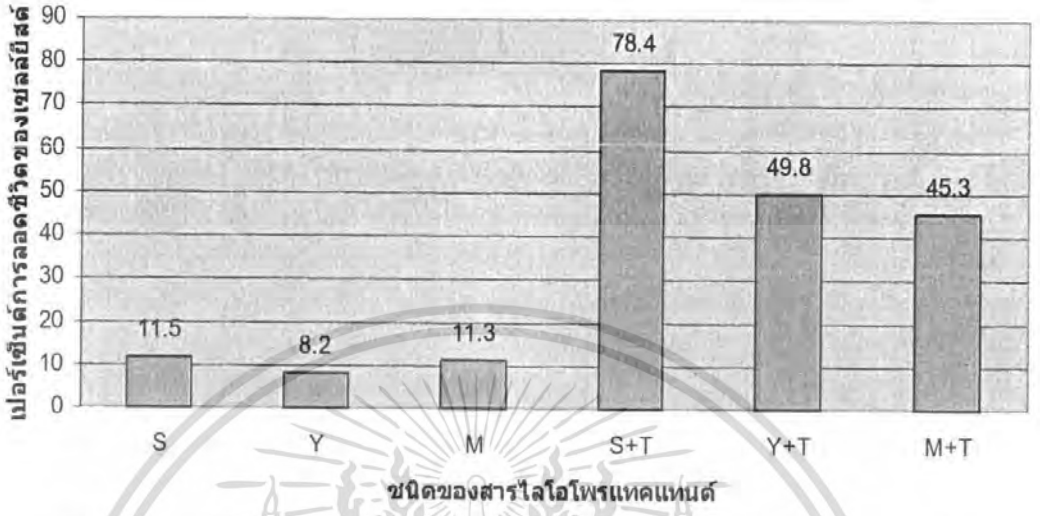
4.3 การศึกษาชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

ผลการทดลองจากข้อ 4.1 และ 4.2 ได้นำมาทำการศึกษาชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ต่อ ซึ่งได้ผลดังภาพที่ 4.11

และจากภาพที่ 4.11 แสดงให้เห็นว่าการเติมทรีฮาโลสลงในสารไลโอโพรเทคแทนต์ชนิดอื่นๆ ทำให้เซลล์ยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าสารไลโอโพรเทคแทนต์เพียงชนิดเดียว โดยหางนมผง + ทรีฮาโลส มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 78.4 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ยีสต์สกัด + ทรีฮาโลส และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มอลต์สกัด + ทรีฮาโลส ตามลำดับ และได้นำทั้งสามตัวอย่างที่มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดไปทำการวัดแอคติวิตีในการหมักต่อไป



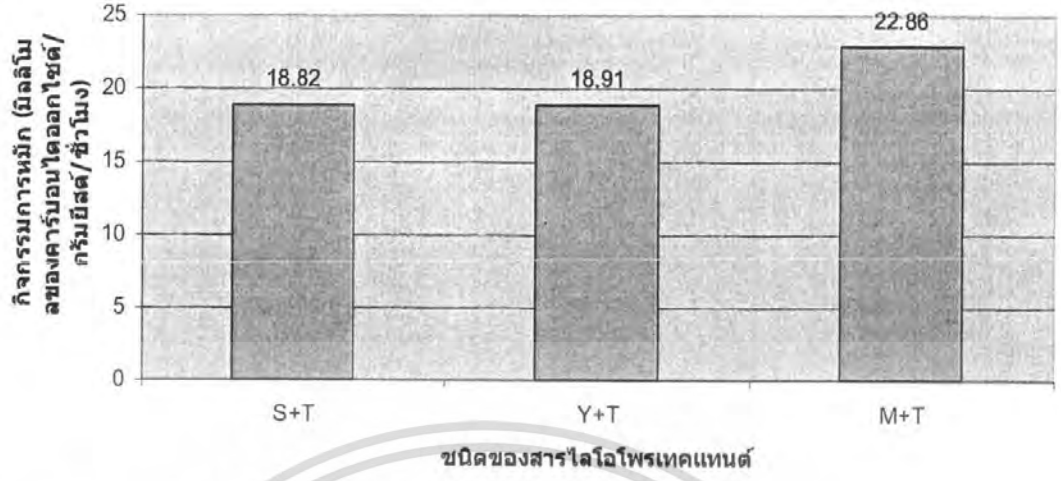
ภาพที่ 4.11 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ยีสต์ในการศึกษาชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

หมายเหตุ S = หางนมผง S+T = หางนมผง + ทรีฮาโลส
Y = ยีสต์สกัด Y+T = ยีสต์สกัด + ทรีฮาโลส
M = มอลต์สกัด M+T = มอลต์สกัด + ทรีฮาโลส

4.4 การทดสอบแอคติวิตีการหมักของยีสต์แห้ง

การผลิตยีสต์แห้งนั้นวัดจำนวนเชื้ออย่างเดียวไม่ได้ต้องทำการวัดแอคติวิตีการหมักร่วมด้วยจึงจะสรุปผลได้ ซึ่งให้ผลดังภาพที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่า ว่า มอลต์สกัด + ทรีฮาโลส มีแอคติวิตีการหมักสูงที่สุดคือ มีการปล่อย CO_2 ออกมามากที่สุด คือ 22.86 มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง ดังนั้นยีสต์ที่ใช้หางนมผง + ทรีฮาโลสเป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์ จะทำให้การมีชีวิตรอดสูงที่สุด แต่กลับพบว่ายีสต์ที่ใช้ มอลต์สกัด + ทรีฮาโลส เป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์ ให้แอคทิวิตี้การหมักสูงกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 การทดสอบแอคติวิตีการหมักของยีสต์แห้ง

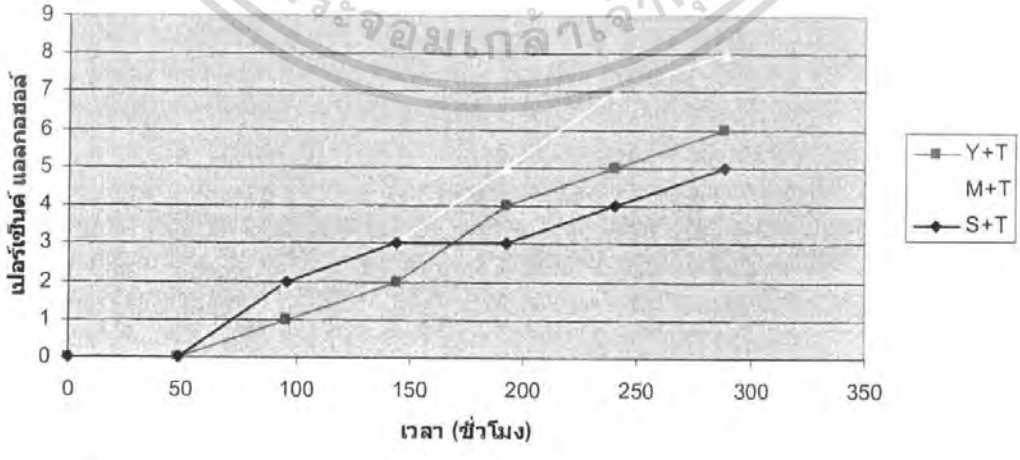
หมายเหตุ S+T = หางนมผง + ทรีฮาโลส

Y+T = ยีสต์สกัด + ทรีฮาโลส

M+T = มอลต์สกัด + ทรีฮาโลส

4.5 การทดสอบการหมักไวน์สับปะรด

ได้ทำการทดสอบการหมักไวน์สับปะรด ได้ผลดังภาพที่ 4.13 ซึ่งสรุปได้ว่าชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ มอลต์สกัด + ทรีฮาโลส มีการผลิตแอลกอฮอล์สูงที่สุด รองลงมาคือ ยีสต์สกัด + ทรีฮาโลส และหางนมผง + ทรีฮาโลส ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างแน่ชัดว่า มอลต์สกัด + ทรีฮาโลส เป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสม



ภาพที่ 4.13 แสดงการทดสอบหมักไวน์สับปะรดด้วยยีสต์แห้งที่ใช้สารไลโอโพรเทคแทนต์ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองทำการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* Champagne ในอาหาร YM broth ที่ชั่วโมงต่าง ๆ พบว่าช่วงระยะเวลาที่ 84 ชั่วโมง เหมาะสมกับการนำมาทำไลโอฟิไลซ์ เพราะว่า การเจริญของเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วงระยะจี 1 (G1) ของวงจรเซลล์ยีสต์ คือลักษณะของเซลล์ไม่เกิดการแตกหน่อ และขนาดของเซลล์มีขนาดเท่ากัน ต่อมาได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ที่เหมาะสมพบว่าอัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักยีสต์สด คือ 50 : 50 มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด คือ 8.2 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกมาทำการไลโอฟิไลซ์ โดยใช้สารไลโอโพรเทคแทนต์ 4 ชนิด คือ หางนมผง, ยีสต์สกัด, มอลต์สกัด และทรีฮาโลส เพื่อหาชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ ที่เหมาะสมต่อการทำแห้ง พบว่าการเติมทรีฮาโลสลงในสารไลโอโพรเทคแทนต์ชนิดอื่นๆ ทำให้เซลล์ยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าสารไลโอโพรเทคแทนต์เพียงชนิดเดียวโดยหางนมผงผสมทรีฮาโลสเป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่ทำให้เซลล์ยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 78.4 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบแอคทิวิตี้การหมักพบว่ายีสต์แห้งที่ใช้มอลต์สกัดผสมทรีฮาโลสเป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์มีแอคทิวิตี้ของการหมัก 22.86 มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าหางนมผงผสมทรีฮาโลส เมื่อนำยีสต์แห้งมาทำการทดสอบการหมักไวน์สับปะรดพบว่าชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์มอลต์สกัดผสมทรีฮาโลสให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงที่สุด รองลงมาคือ ยีสต์สกัดผสมทรีฮาโลส และหางนมผงผสมทรีฮาโลส ตามลำดับ ดังนั้นมอลต์สกัดผสมทรีฮาโลสเป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2544. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์ (Preservative technique of microorganisms)**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์ ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชนิกานต์ ธนูพิทักษ์ และ อนุชา อรุณมหารัตนกุล. 2549. **การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* var. *montrachet* และชนิดของสารไครโอโปรเทคแทนที่เหมาะสมเพื่อผลิตยีสต์แป้งสำหรับทำไวน์ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์**. ปัญหาพิเศษ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ

ลลิตา อุปสัน, เลอสิริ ก้องเกียรติวงศ์ และ วาสนา หมื่นอักษร. 2550. **การศึกษาผลของชนิดของสารไครโอโปรเคแทนต์ต่อการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์**. ปัญหาพิเศษ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ

Gerald, R. and Nagodawithana, T.W. 1991. **Yeast Technology**. New York. : The AV1 Pulisher.

Reed, G. and Chen, S.L. 1978. "Evaluating commercial active dry wine yeasts by fermentation activity." **Am. J. Enol. Vitic. 29(3)** : 165-168

นงลักษณ์ สิทธิเจริญชัย. **"ทรีฮาโลสหรือน้ำตาลเห็ด"**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://yalor.yru.ac.th/~dolah/notes/4034605-2-48/REP-13/R_404652001-13.doc

บุญรอด วงษ์สวาท. **"ซูโครส (sucrose)"**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.promma.ac.th/chemistry/Biomolecule/Biomolecule032.htm

เอกดนัย กอกิมพงษ์. **"เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง"**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.thaiscience.com/lab_vol/p30/freeze%20dryer.asp

วิภาพรรณ ผจงวิริยาทร. **"เทคโนโลยี Freeze – drying"**. [online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.gpo.or.th/rdi/html/freeze-drying.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. yeast extract – malt extract (YM broth)

yeast extract	3	กรัม
malt extract	3	กรัม
peptone	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. yeast extract peptone dextrose (YPD agar)

yeast extract	5	กรัม
peptone	20	กรัม
dextrose	20	กรัม
agar	15	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

3. phosphate buffered dilution blank (PBB) pH 7.2

3.1 เตรียม stock solution

ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.2 โดยใช้สารละลาย 1 N NaOH ถ่ายใส่ฟลาสก์ตวงปริมาตร (volumetricขวดรูปชมพู่) ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

3.2 เตรียม working solution

ในการเตรียม phosphate buffered dilution blank (PBB) pH 7.2 หรือ Working solution ให้ปิเปต stock solution 1.25 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แบ่งบรรจุในภาชนะปริมาตรตามต้องการ แล้วทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงผลการศึกษาการเจริญของจำนวนเซลล์ยีสต์ที่เวลาต่างๆ กัน

ชั่วโมงที่	ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตรอด (เซลล์/มิลลิลิตร)
12	2.5×10^8
24	6.2×10^8
36	20×10^8
48	37.6×10^8
60	53.3×10^8
72	63.8×10^8
84	135.6×10^8
96	106.7×10^8

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงผลของอัตราส่วนระหว่างหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อยีสต์สดต่อการรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ภายหลังการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

อัตราส่วนโดยน้ำหนักของหางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ต่อยีสต์สด	ปริมาณเซลล์ (โคโลนี/มิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต
	ก่อนไลโอฟิไลซ์	หลังไลโอฟิไลซ์	
10 : 90	243.2×10^8	3.74×10^8	1.5
20 : 80	378.4×10^8	9.4×10^8	2.5
30 : 70	346.8×10^8	8.5×10^8	2.4
40 : 60	234.2×10^8	11.8×10^8	5.0
50 : 50	369.4×10^8	30.14×10^8	8.2
60 : 40	653.2×10^8	14.3×10^8	2.2
70 : 30	918.9×10^8	9.2×10^8	1.0
80 : 20	1076.6×10^8	6.4×10^8	0.6
90 : 10	6450.4×10^8	8×10^8	0.1
100 : 0	8671.2×10^8	9.2×10^8	0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ยีสต์ในการศึกษาชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์

ชนิดของสารไลโอโพรเทคแทนต์	ปริมาณเซลล์ (โคโลนี/มิลลิลิตร)		เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต
	ก่อนไลโอฟิไลซ์	หลังไลโอฟิไลซ์	
หางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์	23.4×10^8	2.7×10^8	11.5
ยีสต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์	23.1×10^8	1.9×10^8	8.2
มอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์	19.5×10^8	2.2×10^8	11.3
หางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์	24.5×10^8	19.2×10^8	78.4
ยีสต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์	21.9×10^8	10.9×10^8	49.8
มอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์	25.4×10^8	11.5×10^8	45.3

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงค่าการทดสอบแอคทิวิตี้การหมักของยีสต์แห้งชนิดต่าง ๆ

ชนิดของยีสต์แห้ง	แอคทิวิตี้การหมัก (มิลลิโมลของคาร์บอนไดออกไซด์/กรัมยีสต์/ชั่วโมง)
Saccharomyces cerevisiae Champagne ที่ใช้หางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์	18.82
Saccharomyces cerevisiae Champagne ที่ใช้ยีสต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์	18.91
Saccharomyces cerevisiae Champagne ที่ใช้มอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์	22.86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงค่าการทดสอบหมักไวน์สับปะรดด้วยยีสต์แห้งที่ใช้สารไลโอโพรเทคแทนต์ต่างกัน

ชนิดของยีสต์แห้ง	เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ที่หมักเป็นเวลา 288 ชั่วโมง
Saccharomyces cerevisiae Champagne ที่ใช้หางนมผง 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์	5
Saccharomyces cerevisiae Champagne ที่ใช้ยีสต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์	6
Saccharomyces cerevisiae Champagne ที่ใช้มอลต์สกัด 10 เปอร์เซ็นต์ + ทรีฮาโลส 0.4 เปอร์เซ็นต์เป็นสารไลโอโพรเทคแทนต์	8

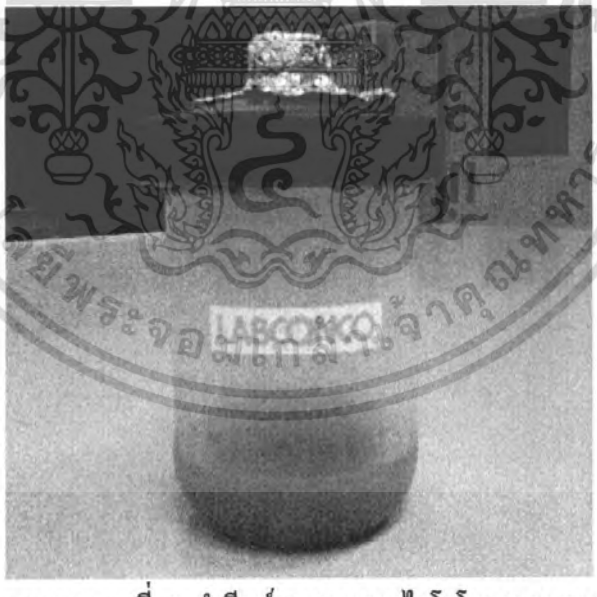
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ภาพแสดงการทำไลโอฟิไลซ์

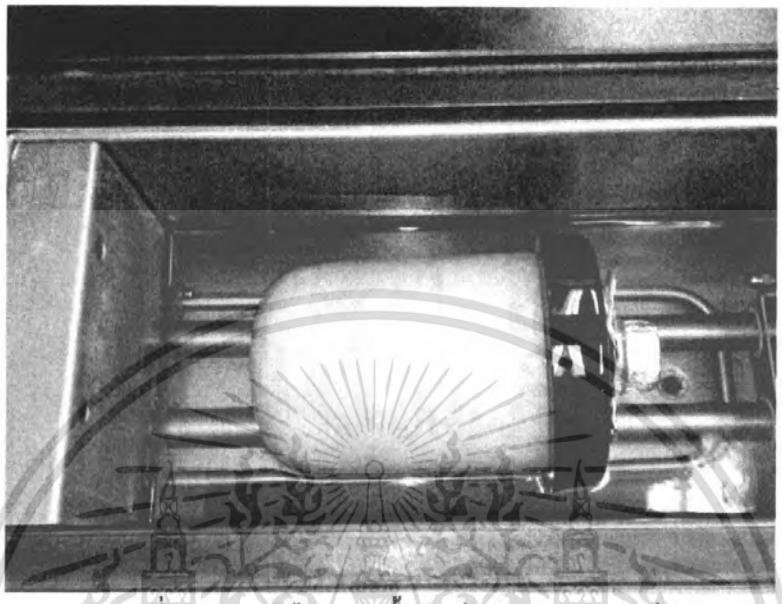
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ 1 เครื่องไลโอฟิไลซ์



ภาพผนวกที่ 2 นำยีสต์สดผสมสารไลโอโพรเทคแทนต์
แล้วใส่ในขวดไลโอฟิไลซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 3 การแช่เยือกแข็งเชื้อยีสต์ในอ่างแอลกอฮอล์

ภาพผนวกที่ 4 เสียบขวดไลโอฟิไลซ์เข้ากับเครื่องไลโอฟิไลซ์แล้วหุ้ม
ด้วยฉนวนกันความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้