การสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

THE BETA GLUCAN FROM *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

ชาคร กิตติศุภพร
พีรพัฒน์ วิทูรปกรณ์

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

THE BETA GLUCAN FROM *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

ชาคร กิตติศุภพร

พีรพัฒน์ วิทูรปกรณ์

หมายเลข 148865
เลขทะเบียน
วัน.เดือน.ปี 30 ม.ค. 2560

b.10287654 9
i.

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

THE BETA GLUCAN FROM *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

จัดทำโดย

ชาคร กิตติศุภพร รหัสนักศึกษา 55080090

พีรพัฒน์ วิทูรีปกรณ์ รหัสนักศึกษา 55080111

ได้รับความเห็นชอบจาก

..... 9 / พ.ค. / 59

(ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01
ชื่อนักศึกษา	ชาคร กิตติศุภพร รหัสนักศึกษา 55080090
	พีรพัฒน์ วิทูรปกรณ์ รหัสนักศึกษา 55080111
หลักสูตร	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น

บทคัดย่อ

บีตากลูแคนเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ของพืช เห็ด และจุลินทรีย์ ได้แก่ราและยีสต์ บีตากลูแคนมีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกาย งานวิจัยได้สกัดผนังเซลล์ยีสต์ซึ่งมีส่วนผสมของบีตากลูแคนอยู่ โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 เปรียบเทียบการสกัด 2 วิธีคือสกัดด้วยความร้อนและความดัน กับการสกัดด้วยด่างที่ 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ และทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยการสกัดเอาไขมันออกจากผนังเซลล์ยีสต์ด้วย เฮปเทน พบว่าการสกัดแบบน้ำร้อนและความดันมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการสกัดด้วย0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมากกว่าถึง 2.5 เท่า ในการศึกษาคุณสมบัติการละลาย พบว่าการสกัดด้วยน้ำร้อนและความดันนั้นสารผสมบีตากลูแคนที่สกัดได้ละลายน้ำได้ดีกว่า การสกัดด้วย0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารผสมบีตากลูแคนนั้นความสามารถในการละลายใน 0.3% กรดเกลือได้น้อย อาจสรุปได้ว่าสารผสมบีตากลูแคนจาก ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่ากรดเกลือในกระเพาะอาหาร

คำสำคัญ: เบต้ากลูแคน ยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	The extraction of beta glucan mixture from *Saccharomyces carlsbergensis* RU01
Student name	Chakorn Kittisupaporn Student ID 55080090
	Peeraphat Vitoorapakorn Student ID 55080111
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology
Year	2016
Advisor	Dr. Surachai Yaiyen

ABSTRACT

Beta-glucan as a polysaccharide in cell walls of plants, fungi and microorganisms. Beta-glucan has immune stimulating properties. In this study, beta-glucan was extracted from *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 that extraction method was compare between hot water and pressure with alkaline extraction (0.5 M sodium hydroxide). Furthermore, lipid extraction from the cell walls by heptanes. The result, the extraction by hot water and pressure has better beta glucan than alkaline extraction. The total sugar content is more than 2.5 folds. The solubility. The hot water and pressure extraction is better solubility than alkaline extraction. Moreover, The mixtures of beta-glucan is low solubilized in 0.3% hydrochloric acid in all extraction method. Conclude that, the mixture of beta glucan was solubilized in water better than hydrochloric acid in the stomach.

Keywords: Beta glucan, Yeast, *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจาก ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำการแก้ไขปัญหาต่างๆ พร้อมทั้งให้ข้อเสนอแนะเพื่อปรับปรุงแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ทางด้านวิชาการที่สามารถนำมาใช้ในการทำปัญหาพิเศษนี้ รวมถึงเจ้าหน้าที่สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิจัยและเอกสารต่างๆ และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรมทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือ รวมไปถึงกำลังใจตลอดการทำวิจัยนี้ สุดท้ายคุณพ่อ คุณแม่ น้องสาว ที่คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยมาโดยตลอด ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านมา ณ โอกาสนี้

ชาคร กิตติศุภพร

พีรพัฒน์ วิทูรปกรณ์

30 พฤษภาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
1	บทคัดย่อภาษาไทย	I
	บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
	กิตติกรรมประกาศ	III
	สารบัญ	IV
	สารบัญตาราง	V
	สารบัญภาพ	VI
	บทที่ 1 บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	6
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
	บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
	บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	11
	3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	11
	3.2 อุปกรณ์	11
	3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	12
	บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	15
	บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	21
	5.1 สรุปผล	21
	5.2 ข้อเสนอแนะ	22
	บรรณานุกรม	23
	ภาคผนวก	24
	ภาคผนวก ก	25
	ภาคผนวก ข	26
	ประวัติผู้เขียน	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	การเจริญของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* ในการเลี้ยงแบบแบทช์ที่ถังหมักขนาด 500 มิลลิลิตรด้วยกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 5% และ 10%	15
4.2	เปรียบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากตะกอนเซลล์ยีสต์ *Saccaromyces carlbergensis* จากการสกัดทั้งสองวิธี	17
4.3	การละลายน้ำของตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำร้อนและความดัน	18
4.4	การละลายน้ำของตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการสกัดด้วยด่างที่ความเข้มข้น 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์	18
4.5	การละลายของตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการสกัดใน 0.3% สารละลายกรดเกลือ	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างผนังเซลล์ยีสต์ และบีต้ากลูแคนในยีสต์ขนมปัง	3
2	ชนิดของบีต้ากลูแคนจากแหล่งต่างๆ	5
4.1	การเจริญของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* ในการเลี้ยงแบบแบทช์ที่ถังหมักขนาด500 มิลลิลิตร ที่กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ต่อปริมาตร	16
4.2	เปรียบเทียบการละลายน้ำของตะกอนเซลล์ที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 แบบ	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กมาก มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (eukaryotic micro-organisms) จัดอยู่ในกลุ่มจำพวกเห็ด รา (Fungi) มีทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษต่ออาหารพบทั่วไปในธรรมชาติในดิน ในน้ำ ในส่วนต่างๆ ของพืช มีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์นานมาแล้วเช่น ในอาหาร คือ *Saccharomyces cerevisae* โดยยีสต์ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลมาก เช่น ผลไม้ ที่มีรสหวาน น้ำผึ้ง สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทิลแอลกอฮอล์ในกระบวนการหมัก ยีสต์เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ยีสต์ที่เจริญได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจนเรียกว่า ออกซิเดทีฟยีสต์ (oxidative yeast) โดยเกิดเป็นฟิมส์ที่ผิวหน้าของอาหารเหลว ส่วนยีสต์ที่เจริญได้ทั้งภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเจริญได้ทุกส่วนของอาหารจัดเป็นพวก ยีสต์เฟอร์เมนเตทีฟ (fermentative yeast)

องค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ ได้แก่ แคปซูล (capsule) ยีสต์บางชนิดมีสารเมือก เหนียว ที่ขับออกสู่ภายนอกเซลล์ที่เรียกว่าแคปซูล แคปซูลส่วนใหญ่ประกอบด้วยโพลีแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีทั้งเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ แมนโนส (mannose) และสารที่คล้ายแป้ง

ผนังเซลล์ (cell wall) ผนังเซลล์ของยีสต์จะบางในเชื้อที่มีอายุน้อยและจะหนาขึ้นตามอายุ องค์ประกอบส่วนใหญ่ประกอบด้วย สารโพลีแซคคาไรด์ ไคติน และโปรตีน โดยโพลีแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด คือ กลูแคนประมาณ 30-34 % และแมนแนน ประมาณ 30 % ผนังเซลล์ของยีสต์มีโปรตีนประกอบอยู่ด้วย โปรตีนบางชนิดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ไขมันมีอยู่ 8.5 – 13.5 % ปริมาณไคติน (chitin) เปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของยีสต์

เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เยื่อหุ้มเซลล์มีความหนาประมาณ 8 ไมโครเมตร ประกอบด้วยชั้น 2 ชั้น คือ ชั้นนอกและชั้นในสุด เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยไขมัน และฟอสโฟลิพิด โปรตีน และ โพลีแซ็กคาไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

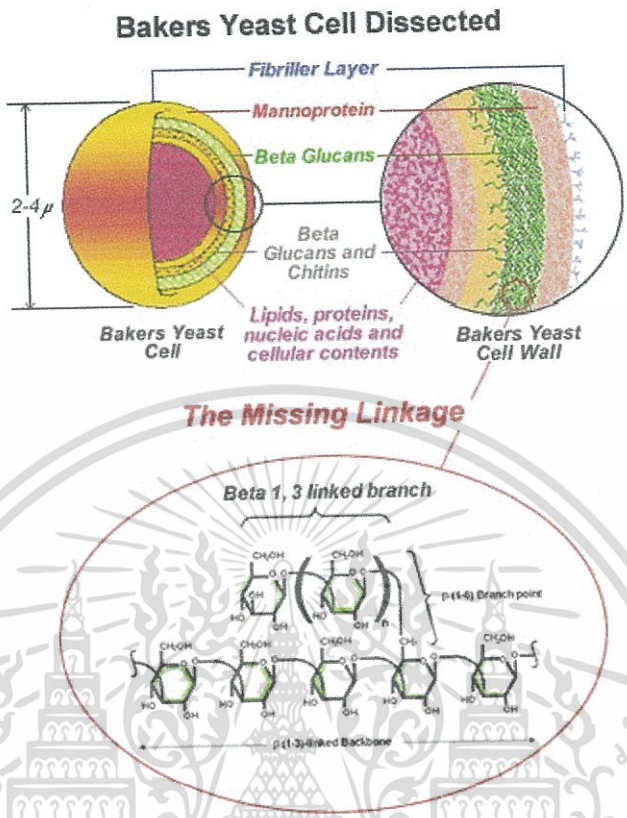
องค์ประกอบในโพรโทพลาซึม (protoplasm) เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยไซโทพลาซึม ซึ่งเป็นสารกึ่งเหลวภายในมีไรโบโซมที่มี RNA มาก และออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม ได้แก่ เอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม ซึ่งเชื่อมตอดต่อกับเยื่อหุ้มนิวเคลียสชั้นนอก และอาจติดต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ด้วย ในไซโทพลาซึมมีเอนไซม์หลายชนิด

นิวเคลียส (nucleus) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบ เยื่อหุ้มนิวเคลียสมีสมบัติยอมให้สารบางอย่างผ่านได้เท่านั้น (semipermeable membrane) นิวเคลียสมีหน้าที่เกี่ยวกับเมแทบอลิซึม และการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายพับกันอยู่ ไมโทคอนเดรียมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3-1 โครเมตร และความยาวถึง 3 ไมโครเมตร มีเยื่อหุ้มสองชั้น ชั้นในจะพับเว้าเข้าข้างในเป็นคริสตี (cristae) ไมโทคอนเดรียประกอบด้วยลิโพโปนตีนจำนวนมาก และมี RNA และ DNA เล็กน้อย DNA นี้ต่างจาก DNA ของนิวเคลียส เนื่องจากไมโทคอนเดรียมีเอ็นไซม์เกี่ยวกับการหายใจ จึงเรียกว่าเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์

แวคิวโอล (vacuole) ภายในเซลล์ยีสต์จะมีแวคิวโอลอยู่หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งแวคิวโอล ซึ่งมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเมื่อย้อมสี ในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตภายในแวคิวโอลจะไม่มีโครงสร้างที่เป็นชิ้นส่วน แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ “stationary phase” แวคิวโอลจะมีสารแกรนูลเพิ่มขึ้น อาจเป็นเมตาฟอสเฟต (metaphosphate) พอลิฟอสเฟต (polyphosphate) หรือลิพิด สารที่อยู่ในแวคิวโอลที่เคยแยกได้ ได้แก่ เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการไฮโดรไลซ์ปฏิกิริยาต่างๆ เช่น โปรตีนเอส (protease) ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) และเอสเทอเรส (esterase) จากการที่พบเอ็นไซม์ไฮโดรเลสในแวคิวโอล จึงคิดว่าแวคิโอลเปรียบเหมือนไลโซโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างผนังเซลล์ยีสต์ และบีต้ากลูแคนในยีสต์ขนมปัง

ที่มา: https://beta1-3dglucan.com/

บีตากลูแคน (Beta glucan)

บีตากลูแคน คือ สารประกอบของน้ำตาลกลูโคส ที่พบในยีสต์ สาหร่าย เห็ดและพืชบางชนิด แต่ไม่พบในสัตว์และมนุษย์ โครงสร้างของเบต้ากลูแคน ที่ได้มาจากแหล่งที่ต่างกันจะไม่เหมือนกัน และความแตกต่างของโครงสร้างนี้จะส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพของบีต้ากลูแคน เนื่องจากบีต้ากลูแคนที่ได้ในแต่ละแหล่งหรือแม้กระทั่งแหล่งเดียวกันก็ตาม แต่มีการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ต่างกัน มีปัจจัยในการเลี้ยงที่ต่างกัน มีช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวที่ต่างกัน หรือมีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ที่ต่างกัน จะทำให้ได้เบต้ากลูแคนที่มีโครงสร้างต่างกัน ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพและความปลอดภัยของบีตากลูแคน

บีตากลูแคนพบว่าใช้เป็นตัวควบคุมชนิดหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งมีประสิทธิภาพที่ดีในการรักษามะเร็ง จึงมีการนำเอามาใช้ในการรักษามะเร็งหลายชนิด และเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันต่อต้านเนื่อเยื่อเช่นรูมาตอยด์ นอกจากนี้ยังมาใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อเพิ่มฮอร์โมนโดปามีน หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซโรนิน ซึ่งเป็นสารเพิ่มความสดชื่น กระปรี้กระเปร่า บีตากลูแคนจากยีสต์เป็นแหล่งหนึ่งที่มีการผลิตที่มากในอุตสาหกรรม

บีตากลูแคนจะมีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิด ส่วนใหญ่จะมาจากแหล่างที่เป็นอาหารได้ บีตากลูแคนจากยีสต์ขนมปัง บีตากลูแคนจากยีสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์) บีตากลูแคนจากเห็ดที่รับประทานได้ และบีตากลูแคนจากธัญพืช

บีตากลูแคนจากยีสต์ขนมปัง

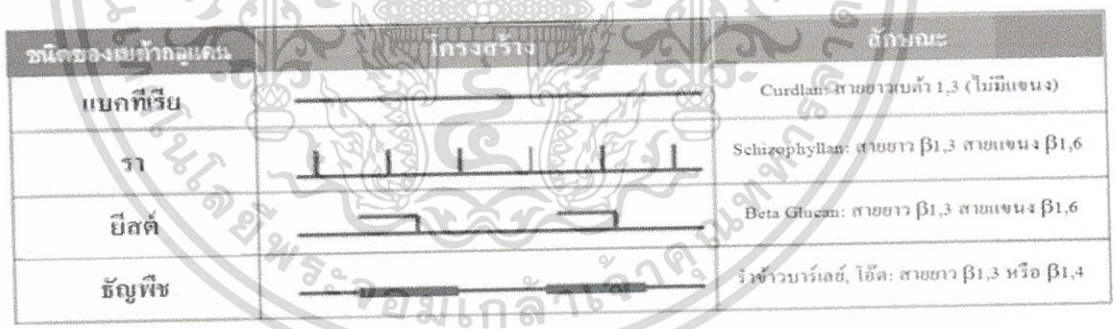
ยีสต์ขนมปังที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสิ่งมีชีวิตได้รับการศึกษามากที่สุดชนิดหนึ่งในโลก อาจจะเพราะความคุ้นเคยและความปลอดภัย เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้เป็นส่วนสำคัญของอาหารมนุษย์มานานกว่า 6 พันปีแล้ว ได้ให้ผลิตภัณฑ์ที่จำเป็นต่อมวลมนุษย์ชาติ เช่น เหล้าเบียร์ ไวน์ และขนมอบ เป็นต้น ต่อมามีความต้องการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธ์ยีสต์ชนิดนี้ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น และมีความเฉพาะตามความต้องการของการใช้งานเช่น ความสามารถในการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูงขึ้น หรือความสามารถในการทนต่อแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงขึ้น เป็นต้น ในที่สุดเราก็ได้สายพันธ์ยีสต์ขนมปังและยีสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์) ที่มีความแตกต่างกันออกไป ความแตกต่างระหว่างยีสต์ขนมปังและยีสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์) บีตากลูแคนเป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลล์ของยีสต์ขนมปัง ส่วนที่เรียกว่า บีตากลูแคน จะประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ลักษณะคือที่เป็นบีตา 1,3 กลูแคน และบีตา 1,6 กลูแคน โดยบีตา1,3 กลูแคน มีปริมาณ 85% ของปริมาณบีตากลูแคนทั้งหมด โมเลกุลมีโครงสร้างเป็นบันไดเวียนชนิด 3 เกลียว และมีขนาดโมเลกุลเฉลี่ย 250,000ดาลตัน การศึกษาบีตากลูแคนของยีสต์ขนมปังมีมานานมาก มีคุณสมบัติที่เด่นชัดคือการเสริมภูมิคุ้มกันของร่างกาย งานวิจัยแรกที่ใช้บีตากลูแคนในการรักษามะเร็งพิมพ์ในวารสารของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ.1975 โดยนายแพทย์ปีเตอร์ แมนเซล และคณะที่ศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งผิวหนัง และต่อมาในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งเต้านม ซึ่งประสบความสำเร็จมากทำให้การศึกษาเกี่ยวกับบีตากลูแคนจากยีสต์ขนมปังแพร่หลายจนถึงปัจจุบันนี้

บีตากลูแคนจากยีสต์สุรา

การที่พบว่าบีตากลูแคนจากยีสต์ขนมปังมีคุณภาพสูงมาก ในการเสริมภูมิคุ้มกัน จึงมีความพยายามที่จะนำบีตากลูแคนจากยิสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์ Brewer's Yeast) ซึ่งมีราคาถูกมาก เนื่องจากเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบจากของเสียจากอุตสาหกรรมสุรา ที่มีจำนวนมากในแต่ละปี การสำรวจในปี 2544 แค่ในประเทศไทยของเรา ยีสต์ที่เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมสุรา มีจำนวนถึง 3,000 ตัน (น้ำหนักแห้ง) และผู้สำรวจยังประเมินว่าจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อีกปีละ 10% การที่มีราคาถูกเนื่องจากเป็นของเสียจากอุตสาหกรรม จึงได้ถูกนำไปใช้ผสมเป็นอาหารสัตว์ และใช้ในโรงงานบำบัดน้ำเสียในการผลิตก๊าซชีวภาพ และบางส่วนก็ถูกนำไปสกัดเอาส่วนของผนังเซลล์ ที่มีบีตากลูแคนเป็นส่วนประกอบอยู่ประมาณ 50% ซึ่งจะถูกนำไปขายเป็นอาหารสัตว์เกรดที่สูงขึ้น (แต่ก็ยังมีราคาถูก) ต่อมามีการสกัดบีตากลูแคนบริสุทธิ์ออกมา เนื่องจากบีตากลูแคนจากยีสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ จึงถูกนำไปใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหาร เช่น ใช้ใส่ในมายองเนสหรือโยเกิร์ต ใช้แทนไขมันเพื่อเพิ่มความหนืดและความน่ารับประทาน นอกจากนี้ยังสามารถใช้เพิ่มคุณค่าอาหารในเชิงเส้นใยและยังใช้ผสมกับแป้งชนิดต่างๆ เพื่อให้ความเหนียวนุ่มน่ารับประทาน และช่วยเสริมความคงตัวของแป้งในอาหารสำเร็จรูปแบบแช่แข็ง แม้ว่ายีสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์) จะเป็นยีสต์ชนิดเดียวกันกับยีสต์ขนมปัง แต่ปริมาณบีตากลูแคนที่พบในผนังเซลล์ก็ต่างกัน คุณสมบัติทางกายภาพของบีตากลูแคนที่สกัดได้ก็ต่างกัน โดยยีสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์) มีอัตราส่วนประกอบ 1,3 และสายแขนง 1,6 น้อยกว่ายีสต์ขนมปังมาก โมเลกุลของบีตากลูแคนมีขนาดเล็ก และสภาพเป็นเจลละลายน้ำได้ง่าย ไม่เหมือนกับยีสต์ขนมปังที่อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ



ภาพที่ 2 แสดงชนิดของบีต้ากลูแคนจากแหล่งต่างๆ

ที่มา: http://www.vitaminpros.com/beta-1-3-glucan.htm

การสกัดสารบีตากลูแคนขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดและปริมาณตัวทำละลาย ระยะเวลา พีเอช และอุณหภูมิเป็นต้น ปริมาณบีตากลูแคนที่สกัดได้ขึ้นกับปัจจัยต่างๆดังกล่าว รวมทั้งแหล่งที่มาของบีตากลูแคนด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.1 การผลิตบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 ระดับ 50 ลิตร

1.2 เปรียบเทียบการสกัดสารบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 ด้วยการสกัดด้วยความร้อนและความดัน กับการสกัดด้วยด่าง

1.3 ศึกษาสมบัติการละลายของสารบีตากลูแคนที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 และเพิ่มขนาดของการเลี้ยง และเปรียบเทียบการสกัดสารบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01 ด้วยการสกัดด้วยความร้อนและการสกัดด้วยด่าง วิเคราะห์ความสามารถในการละลายของบีต้ากลูแคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บีตากลูแคน คือสารประกอบของน้ำตาลกลูโคส ที่พบในยีสต์ สาหร่าย เห็ดและพืชบางชนิด แต่ไม่พบในสัตว์และมนุษย์ โครงสร้างของบีตากลูแคน ที่ได้มาจากแหล่งที่ต่างกันจะไม่เหมือนกัน และความแตกต่างของโครงสร้างนี้จะส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพของบีตากลูแคน

เนื่องจากบีตากลูแคนที่ได้ในแต่ละแหล่งหรือแม้กระทั่งแหล่งเดียวกันก็ตาม แต่มีการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ต่างกัน มีปัจจัยในการเลี้ยงที่ต่างกัน มีช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวที่ต่างกัน หรือมีขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ที่ต่างกัน จะทำให้ได้บีตากลูแคนที่มีโครงสร้างต่างกันทั้งในระดับ 2 มิติและ 3 มิติได้ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพและความปลอดภัยของบีตากลูแคน ดังนั้นการเลือกใช้บีตากลูแคนจึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก ต้องเลือกบีตากลูแคนที่ถูกชนิดและสกัดจนบริสุทธิ์ที่สุดเท่านั้น เพราะการเลือกผิดชนิดผิดยี่ห้อ นอกจากจะไม่ได้ให้ประโยชน์ต่อร่างกายอย่างแท้จริงแล้ว ยังอาจจะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ เช่น อาการแพ้ จนถึงโรคภูมิต่อต้านตัวเองหรือแม้กระทั่งโรคมะเร็ง

เป็นเวลากว่า 50 ปีมาแล้วที่นักวิทยาศาสตร์สามารถสกัดบีตากลูแคนที่บริสุทธิ์จากยีสต์ขนมปัง และพบว่าสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย และหลังจากนั้นได้มีการศึกษาและตีพิมพ์ผลการศึกษาเกี่ยวกับบีตากลูแคนจนถึงปัจจุบัน ไม่ต่ำกว่า 5,000 ฉบับ

betaglucan บีตากลูแคน คือสารประเภทคาร์โบไฮเดรต ที่สกัดได้จากสารตั้งต้น เช่น จากยีสต์ขนมปัง จากบริวเวอร์ยีสต์ จากเห็ดชิตาเกะ จากเห็ดหลินจือ จากเห็ดไมตาเกะ จากแบคทีเรีย จากสาหร่าย จากรำข้าว สาลี หรือจากรำข้าวโอ๊ต เป็นต้น (แต่ไม่พบในสัตว์)

บีตากลูแคน ประกอบ ด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมาเรียงต่อกันในลักษณะต่างๆกันตามแต่ชนิดของสารตั้งต้น ดังนั้นคำว่า บีตากลูแคน Beta Glucan จึงเป็นคำเรียกรวมของสารประเภทนี้ เนื่องจากโครงสร้างที่ต่างกันจึงทำให้มีคุณสมบัติที่ต่างไปกันด้วย ในการนำไปใช้เราจึงต้องทราบว่า บีตากลูแคน betaglucan นั้นมาจากสารตั้งต้นชนิดใด

Arturas Javmaen et al.(2012) ได้ทำการทดลองโดยการนำยีสต์*Saccharomyces cerevisiae* มาแยกระหว่างตัวเซลล์และผนังเซลล์ออกจากกันโดยใช้เอนไซม์ *Actinomyces rutgersensis* 88 ที่อุณหภูมิ50 องศาเซลเซียสและค่ากรด-ด่าง pH10 เป็นเวลา6ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัดบีตากลูแคนโดยการใช้ด่างNaOH ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำละลายโดยการทดลองจะใช้ความเข้มข้น0.5,1,2,3,4,5 โมลาร์ และใช้เวลาสกัด 1,2,3,4,5ชั่วโมง ซึ่งพบว่าการใช้NaOH 0.5โมลาร์โดยใช้เวลา4ชั่วโมงมีประสิทธิภาพมากที่สุดในเชิงปริมาตรที่มีความเข้มข้นของกลูโคสในบีตากลูแคน 98เปอร์เซนต์

Arun K. Bahl et al. (2009) ได้ทำการทดลองทำบริสุทธิ์โดยเริ่มจากการนำยีต์ *saccharomyces cerevisiae* มาสกัดโดยใช้แอลคาไลน์ในการสกัดบีตากลูแคนออกมาที่อุณหภูมิ80องศา48ชั่วโมงหลังจากนั้นทำการปรับค่ากรด-ด่างให้เป็นกลางเพื่อไม่ให้ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆโดยหลังจากนั้นทำการล้างด้วยน้ำเพื่อแยกสารตกค้างออกแล้วจึงนำไปทำการกรองด้วยเนื้อเยื่อพิเศษที่มีน้ำหนัก1000กิโลดาลตัน เมื่อกรองเสร็จจึงทำการล้างด้วยเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ โดยถ้าต้องการความบริสุทธิ์มากขึ้นจะต้องกรองด้วยเนื้อเยื่อหลายๆชั้น

Stefan Freimund et al. (2003) ได้ทำการทดลองการเปรียบเทียบความบริสุธิ์ของ1,3-b-D-glucan จากยีสต์ saccharomyces cerevisiae ระหว่างการสกัดแบบการใช้ด่างแอลคาไลน์และการสกัดแบบใช้น้ำร้อน ซึ่งจากการทดลองพบว่าการใช้ด่างที่มีความเข้มข้นที่มีความเข้มข้น0.75-1.0โมลาร์ที่อุณหภูมิ60-100องศาเซลเซียสจะส่งผลให้โครงสร้างสายโพลิเมอร์นั้นมีประสิทธิภาพลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับผนังเซลล์ตั้งแต่แรก โดยต่างจากการใช้hot water treatmentซึ่งจะทำโดยการใช้ auto claveที่อุณหภูมิ121องศาเซลเซียสโดยใช้เวลา5ชั่วโมงเพื่อที่จะแยกโมโนโปรตีนออกโดยหลังจากนั้น ทำการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เพื่อแยกระหว่างส่วนใสและตะกอนออก. ตะกอนจะใช้เอนไซม์ Savinase ในการแยกโปรตีนออกมา และหลังจากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงอีกรอบและทำการแยกไขมันโดยการใช้ acetone และทำการสเปรไดร์หรือจะใช้แอลกอฮอลล์ก็ได้ซึ่งพบว่าความบริสุธิ์ของการสกัดโดยใช้น้ำร้อนพบว่ามีความบริสุทธิ์ถึง87เปอร์เซนต์เมื่อเทียบอัตราส่วนของตอนแรกก่อนจะทำprocessคือ92เปอร์เซนต์

David R. Cameron et al. (1988) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการสกัดของเชื้อ *saccharomyces cerevisiae* ระหว่างการสกัดแบบใช้เอนไซม์กับการใช้น้ำร้อนโดยวิธีการสกัดของการใช้น้ำร้อนคือการนำไป autoclave ที่121องศาเซลลเสียสเป็นเวลา3ชั่วโมงหลังจากนั้นทำการcentrifugeที่5000รอบต่อนาทีเป็นเวลา10นาทีโดยหลังจากนั้นทำการใส่เอทานอล 95เปอร์เซนต์แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ4องศาเซลเศียสเป็นเวลา16ชั่วโมงหลังจากนั้นนำมาcentrifugeที่10000รอบต่อนาทีเพื่อแยกส่วนใสกับตะกอนออกมาซึ่งจะนำตะกอนนั้นไปกรองกับผ้าใยที่มีน้ำหนัก10000ดาลตัน แล้วจึงนำตะกอนที่ได้จากการกรองไปอบแห้งส่วนของตะกอนนั้นพอหลังจากการcentrifugeก็นำไปอบแห้งได้เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการใช้เอนไซม์จะใช้เอนไซม์zymolaseโดยการนำไปผสมกับยีสต์ที่อัตราส่วน1ต่อ2แล้วเอาไปเข้าเครื่องเขย่า3ชั่วโมงที่25องศาเซลเซียสแล้วจึงนำไปcentrifugeที่5000รอบต่อนาทีหลังจากนั้นทำการล้างด้วยเอทานอลแล้วนำไปอบแห้ง

ซึ่งเมื่อเทียบความบริสุทธิ์กันจากการตรวจสอบปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตพบว่าการสกัดแบบใช้น้ำร้อนมีความบริสุทธิ์มากกว่าการใช้เอนไซม์ แต่ในเชิงปริมาณพบว่าการสกัดโดยใช้น้ำร้อนมีเพียง8เปอร์เซนต์ โดยที่การสกัดโดยวิธีเอนไซม์มีถึง16.7เปอร์เซนต์

Xiao-Yong Liu et al (2008)ได้ทำการทดลองการสกัดบีตากลูแคนโดยเริ่มจากการนำยีสต์ *saccharomyces cerevisiae* มาทำการcentrifuge4500รอบต่อนาทีเป็นเวลา10นาทีหลังจากแยกตะกอนกับส่วนใสได้ให้นำส่วนใสทิ้งไปส่วนตะกอนก็นำมาทำการล้างประมาณ5-6รอบเพื่อความบริสุทธิ์พอหลังจากนั้นเติม sodium chloride 3 เปอร์เซ็นต์แล้วนำไปเขย่าในเครื่องg-เขย่าที่120รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 55องศาเซลเซียสเป็นเวลา24ชั่วโมงเพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาautolysis หลังจากนั้นนำไปอบที่80องศาเซลเซียสเป็นเวลา15นาทีและรอจนกว่ามันจะเย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงทำการcentrifugeที่4500รอบต่อนาทีเป็นเวลา10นาทีเพื่อแยกตะกอนและส่วนใส หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้มา 250 มิลลิลิตรแล้วใส่0.02M sodium phosphate buffer 10เปอร์เซนต์ w/wในflask500มิลลิลิตรแล้วนำไปautoclaveที่121องศาเซลเซียสเป็นเวลา4ชั่วโมงแล้วค่อยทำให้เย็นลงจนเหลือ45องศาเซลเซียสหลังจากนั้นทำการ homogenize ด้วยเครื่อง homogenizer จนกว่าตะกอนจะใส

ตะกอนที่ผ่านการดึงไขมันออกไปจะถูก เจือจางกับน้ำกลั่น yieldที่ได้จะมีส่วนที่เป็นของแข็งประมาน 15%(w/w) Protease บางชนิดจะถูกทำมาใช้ตามสภาวะที่เหมาะสม หลังจากการย่อยของเอนไซม์จะทำการให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ80องศาเซลเซียส เป็นเวลา15นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ แล้วปล่อยให้อุณหภูมิเย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง

โดยสารตกค้างที่ไม่ละลายน้ำจะถูกแยกออกโดยการ centrifuged ที่5000gเป็นเวลา 10นาที ที่อุณหภูมิห้อง และทำการล้างด้วยน้ำกลั่นเย็นหลายๆครั้ง จนกระทั่งส่วนใสที่ได้ไม่มีส่วนประกอบของโปรตีนที่ละลายน้ำเหลืออยู่เลย(ตรวจสอบโดย Lowry method) สุดท้ายแล้วส่วนใสจะถูกทิ้งไป และจะทำการเก็บ wet B-glucan ของyeast ไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่องspraydry ที่มี inlet air180 องศาเซลเซียสและoutlet air 85องศาเซลเซียส ซึ่งหลังจากผ่านกระบวนการทั้งหมดแล้วพบว่ามีปริมาณ b-D-glucansถึง91เปอร์เซนต์w/w ซึ่งมีความบริสุทธิ์ถึง93% (w/w).ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ล้วนไม่ผ่านกระบวนการทางเคมีเลยจึงมีความบริสุทธิ์มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

กากน้ำตาล

Saccharomyces carlbergensis RU01

น้ำจามจุรี

3.1.2 สารเคมี

Yeast extract	(Scharlua, Spain)
Malt extract	(Himedia, India)
Peptone	(Himedia, India)
Dextrose	(Pure Chem, Taiwan)
Agar	(Himedia, India)
Ammoniumsulfate	(RIEDEL-DE-HAEN AG SEELZE-HANNOVER, Germany)
Sodium Hydroxide	(Malinckrodt, Sweden)
3,5 Dinitrosalisylic acid	(Acros, USA)
Potassium Sodiumtatate	(CARLO ERBA REAGENTS, Italy)
Hydrochloric acid	(J.TBaker, USA)
Phenol	(CARLO ERBA REAGENTS, Italy)
Sulfuric acid	(CARLO ERBA REAGENTS, Italy)
Heptane	(Merck, Germany)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ปั๊มให้อากาศ	(Sonic Aqurium Air Pump Double type8000)
3.2.2 Magnetic stirrer	(Combination)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 เครื่องเขย่า (New Brunswick scientific, innova2150, USA)

3.2.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick scientific, innova42, USA)

3.2.5 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Boeco, Germany)

3.2.6 Centrifuge (Hettich zentrifugen, Rotofix32A, Germany)

3.2.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermo scientific, Genesys20, USA)

3.2.8 กล้องจุลทรรศน์ (Nikon, ECLIPSE E200, Japan)

3.2.9 ตู้อบลมร้อน (Thermo scientific, Hereaus, Germany)

3.2.10 อุปกรณ์เครื่องแก้ว

3.2.11 ถังหมักขนาด 80ลิตร

3.2.12 เครื่องชั่งละเอียด (Sartorius, Germany)

3.2.13 เครื่องปั่นละเอียด (Sharp, EM-44A, Japan)

3.2.14 Autoclave (Tomy, ES-315, Japan)

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces calbergensis* RU01

3.3.1.1 ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาล 5% และ 10% เปรียบเทียบเพื่อดูความแตกต่างของการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการใช้ ฮีมาไซโตมิเตอร์ และความแตกต่างของค่าน้ำตาลรีดิวส์โดยการทำ DNS และใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.3.1.2 ทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 อีกครั้ง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนไปคือ กากน้ำตาล 5% และ 10% ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% และกากน้ำตาล 10% เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี แหล่งไนโตรเจนและไม่มีแหล่งไนโตรเจน นำอาหารที่ทำให้ เชื้อยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 เจริญดีที่สุด มาขยายขนาดของถังหมักเริ่มจาก 500 มิลลิลิตร 1 ลิตร 5ลิตร และ50 ลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 การสกัดสารบีตากลูแคน

3.3.2.1 การสกัดสารบีตากลูแคนด้วยน้ำร้อน

นำน้ำหมักที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วมาหมุนเหวี่ยงโดยใช้เครื่อง centrifuge เพื่อแยกส่วนของตะกอนและส่วนใสออกจากกันทำการล้างตะกอนเซลล์ที่ได้โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 50 กรัม ทำการคำนวณหาน้ำหนักของตะกอนเซลล์ นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาให้มาสกัดด้วยความร้อน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้อุณหภูมิเย็นลงจนกระทั่งถึงอุณหภูมิห้อง แล้วทำการหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลวออก จึงเติมสารละลาย heptane ในอัตราส่วน 1:1 ของน้ำหนักเซลล์ จากนั้นนำไปเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อแยกส่วนที่เป็นไขมันในเซลล์ออก จากนั้น นำสารผสมที่ได้มาแยกอีกครั้ง นำส่วนตะกอนที่ได้นำไปอบให้แห้งโดยใช้เครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 8-12 ชั่วโมง นำตะกอนเซลล์ที่แห้งแล้วมาบดให้เป็นผงเพื่อรอทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.2.2 การสกัดสารบีตากลูแคนด้วยด่าง

นำตะกอนที่ได้มาใส่ขวดflaskและเติมด้วย 0.5 M โซเดียมไฮดรอกซ์ ในอัตรา 1:1 ของปริมาณเซลล์ แล้วนำไปเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ด่างจะละลายผนังเซลล์และโพลิเมอร์อื่นๆที่ไม่ใช่บีตากลูแคนออก หลังจากนั้นนำส่วนผสมมาปรับพีเอชให้ได้ 7.0-7.3 แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อให้สารผสมนั้นมีค่าเป็นกลางเพื่อให้ไม่เกิดการทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ หลังจากนั้นนำสารผสมนั้นมาทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลวออก จึงเติมสารละลาย heptane ในอัตราส่วน 1:1 ของน้ำหนักเซลล์ จากนั้นนำไปเขย่า ที่ความเร็วรอบ 150rpm เป็นเวลา4ชั่วโมง เพื่อแยกส่วนที่เป็นไขมันในเซลล์ออก จากนั้น นำสารผสมที่ได้มาทำการหมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลวออก ส่วนตะกอนที่ได้นำไปอบให้แห้งโดยใช้เครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 8-12 ชั่วโมง นำตะกอนเซลล์ที่แห้งแล้วมาบดให้เป็นผง

3.3.3 การวิเคราะห์บีตากลูแคน

3.3.3.1 ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งได้แก่ โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ โอลิโกแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ โดยเติมตัวอย่างปริมาณ 0.5 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเขย่า ให้เข้ากัน และดึงตัวอย่างมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเติมสารละลาย 5% ฟีนอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้สารผสมกัน เติม กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าเบาๆ เพื่อให้สารผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นและนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานและคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง

3.3.4 ทำการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งได้แก่น้ำตาลในกลุ่มโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ โดยเติมตัวอย่างปริมาณ 0.5 กรัม ต่อน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเขย่าให้เข้ากันและปิเปตสารตัวอย่างมาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่า เพื่อให้สารผสมกัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรจากนั้นทำให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องและนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาว 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานและคำนวณหาปริมาตรน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

3.3.5 วิเคราะห์สมบัติในการละลายของบีต้ากลูแคนที่สกัดได้

3.3.5.1 วิเคราะห์ความสามารถในการละลายน้ำ

วิเคราะห์ความสามารถในการละลายโดยการใส่ตัวอย่างที่เป็นผงแล้วในหลอดทดลอง ในอัตราส่วนดังนี้ 0.1 0.5 1 2 และ 5% เติมน้ำ 10 มิลลิลิตร นำไปแช่ในอ่าง water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกของเหลวและตะกอนออกมาจากนั้นนำของเหลวไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วนตะกอนจะนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมงจึงนำมาชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

3.3.5.2 วิเคราะห์ความสามารถในการละลายกรด

วิเคราะห์ความสามารถในการละลายโดยการใส่ตัวอย่างที่เป็นผงแล้วในหลอดทดลอง ในอัตราส่วนดังนี้ 0.1 0.5 1 2 และ 5% แล้วเติม 0.3% กรดเกลือ 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปแช่ในอ่าง water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกของเหลวและตะกอนออกมาจากนั้นนำทั้งส่วนของเหลวและตะกอนไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.0-7.3 จากนั้นนำของเหลวไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วนตะกอนจะนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมงจึงนำมาชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ *Saccaromyces carlbergensis*

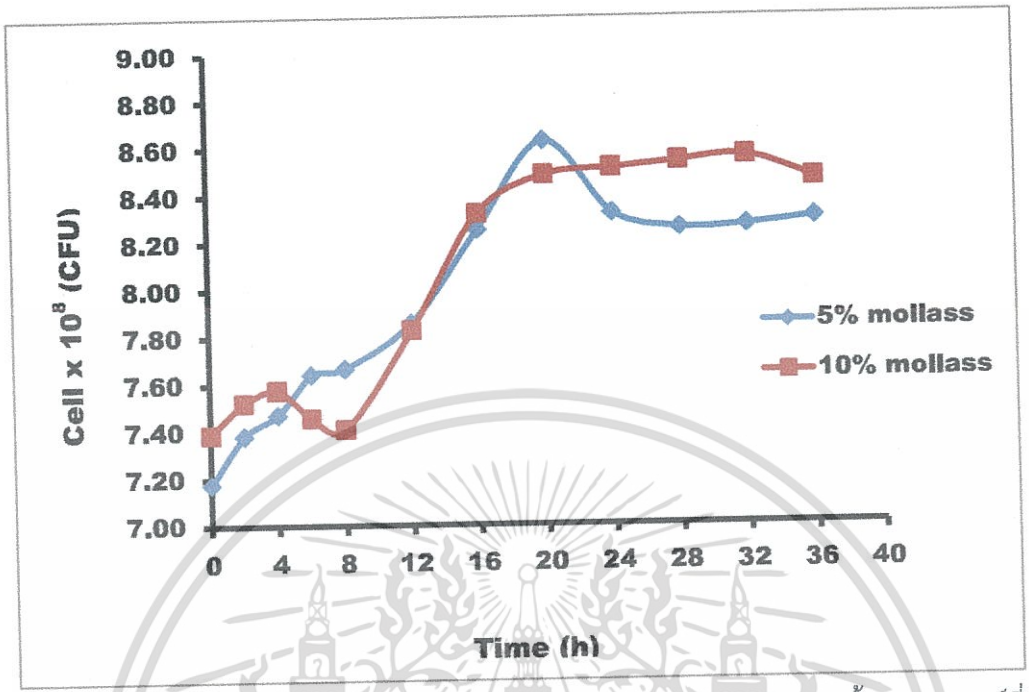
4.1.1 การเจริญเติบโตของเซลล์ในถังหมักขนาด 500 มิลลิลิตร

ในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* ในการเลี้ยงแบบแบทช์ที่ถังหมัก ขนาด 500 มิลลิลิตรด้วยกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 5% และ 10% โดยปริมาตรพบว่ายีสต์มีการเจริญเติบโตได้ในดีในชั่วโมงที่ 16 ทั้งในกากน้ำตาลที่เข้มข้นทั้ง 2 ความเข้มข้น ดังตารางที่ 4.1 พบว่าที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 10% มีการเจริญของเซลล์ได้ดีกว่าเล็กน้อย แต่ยีสต์ถูกปรับสภาพให้มีทนต่อการกดดันของแทนนินในกากน้ำตาลที่ปริมาณสูงเพื่อจะผลิตบีต้ากลูแคนให้ได้ปริมาณมากจึงมีการเลือกใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 10%

ตารางที่ 4.1 การเจริญของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* ในการเลี้ยงแบบแบทช์ที่ถังหมัก ขนาด 500 มิลลิลิตรด้วยกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 5% และ 10%

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis*	
	ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 5%	ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 10%
0	7.18×10^8	7.44×10^8
2	7.388×10^8	7.61×10^8
4	7.478×10^8	7.52×10^8
6	7.64×10^8	7.47×10^8
8	7.67×10^8	7.48×10^8
12	7.86×10^8	7.80×10^8
16	8.25×10^8	8.44×10^8
20	8.63×10^8	8.53×10^8
24	8.32×10^8	8.61×10^8
28	8.26×10^8	8.51×10^8
32	8.27×10^8	8.56×10^8
36	8.30×10^8	8.47×10^8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 แสดงการเจริญของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* ในการเลี้ยงแบบแบทช์ที่ถังหมักขนาด500 มิลลิลิตร ที่กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ต่อปริมาตร

4.1.2 การเจริญเติบโตของเซลล์ในถังหมักขนาด 1 และ 5 ลิตร

เมื่อมีการขยายขนาดถังหมักโดยให้มีการเลี้ยงเซลล์ยีสต์แบบแบทช์ที่ขนาด 1 ลิตร และ 5 ลิตร ตามลำดับ พบว่าเซลล์มีอัตราการเจริญที่มีไม่เปลี่ยนแปลงคือที่ 16 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าจะมีการเปลี่ยนขนาดปริมาตรในการเลี้ยงเซลล์นั้นไม่มีผลในการอัตราในการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งในการเพิ่มขนาดนั้นจะทำให้ปริมาณของเซลล์ยีต์มีขนาดเพิ่มมากขึ้นตามขนาดของถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4.2 การสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccaromyces carlbergensis*

การเลี้ยงเซลล์ที่ถังหมัก 50 ลิตร ด้วยความเข้มข้นของกากน้ำตาล 10% เป็นการเพิ่มปริมาณของเซลล์ในการสกัดบีตากลูแคน ในการสกัดบีตากลูแคน แบ่งได้ 2 แบบ คือการสกัดด้วยน้ำร้อนและความดัน (Hot water and high pressure extract) กับการสกัดด้วยด่าง (Alkaline extraction) ซึ่งผลปรากฏว่าการใช้น้ำร้อนสกัดนั้นได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตะกอนเซลล์และทำการแยกตะกอนเซลล์แล้วสกัดไขมันด้วยตัวทำละลายคือ heptane ผลปรากฏว่าได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 746.80 มิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าวิธีการสกัดด้วยด่างประมาณ 2.5 เท่า เพราะในการสกัดด้วยน้ำร้อนและความดันเป็นการทำลายผนังเซลล์ได้ดีกว่าการสกัดด้วยด่างที่ทำให้ผนังเซลล์มีลักษณะเป็นรูเท่านั้น

ตารางที่ 4.2 เปรียบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากตะกอนเซลล์ยีสต์ *Saccaromyces carlbergensis* จากการสกัดทั้งสองวิธี

วิธีการสกัด	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัม)
การสกัดด้วยน้ำร้อนและความดัน (Hot water and high pressure extract)	746.80
การสกัดด้วยด่าง (Alkaline extraction)	289.36

4.3 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลาย

4.3.1 ความสามารถในการละลายน้ำ

4.3.1.1 ความสามารถในการละลายน้ำจากการสกัดด้วยน้ำร้อนและความดัน

เมื่อนำตะกอนเซลล์ที่สกัดด้วยน้ำร้อนและความดันได้มาทดสอบการน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1 0.5 1.0 2.0 และ 5.0% โดยน้ำหนัก ได้ผลดังตารางที่ 4.3

148865

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การละลายน้ำของตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำร้อนและความดัน

ความเข้มข้นของตะกอนเซลล์ยีสต์	อัตราในการละลายน้ำ
0.1%	100%
0.5%	60%
1.0%	30%
2.0%	0%
5.0%	0%

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อสกัดด้วยน้ำร้อนและความดันตะกอนเซลล์สามารถละลายน้ำได้ดีเมื่อมีความเข้มข้นไม่เกิน 0.1%

4.3.1.2 ความสามารถในการละลายน้ำด้วยการสกัดการสกัดด้วยด่าง

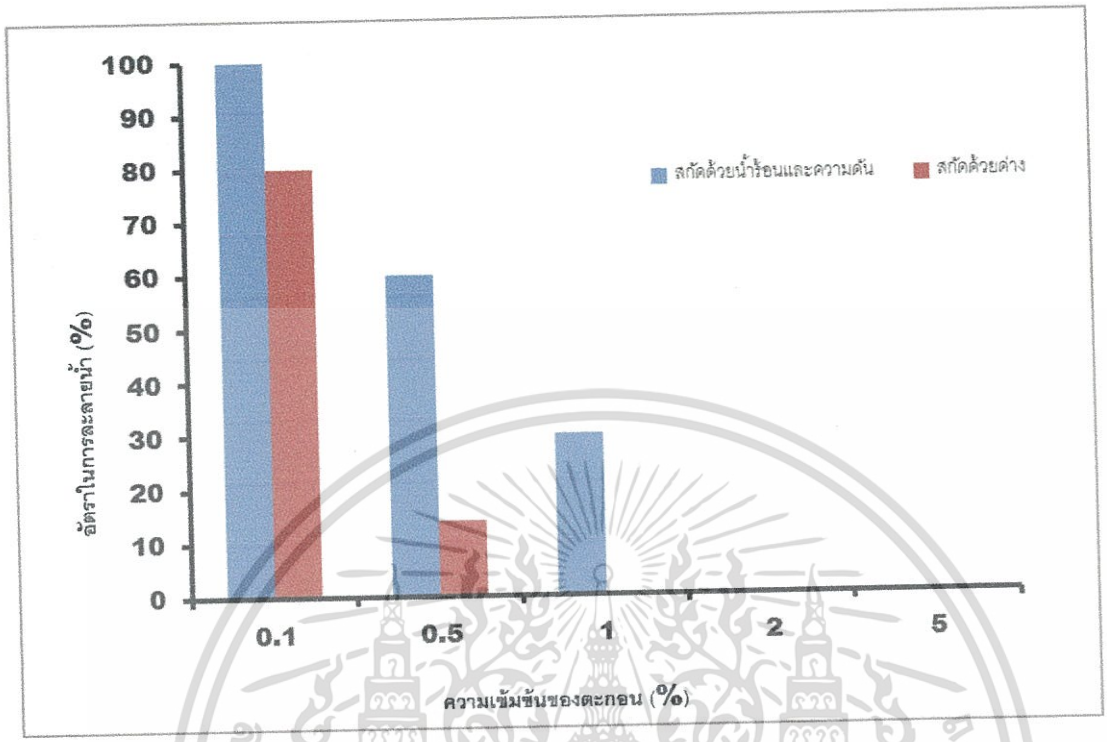
เมื่อทำการสกัดเซลล์ยีสต์ด้วยการสกัดด้วยด่างที่ความเข้มข้น 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าการละลายน้ำเป็นดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การละลายน้ำของตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการสกัดด้วยด่างที่ความเข้มข้น 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์

ความเข้มข้นของตะกอนเซลล์ยีสต์	อัตราในการละลายน้ำ
0.1%	80%
0.5%	14%
1.0%	0%
2.0%	0%
5.0%	0%

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อสกัดด้วย 0.5 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ ตะกอนเซลล์สามารถละลายน้ำได้ 80% ที่ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 0.1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ภาพเปรียบเทียบการละลายน้ำของตะกอนเซลล์ที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 แบบ

เมื่อเปรียบเทียบการละลายน้ำจากการสกัดเซลล์ยีสต์พบว่าสกัดด้วยน้ำร้อนและความดันนั้นจะทำให้การละลายน้ำได้ดีกว่าการสกัดด้วยด่างเพราะ การสกัดเซลล์ด้วยด่างนั้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่ผนังเซลล์ทำให้เซลล์แตกออก เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้สารประกอบที่อยู่ที่ผนังเซลล์มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปอาจทำให้เกิดการละลายน้ำที่ลดลง

4.3.2 ความสามารถในการละลายกรด

ในการทดลองมีการจำลองความเข้มข้นของกรดเกลือให้เท่ากับกรดเกลือในกระเพาะ คือ 0.3% ปริมาตรต่อปริมาตร โดยการละลายกรดเกลือนั้นได้กำหนดความเข้มข้นของเซลล์ที่ 0.1% ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 การละลายของตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ได้จากการสกัดใน 0.3% สารละลายกรดเกลือ

วิธีการสกัด	อัตราในการละลาย 0.3% สารละลายกรดเกลือ
การสกัดด้วยน้ำร้อนและความดัน (Hot water and high pressure extract)	14%
การสกัดด้วยด่าง (Alkaline extraction)	13%

จากผลการทดลองพบว่าตะกอนเซลล์จากการสกัดเซลล์ยีสต์ทั้งสองวิธีที่ความเข้มข้น 0.1% นั้นมีความสามารถละลายในกรดต่ำ จึงอาจจะสรุปได้ว่าคุณสมบัติในการละลายของเซลล์ยีสต์นั้นมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่ากรดเกลือในกระเพาะ ซึ่งหมายความว่าบีตากลูแคนที่พบในยีสต์ *Saccaromyces carlbergensis* มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี

จากการทดลองพบว่าเราสามารถสกัดบีตากลูแคนได้จากการใช้วิธี การสกัดด้วยน้ำร้อนและความดัน ซึ่งได้ผลที่ดีกว่าการสกัดด้วยด่าง เพราะในการละลายน้ำเพื่อให้ได้ปริมาณของบีตากลูแคนเข้าสู่ร่างกายได้ และสามารถพัฒนาการทดลองโดยสกัดและทำให้บีตากลูแคนจาก ยีสต์ *Saccaromyces carlbergensis* มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และศึกษาสมบัติต่างๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

1. ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 10% ทำให้ยีสต์มีการเจริญเติบโตได้ดี และมีสภาพให้มีทนต่อการกดดันของแทนนินในกากน้ำตาลที่ปริมาณสูงเพื่อจะผลิตบีตากลูแคนให้ได้ปริมาณมากจึงมีการเลือกใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 10%
2. ชั่วโมงที่ 20 – 32 เป็นช่วงเวลาที่เซลล์เจริญเติบโตได้มากที่สุด
3. ปริมาตรในการเลี้ยงเซลล์นั้นไม่มีผลในการอัตราในการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งในการเพิ่มขนาดนั้นจะทำให้ปริมาณของเซลล์ยีสต์มีขนาดเพิ่มมากขึ้นตามขนาดของถังหมัก
4. ในการสกัดบีตากลูแคน แบ่งได้ 2 แบบ คือการสกัดด้วยน้ำร้อนและความดัน (Hot water and high pressure extract) กับการสกัดด้วยด่าง (Alkaline extraction) ซึ่งผลปรากฏว่าการใช้น้ำร้อนสกัดนั้นได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 746.80 มิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าวิธีการสกัดด้วยด่างประมาณ 2.5 เท่า เพราะในการสกัดด้วยน้ำร้อนและความดันเป็นการทำลายผนังเซลล์ได้ดีกว่าการสกัดด้วยด่างที่ทำให้ผนังเซลล์มีลักษณะเป็นรูเท่านั้น
5. การสกัดด้วยน้ำร้อนและความดันนั้นจะทำให้การละลายน้ำได้ดีกว่าการสกัดด้วยด่างเพราะ การสกัดเซลล์ด้วยด่างนั้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่ผนังเซลล์ทำให้เซลล์แตกออก เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้สารประกอบที่อยู่ที่ผนังเซลล์มีคุณสมบัติเปลี่ยนไปอาจทำให้เกิดการละลายน้ำที่ลดลง
6. ยีสต์ที่ผ่านการสกัดทั้งสองวิธีที่ นั้นมีความสามารถในการละลายในกรดเกลือได้น้อย จึงอาจจะสรุปได้ว่าคุณสมบัติในการละลายของบีตากลูแคนที่พบในยีสต์ *Saccaromyces carlbergensis* นั้นมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีกว่ากรดเกลือในกระเพาะ ซึ่งได้ผลที่ดีกว่าการสกัดด้วยด่าง เพราะในการละลายน้ำเพื่อให้ได้ปริมาณของบีตากลูแคนเข้าสู่ร่างกายได้ และสามารถพัฒนาการทดลองโดยสกัดและทำให้บีตากลูแคนจาก ยีสต์ *Saccaromyces carlbergensis* RU01 มีความบริสุทธิ์มากขึ้นและศึกษาสมบัติต่างๆได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง ยีสต์แต่ละพันธุ์ เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับสุขภาพช่องปากต่อไป
2. ในการทดลองมีการทำให้แห้งและบดให้มีขนาดเล็กลงเพื่อทำให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ ควรมีอุปกรณ์ที่สามารถบดตัวอย่างให้มีขนาดเล็กลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

Freimund, S., Sauter, M., Ka¨ppeli, O., & Dulter, H. (2003). A new non-degrading isolation process for 1,3-b-D-glucan of high purity from baker's yeast Saccharomyces cerevisiae. Carbohydrate Polymers, 54, 159–171.

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

David, R. C., David, G. C., & Ron, J. N. (1988). The mannoprotein of Saccharomyces cerevisiae is an effective bioemulsifier. Applied and Environmental Microbiology, 54, 1420–1425

Bahl AK, Vercellotti SV, Vercellotti JR, Klein E. Methods of purifying beta-glucans. 2009 US Patent 7550584.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM BROTH

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารเหลวซึ่งเป็นอาหารที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces calbergensis* โดยในส่วนผสมของอาหารประกอบด้วย (ปริมาตร 1000 ml)

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมกันในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มล. คนให้เข้ากัน จนส่วนผสมต่างๆละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที

ก.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ กากน้ำตาล ผสม Ammonium sulfate

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารเหลวซึ่งเป็นอาหารที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces calbergensis* ที่ผ่านการเลี้ยงขั้นแรกใน YM Broth เพื่อให้เชื้อมีจำนวนที่มากพอ และสามารถจะเจริญเติบโตในกากน้ำตาลได้ โดยในส่วนผสมของอาหารประกอบด้วย (ปริมาตร 50 L)

กากน้ำตาล	5	ลิตร
น้ำกลั่น	45	ลิตร
Ammonium sulfate	50	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากันในถังหมักขนาด80ลิตร และเปิดใบกวนที่ติดตั้งมากับถังเพื่อให้ส่วนผสมทั้งหมดผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันและเปิดระบบทำความร้อนเพื่อเป็นการทำให้ปลอดเชื้อด้วย

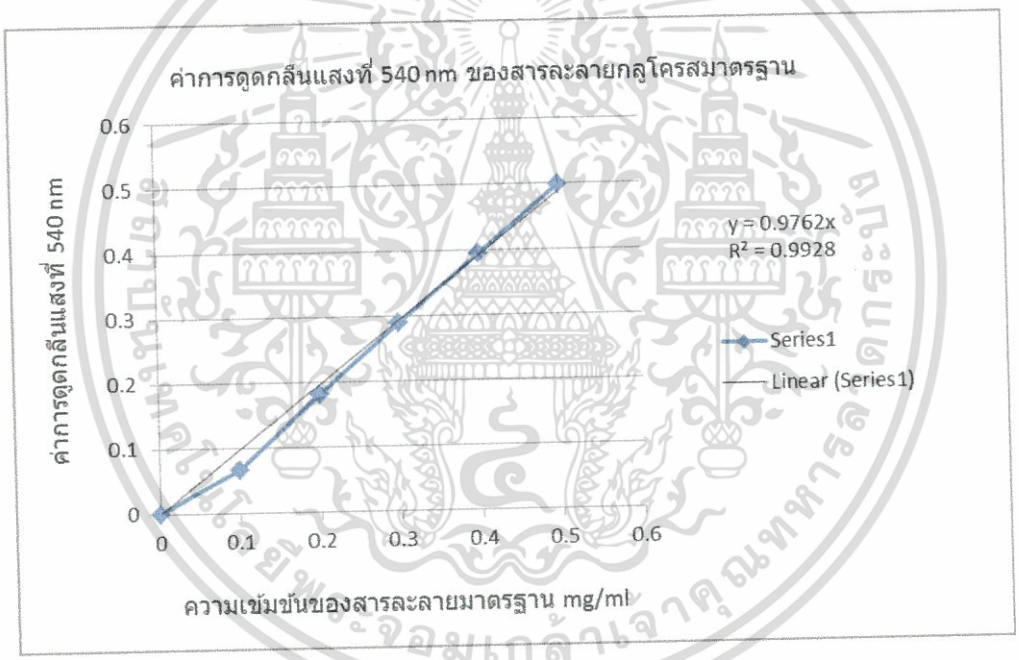
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข.1 กราฟมาตรฐาน น้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลReducing sugar โดย DNS method (Miller,1959)

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร เรามักสร้างกราฟมาตรฐานโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 540 nm แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพื่อให้หาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างชนิดเดียวกัน โดยการนำสารละลายตัวอย่างนั้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกัน แล้วนำค่าการดุดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 ตารางความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 nm
0	0
0.1	0.066
0.2	0.180
0.3	0.290
0.4	0.393
0.5	0.499

ข.2 กราฟมาตรฐาน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด(total sugar)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric

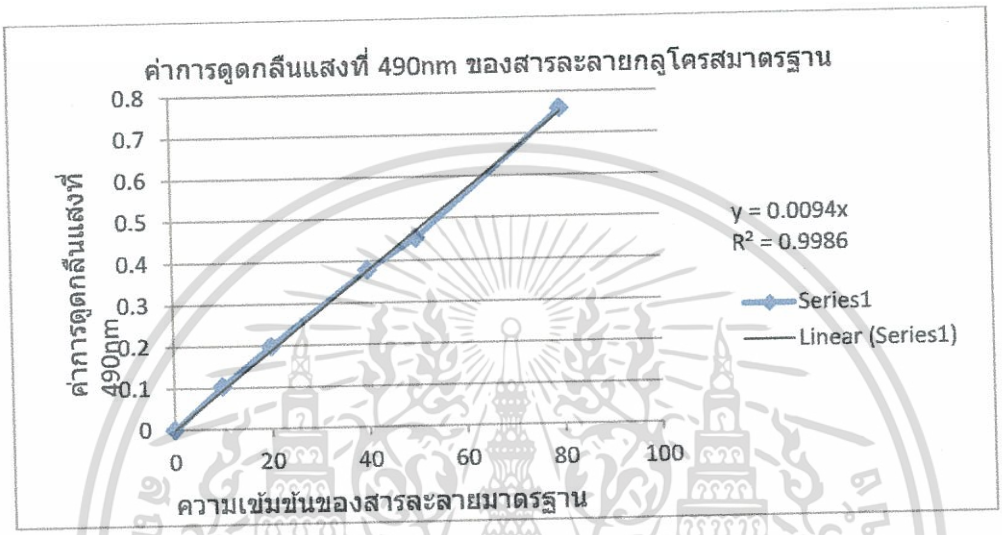
ในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร เรามักสร้างกราฟมาตรฐานโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 490 nm แล้วเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเพื่อให้หาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างชนิดเดียวกัน โดยการนำสารละลายตัวอย่างนั้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกัน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบหาค่าความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้ สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลได้ในช่วง 1– 100 ไมโครกรัมกลูโคส เป็นวิธีการวิเคราะห์ที่รวดเร็วในการหาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะ เจาะจง สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลอื่นในธรรมชาติที่อาจอยู่ในรูปของ mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide โดยน้ำตาลเหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟิวริก เข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบที่มีสี และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ ช่วงความยาวคลื่น 480–490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligosaccharide และ polysaccharide พันธะอี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เธอร์ระหว่างโมเลกุลถูกตัดออกจากกันด้วยกรด พร้อมทั้งเกิดปฏิกิริยาการขจัดน้ำออก และมีการแทนที่ด้วยอนุพันธุ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกับฟีนอลกลายไปเป็นสารประกอบไตรเอริลมีเทนที่มีสีส้ม (triarylmethane dyes) (Scherz and Bonn, 1998)



ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

ตารางที่ ข.2 ตารางความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (mg/l)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 nm
0	0
10	0.103
20	0.198
30	0.379
50	0.453
80	0.760

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายชาคร กิตติศุภพร
วัน เดือน ปี เกิด	28 สิงหาคม 2537
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ เตรียมอุดมศึกษาน้อม เกล้า จ.กรุงเทพมหานคร ปัจจุบันศึกษาที่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน และผลงานวิจัย	บริษัท เซ็นทรัล มีท แอนด์ ฟู้ดจำกัด จ.กรุงเทพมหานครฯ การสกัดเบต้ากลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01
ชื่อ-นามสกุล	นายพีรพัฒน์ วิทูรปกรณ์
วัน เดือน ปี เกิด	29 ธันวาคม 2536
ประวัติการศึกษา	มัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนอัสสัมชัญสมุทรปราการ จ.สมุทรปราการ ปัจจุบันศึกษาที่ คณะอุตสาหกรรมเกษตร หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ประสบการณ์การทำงาน และผลงานวิจัย	บริษัท แมคโคร จำกัด จ.พระนครศรีอยุธยา การสกัดเบต้ากลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces carlsbergensis* RU01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้