การกระตุ้นการสร้างบีตากลูแคนของยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* Ru01 ด้วยแทนนิน

Stimulation of beta-glucan from Yeast *Saccharomyces carlbergensis* Ru01 with tannin

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การกระตุ้นการสร้างบีตากลูแคนของยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis*RU01 ด้วยแทนนิน

Stimulation of beta-glucan from Yeast *Saccharomyces carlbergensis* RU01 with tannin

T148854

ณัฐพร โชติกาวินทร์

ธนวัฒน์ บุญสนอง

สวรส แย้มคงเมือง

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประทับ.....
เลขทะเบียน 148854
วัน.เดือน.ปี 30 ม.ค. 2560

.b 10281659 4
.l.....

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การกระตุ้นการสร้างบีตากลูแคนของยีสต์
Saccharomyces carlbergensis RU01 ด้วยแทนนิน
Stimulation of beta-glucan from
yeast *Saccharomyces carlbergensis* RU01with tannin

จัดทำโดย

ณัฐพร โชติกาวินทร์ รหัสนักศึกษา 55080096

ธนวัฒน์ บุญสนอง รหัสนักศึกษา 55080101

สวรส แย้มคงเมือง รหัสนักศึกษา 55080129

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....

(ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

25/ ก.ค./ 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การกระตุ้นการสร้างบีตากลูแคนของยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* RU01 ด้วยแทนนิน
ชื่อนักศึกษา	ณัฐพร โชติกาวินทร์ รหัสนักศึกษา 55080096
	ธนวัฒน์ บุญสนอง รหัสนักศึกษา 55080101
	สวรส แย้มคงเมือง รหัสนักศึกษา 55080129
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.สุรชัย ใหญ่เย็น

บทคัดย่อ

บีตากลูแคน (beta-glucan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก พบสารบีตากลูแคนเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ โดยถ้ายีสต์มีการรบกวนจากสารเคมี เช่น แทนนิน จะมีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อป้องกันสารเคมีเหล่านั้น จากแนวคิดนี้จึงมีการนำยีสต์มากระตุ้นให้มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณของบีตากลูแคน จึงสามารถกระทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาณมากเพราะปริมาณบีตากลูแคนแปรผันโดยตรงต่อมวลเซลล์ การศึกษาโดยหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* RU01 โดยใช้กากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุดคือ 4.40×10^{4} CFU/ml ที่เวลา 36 ชั่วโมง สภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างบีตากลูแคนของยีสต์ *Saccharomyces carlbergensis* RU01 คือ แทนนินความเข้มข้น 0.1% ทำให้มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุดคือ 9.66×10^{3} CFU/ml ที่เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อย้อมเซลล์ยีสต์ด้วย Congo red พบว่า ยีสต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแทนนินย้อมติดสีของCongo red เข้มกว่ายีสต์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยแทนนิน และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีการสกัดด้วยไอน้ำร้อนแรงดันสูง พบว่ายีสต์ที่เลี้ยงในกากน้ำตาลผสมแทนนินมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่ายีสต์ที่ไม่ถูกกดดันด้วยแทนนิน

คำสำคัญ : บีตากลูแคน ยีสต์ แทนนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title Stimulation of beta-glucan from yeast *Saccharomyces carlbergensis* RU01 with tannin

Student name Natthaporn Chotigavin Student ID 55080096
Thanawat Boonsanong Student ID 55080101
Sawaros Yamkongmueang Student ID 55080129

Program Bachelor of Science in Industral Fermentation Technology

Year 2016

Advisor Dr. Surachai Yaiyen

ABSTRACT

Beta glucan is a polysaccharide contains glucose molecules together with the glycosidic bond. Beta glucan substance is as a component of a yeast cell wall when the yeast is interference from chemicals such as tannins that it is create a thicker cell wall to prevent those chemicals. From this concept, so the yeast to stimulate the creation of thicker cell wall to increase the amount of beta glucan, In direct variation of cell mass to beta glucan production. In this study to optimum recipe of media to production of yeast *Saccharomyces carlbergensis* RU01. The media was using molasses and ammonium sulfate The optimum condition of recipe was 1% molasses and 0.1% ammonium sulfate that highest growth rate of cells was 4.40×10^4 CFU/ml at 36 hours. The optimum tannin to stimulate the beta glucan from yeast was 0.1% tannin, the growth rate of cells with a highest at 9.66×10^3 CFU / ml on 36 hours. The congo red stain to carbohydrate in yeast cells was found that, The yeast cell was induced by tannin was more dyed of the Congo red than not activated by tannin. Furthermore, the total sugars from yeast cell was extracted by hot steam and high pressure was higher in induced yeast cell with tannin than normal yeast cell.

Keywords : beta-glucan yeast tannin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายการปัญหาพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาปัญหาพิเศษ2(08026801) ของนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีการศึกษา 2558 โดยมีดร. สุรชัย ใหญ่เย็น คอยให้คำปรึกษา ความคิดเห็น ข้อแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆตลอดการทำปัญหาพิเศษนี้ ซึ่งได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีและเป็นประโยชน์อย่างมากในการทำรายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ ตลอดจนยังค่อยช่วยแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการทำรายงานปัญหาพิเศษ จึงอยากขอขอบคุณสำหรับข้อแนะนำและความช่วยเหลือในทุกๆด้านในการทำรายงานปัญหาพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำต่างๆ และให้การสนับสนุนการทำปัญหาพิเศษจนสำเร็จลุล่วงได้นอกจากนี้ก็ขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ เพื่อนทุกคนที่เป็นกำลังใจ และช่วยเหลือในการทำรายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้

ณัฐพร โชติกาวินทร์
ธนวัฒน์ บุญสนอง
สวรส แย้มคงเมือง
23 กรกฎาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II
กิตติกรรมประกาศ III
สารบัญ IV
สารบัญตาราง VI
สารบัญภาพ VII
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 บีตากลูแคน 3
2.2 การผลิตบีตากลูแคน 7
2.3 ยีสต์ 10
2.4 กากน้ำตาล 16
2.5 การกดดันยีสต์ 18
2.6 แทนนิน 18
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 21
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี 21
3.2 อุปกรณ์ 21
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 22
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 25
4.1 ผลอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ 25
4.2 ดูลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ 37
4.3 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 41
บทที่ 5สรุปผลและข้อเสนอแนะ 46
บรรณานุกรม 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก..... 50

ภาคผนวก ก..... 51

ภาคผนวก ข..... 52

ประวัติผู้เขียน..... 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ปริมาณบีตากลูแคนจากแหล่งต่างๆ ที่วิเคราะห์โดยวิธีทางเอนไซม์..... 3

2.2 ส่วนประกอบของกากน้ำตาล..... 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ทิศทางและตำแหน่งการจับกันของโมเลกุลบีตาดีกลูโคสด้วยพันธะบีตา1,3และบีตา 1,6..... 4

2.2 รูปร่างยีสต์ และโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์..... 10

2.3 การแตกหน่อของยีสต์..... 12

2.4 กากน้ำตาล..... 17

2.5 โครงสร้างแทนนิน..... 19

4.1 อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล..... 25

4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิเคราะห์โดยวิธีDinitrosalicylic acid (DNS) เปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล..... 26

4.3 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2%..... 27

4.4 อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 28

4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีDinitrosalicylic..... 29

4.6 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1 %และ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%..... 30

4.7 อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 31

4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีDinitrosalicylic acid (DNS) เปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 32

4.9 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1 %และ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%..... 33

4.10 อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้น..... 34

4.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีDinitrosalicylic acid (DNS) เปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้น..... 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.12 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของ molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.1%..... 36

4.13 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล..... 37

4.14 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 38

4.15 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 40

4.16 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 41

4.17 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล..... 42

4.18 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 44

4.19 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

บีตากลูแคน (beta-glucan) เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคส (glucose) มีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส (cellulose) คือโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) แบบบีตา 1-4 บีตากลูแคน สกัดได้จากเห็ด ผนังเซลล์ของยีสต์ (yeast) รา (mold) เมล็ดธัญพืช (cereal grain) เช่น ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์ บีตากลูแคนเป็นไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ไม่ละลายในน้ำแต่ดูดน้ำได้ดี ในอุตสาหกรรมอาหารใช้บีตากลูแคนเพื่อเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) เพื่อปรับปรุงคุณลักษณะเชิงหน้าที่ (functional properties) ของอาหาร เช่น ใช้เป็นสารให้ความหนืด (thickening agent) ใช้เป็นสารที่ทำให้อิมัลชันคงตัว (emulsifier) นอกจากนี้ ยังมีสมบัติเป็นฟังชันนัลฟู้ด (functional food) เป็นเส้นใยอาหาร (dietary fiber) ที่เป็นพรีไบโอติก (prebiotic) ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เป็นสารที่ยอมรับทั่วไปว่าปลอดภัยและยังมีคุณสมบัติทาการแพทย์ ในการรักษาโรคมะเร็งและเนื้องอกอย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีการนำบีตากลูแคนมาใช้รักษามะเร็งหลายชนิดและลดผลข้างเคียงของเคมีบำบัดเช่นการฉายแสง และยังมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันต่อต้านเนื้อเยื่อ เช่น รูมาตอยด์ บีตากลูแคนจากยีสต์เป็นแหล่งหนึ่งที่มีการผลิตที่มากในอุตสาหกรรม และยังมีการพบสารบีตากลูแคนเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ โดยถ้ายีสต์มีการรบกวนจากสารเคมี เช่น แทนนิน จะมีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อป้องกันสารเคมีเหล่านั้น โดยผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมีองค์ประกอบของกรดไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้น จากแนวคิดนี้จึงมีการนำยีสต์มากระตุ้นให้มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณของบีตากลูแคนนอกจากนี้ยีสต์ Saccharomyces calbergensis RU01 ยังเป็นวัสดุเหลือจากกระบวนหมัก เอทานอลซึ่งเป็นการนำวัสดุเหลือใช้กลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 หาสภาวะการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ที่เหมาะสมที่สุดจากความเข้มข้นของกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างกัน

1.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 โดยใช้กากน้ำตาลผสมกับแทนนิน

1.2.3 ศึกษาปริมาณคาร์โบไฮเดรตในยีสต์ที่กดดันด้วยแทนนิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces calbergensis* RU01

1.3.2 ได้สภาวะเหมาะสมในการสร้างบีตากลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces calbergensis* RU01

1.3.3 ได้ทราบคุณสมบัติของบีตากลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces calbergensis* RU01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บีตากลูแคน (Beta-Glucan)

บีตากลูแคนจัดเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีหน่วยย่อย คือ ดีกลูโคส(D-glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตาไกลโคซิดิก (β-glycosidic bond) บีตากลูแคนที่พบในธรรมชาติมีหลายกลุ่มโดยมีลักษณะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีและโครงสร้างสามมิติของบีตากลูแคนชนิดนั้นๆ โดยทั่วไปบีตากลูแคนพบได้ในพืชชนิดต่างๆ เช่น ข้าวโอ้ต(oat) ข้าวบาร์เลย์ (barley) รำข้าว สาหร่ายทะเล เห็ด ยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งพบโครงสร้างและปริมาณแตกต่างกันดังตารางที่ 2.1

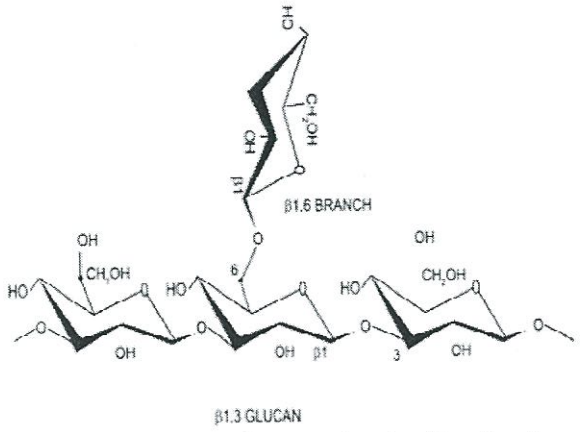
ตารางที่ 2.1 ปริมาณบีตากลูแคนจากแหล่งต่างๆ ที่วิเคราะห์โดยวิธีทางเอนไซม์ (enzyme assay)

แหล่งที่มา	ปริมาณบีตากลูแคน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
บีตากลูแคนมาตรฐาน Lot 90201a	66.8
Saccharomyces cerevisiae	60.0
บีตากลูแคนจากข้าวบาร์เลย์ Lot 90801a	97.6
สเคลอโรกลูแคน (scleroglucan) ของ Actigum CS11	89.1
เคิร์ดแลน (curdlan) Lot 60201a	97.4
แพไคแมน (pachyman) Lot 10301a	86.6
ลามินาลิน (laminarin) จาก *Eisenia arborea* หรือ Tokyo Kasei	89.7
อัลฟาเซลลูโลส (α-cellulose)	9.6
เอวิเซล (Avicel)	14.5
แป้งชนิดละลายได้ (soluble starch) ของ Sigma Chemical	0.34
ไกลโคเจน ประเภท II (glycogen Type II) ของ Sigma G-8751	0.27

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

จากการวิจัยพบว่าบีตากลูแคนที่ประกอบด้วย พันธะบีตา 1,3 และมีกิ่งก้านที่เชื่อมต่อด้วยพันธะบีตา 1,6 ไกลโคซิดิก หรือเรียกว่า บีตา 1,3/1,6 กลูแคน ดังภาพที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 ทิศทางและตำแหน่งการจับกันของโมเลกุลบีตาดีกลูโคสด้วยพันธะบีตา1,3และบีตา 1,6

ที่มา : Chan et al., 2009

ในยีสต์บีตากลูแคนประกอบด้วยสายโครงหลักและสายที่เป็นกิ่งก้านโดยภายในสายโครงสร้างหลักประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1,3 (1,3- β-linkage) สำหรับสายที่เป็นกิ่งก้านประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1,6 (1,6- β-linkage) (Kapteyn*et al.*, 1996) บีตา 1,6-กลูแคนทำหน้าที่เชื่อมแต่ละองค์ประกอบที่ผนังเซลล์(Kollar*et al.*, 1997) ในเซลล์ที่ขาดความสามารถในการสร้างบีตา 1,6 กลูแคนพบว่าเซลล์ขาดการประกอบกันเป็นผนังเซลล์ขององค์ประกอบต่างๆ ถูกรบกวนและมีผลกระทบรุนแรงต่อการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าบีตา 1,6 กลูแคนเป็นองค์ประกอบที่ยึดจับกับไคตินในบริเวณรอยแผลที่เกิดจากการแตกหน่อบีตากลูแคนนั้น ผนังชั้นในของผนังเซลล์ยีสต์พบบีตากลูแคนที่ไม่สามารถละลายได้ในด่างเป็นองค์ประกอบที่พบประมาณ 30-35 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ โดยมากประกอบด้วยบีตา 1,3 กลูแคนและที่ผนังชั้นกลางของผนังโดยประมาณ 20-22เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ พบบีตากลูแคนที่สามารถละลายได้ในด่างโดยมากประกอบด้วยบีตา 1,3 กลูแคนที่มีกิ่งก้านของบีตา 1,6 กลูแคน(Ha *et al.*, 2002) ซึ่งหน้าที่ที่สำคัญของบีตา 1,6 กลูแคนคือเป็นตัวเชื่อมแมนโนโปรตีนกับผนังเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนซ์(Manner *et al.*, 1973) โดยบีตากลูแคนที่ผนังเซลล์ของยีสต์เริ่มมีการสร้างขึ้นในขณะที่เกิดการแตกหน่อของยีสต์โดยเอนไซม์กลูแคนซินเธเทส (glucansynthetase enzyme) ซึ่งพบที่เยื่อหุ้มพลาสมาในขณะที่มีการแตกหน่อ(Shemateke*t al.*, 1980) สำหรับการสังเคราะห์ บีตา 1,6 กลูแคนนั้น(Roh*et al.* 2002) อาจสร้างขึ้นหลังจากสร้างบีตา 1,3กลูแคนที่เยื่อหุ้มพลาสมาโดยอาจมีบีตา 1,3 กลูแคนเป็นตัวตั้งต้นจากการศึกษาของShahinian*et al.* (1998)พบว่าการดัดแปลงโครงสร้างของ N-linked chainส่งผลต่อปริมาณของบีตา 1,6 กลูแคนที่ผนังเซลล์ซึ่งแสดงให้เห็นว่า N- linked chain กับบีตา 1,6กลูแคนมีความสัมพันธ์กันจากการศึกษาโปรตีนที่ช่วยในการจับกันของเซลล์ (α-agglutinin) ทำให้พบว่าแมนโนโปรตีนที่อยู่ส่วนนอกของผนังเซลล์จะผ่านการตัดแต่งโดยการเติมหมู่ไกลโคซิลฟอสฟาทิดิลอินโนซิทอลซึ่งแมนโนโปรตีนที่ได้เมื่อถูกส่งผ่านเยื่อหุ้มพลาสมาแล้วเกิดการแตกของหมู่ไกลโคซิลฟอสฟาทิดิลอินโนซิทอลที่ปลายคาร์บอน (C-terminal) แล้วจึงเกิดพันธะไกลโคซิดิกกับบีตา 1,6 กลูแคน(Kapteyn*et*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al., 1996)จากนั้นโครงสร้างที่ได้จะเชื่อมกับบีตา 1,3 กลูแคนเพื่อสร้างเป็นโครงข่ายของผนังเซลล์ต่อไป ซึ่งจากทฤษฎีนี้จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้ โดยพบว่าในเซลล์ยีสต์นั้นจะมีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นในสภาวะเครียด เช่น ในสภาวะที่มีเอทานอลที่สูงหรือในสภาวะที่มีการกดดันด้วยแทนนิน โดยพบว่าสารที่พบในผนังเซลล์มีการสร้างสารเพื่อให้มีความแข็งแรงมากขึ้นและทนต่อแรงดันออสโมติก นอกจากนี้ผนังเซลล์ยังมีความหนาเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นไปได้ที่จะมีบีตากลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์มากขึ้นด้วย ในงานวิจัยชิ้นนี้มีการใช้ตัวกระตุ้นให้ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis*RU01 มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นโดยใช้แทนนินที่เป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อและมีการใช้ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis*RU01 ที่ถูกพัฒนาให้มีความสามารถในการทนต่อแทนนินที่ความเข้มข้นสูงได้จากการหมักเอทานอลจากจามจุรี นอกจากนี้ยังศึกษาศึกษาลักษณะทางเคมีกายภาพของบีตากลูแคนจากยีสต์ ได้แก่ โครงสร้างของบีตากลูแคน ขนาดโมเลกุล การละลายน้ำ เพื่อสามารถนำไปใช้ประยุกต์ในอุตสาหกรรมได้ เช่นอุตสาหกรรมยา อาหารเสริม อาหารเลี้ยงสัตว์ เป็นต้น

2.1 ชนิดของบีตากลูแคน

บีตากลูแคน มี 4 ชนิด ส่วนใหญ่จะมาจากแหล่งที่เป็นอาหารเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งได้แก่บีตากลูแคนจากยีสต์ขนมปัง บีตากลูแคนจากยีสต์สุรา(บริวเวอร์ยีสต์) บีตากลูแคนจากเห็ดที่กินได้ชนิดต่างๆ และบีตากลูแคนจากธัญพืช เหตุผลที่สำคัญในการนำบีตากลูแคนจากแหล่งที่เป็นอาหารมาใช้ เนื่องจากความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค เพราะแหล่งอาหารที่กล่าวถึงนี้ อยู่คู่กับมนุษย์เรามาเป็นเวลาหลายพันปีแล้ว จึงเป็นสิ่งที่ยืนยันความปลอดภัยของอาหารเหล่านี้ ในปัจจุบันนี้จึงมีผลิตภัณฑ์ของบีต้ากลูแคนจากทั้ง4 แหล่งออกมาจำหน่ายมากมายทั่วโลกเนื่องจากว่ามีประสิทธิภาพสูงมาก ในขณะที่แทบจะไม่พบผลข้างเคียงต่อผู้บริโภคเลย

2.1.1 บีตากลูแคนจากยีสต์ขนมปัง

ยีสต์ขนมปังที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharomyces cerevisiae* เป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการศึกษามากที่สุดชนิดหนึ่งในโลก อาจจะเพราะความคุ้นเคยและความปลอดภัย เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้เป็นส่วนสำคัญของอาหารมนุษย์มานานกว่า 6 พันปีแล้ว ได้ให้ผลิตภัณฑ์ที่จำเป็นต่อมวลมนุษย์ชาติ เช่น ขนมอบชนิดต่างๆ เหล้า เบียร์ ไวน์ เป็นต้น ต่อมามีความต้องการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ชนิดนี้ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นและมีความเฉพาะตามความต้องการของการใช้งาน เช่น ความสามารถในการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณสูงขึ้น หรือความสามารถในการทนต่อแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงขึ้น เป็นต้น บีตากลูแคนเป็นสารที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลล์ของยีสต์ขนมปัง ส่วนที่เรียกว่า บีตากลูแคน จะประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ลักษณะคือที่เป็นบีตา1,3 กลูแคนและบีตา 1,6 กลูแคน โดยบีตา1,3 กลูแคน มีปริมาณ 85% ของปริมาณบีตากลูแคนทั้งหมด โมเลกุลมีโครงสร้างเป็นบันไดเวียนชนิด 3 เกลียว และมีขนาดโมเลกุลเฉลี่ย 250,000 ดาลตัน (Da)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 บีตากลูแคนจากยีสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์)

การที่พบว่าบีตากลูแคนจากยีสต์ขนมปังมีคุณภาพสูงมาก ในการเสริมภูมิคุ้มกัน จึงมีความพยายามที่จะนำบีตากลูแคนจากยีสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์ Brewer"s Yeast) ซึ่งมีราคาถูกมาก เนื่องจากเป็นวัตถุดิบจากของเสียจากอุตสาหกรรมสุรา 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 เพื่อให้ความเหนียวนุ่ม น่ารับประทาน และช่วยเสริมความคงตัวของแป้งในอาหารสำเร็จรูปแบบแช่แข็งอีกด้วย ความพยายามเพิ่มมูลค่าให้กับบีตากลูแคนชนิดนี้ โดยนำมาโฆษณาว่า มีประสิทธิภาพที่เหนือกว่าบีตากลูแคนที่มีการศึกษามาทั้งหมด แม้ว่ายีสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์) จะเป็นยีสต์ชนิดเดียวกันกับยีสต์ขนมปัง แต่ปริมาณบีตากลูแคนที่พบในผนังเซลล์ก็ต่างกัน คุณสมบัติทางกายภาพของบีตากลูแคนที่สกัดได้ก็ต่างกัน โดยยีสต์สุรา (บริวเวอร์ยีสต์) มีอัตราส่วนประกอบ 1,3 และสายแขนง 1,6 น้อยกว่ายีสต์ขนมปังมาก โมเลกุลของบีตากลูแคนมีขนาดเล็ก และสภาพเป็นเจลละลายน้ำได้ง่าย ไม่เหมือนกับยีสต์ขนมปังที่อยู่ในรูปไม่ละลายน้ำและที่สำคัญก็คือสภาพของยีสต์ที่ได้มาจากของเสีย เป็นเซลล์ไม่ได้อยู่ในสภาพที่เจริญเติบโตอย่างเหมาะสม (จำนวนมาก อยู่ในสภาพที่ขาดอาหารและกำลังจะตายหรือตายไปแล้ว จากการแช่อยู่ในแอลกอฮอล์ที่ตัวมันเองผลิตขึ้นมา) บีตากลูแคนที่ผลิตได้ในสภาพนั้นจึงไม่สามารถควบคุมคุณภาพได้ คุณภาพที่ได้จึงไม่ดีเท่าที่ควร ต่างกับยีสต์ขนมปังที่เลี้ยงขึ้นมา และสกัดในช่วงเวลาการเจริญเติบโตที่เหมาะสม จึงทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพของบีตากลูแคนที่ต้องการได้

2.1.3 บีตากลูแคนจากเห็ดที่กินได้ชนิดต่างๆ

การศึกษาบีตากลูแคนในเห็ดกินได้ เริ่มขึ้นในเอเชียเมื่อกว่า 40 ปีที่แล้ว โดยมีประเทศญี่ปุ่นเป็นหัวเรี่ยวหัวแรงหลัก นำขบวนโดย ดร.โกโระ ชิฮาร่า แห่งมหาลัยเทเกียว ญี่ปุ่น ทำการศึกษาในเห็ดชนิดต่างๆ เกี่ยวกับคุณสมบัติในการยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด และพบว่าเห็ดชนิดต่างๆมีคุณสมบัติกระตุ้นให้ร่างกายสามารถต่อต้านการลุกลามของโรคมะเร็ง และโรคติดเชื้อต่างๆ บีตากลูแคนที่จะนำเสนอในที่นี้ได้มาจากเห็ด 2 ชนิดที่มีการจำหน่ายอย่างแพร่หลายในประเทศญี่ปุ่นและจีน ต่อมาในสหรัฐอเมริกาและหลายประเทศในยุโรป การศึกษาพบว่าเห็ดเหล่านี้ มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในบรรดาเห็ดทั้งหลายที่ศึกษา ซึ่งรวมไปถึงเห็ดที่เรารู้จักกันดี เช่น เห็ดหอม เห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลินจืออีกด้วย เห็ดไมตาเกะ (Glifola frondosa) เป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ถึง 20 กิโลกรัม ได้รับฉายาว่าเป็น " ราชาแห่งเห็ด " เป็นเห็ดที่มีการบริโภคอย่างแพร่หลายในญี่ปุ่น บีตากลูแคนมีพันธะ 1,6 เป็นสายหลักและมีพันธะ 1,3 เป็นสายแขนง เห็ดหางไก่งวง (Trametes versicolor) เป็นเห็ดทีมีหลายสีในดอกเดียวกัน มีสารออกฤทธิ์เรียกว่า PSK (Polysaccharide-K) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีโปรตีนเกาะอยู่กับสายของบีตากลูแคน บีตากลูแคนจากเห็ดทั้ง 2 ชนิด นอกจากจะมีคุณสมบัติในการลดน้ำตาลในเลือดแล้ว ยังมีคุณสมบัติในการเสริมระบบภูมิคุ้มกัน และได้ใช้ร่วมกับเคมีบำบัด ฉายรังสี และการผ่าตัด สำหรับการรักษามะเร็งหลายชนิด ในญี่ปุ่นและจีน ยังพบอีกว่าบีตากลูแคนช่วยยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งบางชนิด เช่น มะเร็งกระเพาะอาหาร หลอดอาหาร ลำไส้ใหญ่ เต้านม ปอด ได้เป็นต้น

2.1.4 บีตากลูแคนจากธัญพืช

พืชบางชนิด เช่น ข้าวโอ้ต และข้าวบาร์เลย์ พบว่ามีใยอาหารที่ละลายน้ำได้สามารถลดคอเลสเตอรอลและน้ำตาลในเลือดได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่โดดเด่นของธัญพืชเหล่านี้ บีตากลูแคนของธัญพืชเหล่านี้มีพันธะ 1,4 เป็นสายหลักและ 1,3 เป็นสายแขนง การเสริมภูมิคุ้มกันของบีตากลูแคนในธัญพืช กำลังเป็นที่สนใจของนักวิทยาศาสตร์

2.2 การผลิตบีตากลูแคน

บีตากลูแคนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในผนังเซลล์ของยีสต์เกิดการสร้างเมื่อเซลล์มีการแตกหน่อและสร้างผนังเซลล์ของเซลล์ลูกดังนั้นการผลิตบีตากลูแคน จึงสามารถกระทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เซลล์มีมวลเซลล์มากเพราะปริมาณบีตากลูแคนแปรผันโดยตรงต่อมวลเซลล์ปัจจุบันมีเทคนิคต่างๆไม่ว่าจะเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแบตช์การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเฟดแบตช์หรือการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบต่อเนื่องซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้มวลเซลล์ปริมาณสูงเทคนิคเหล่านี้หากประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ย่อมสามารถช่วยเพิ่มมวลเซลล์ของยีสต์และส่งผลให้ได้ปริมาณบีตากลูแคนที่สูงขึ้น

Kim *et al.* (2006) ผลิตบีตากลูแคนที่ละลายในน้ำด้วยการเพาะเลี้ยง*S.cerevisiae*KCTC7913 แบบต่อเนื่องในอาหารสังเคราะห์พบว่าปริมาณบีตากลูแคนที่ละลายในน้ำที่ผนังเซลล์สูงขึ้นเมื่อใช้อัตราการเจือจางต่ำเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์เซลล์มีปริมาณบีตากลูแคนที่ละลายในน้ำที่ผนังเซลล์ 0.13 กรัมบีตากลูแคนต่อน้ำหนักแห้งและมีอัตราการผลิต 0.095 กรัม บีตากลูแคนต่อลิตรต่อชั่วโมง

Fliegeret *al.* (2003) ทำการเพาะเลี้ยง *Claviceps viridis* CBS 125.63 เพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ซึ่งมีกลูแคนเป็นองค์ประกอบประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ในถังหมักแบบกวนปริมาตร 5 ลิตรเป็นเวลา 7 วันโดยไม่มีการควบคุม pH สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์นอกเซลล์ได้ 1.9 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อวันโดยพบว่าในวันที่ 3 ของการหมักจะมีกิจกรรมของเอนไซม์กลูคาเนสสูงและผลิตมวลเซลล์ได้สูงที่สุด 10-14 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Freimundet al. (2003) ศึกษาวิธีการใหม่เพื่อผลิตบีตากลูแคนจาก*Saccharomyces cerevisiae* การสกัดบีตากลูแคนจากผนังเซลล์ด้วยน้ำร้อน 125 องศาเซลเซียสตามด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสและแยกบีตากลูแคนด้วยอะซีโตน (acetone) นำส่วนที่แยกได้มาทำเป็นผงโดยพบว่าจากการใช้ผนังเซลล์ยีสต์ 150 กิโลกรัมสามารถผลิตบีตากลูแคนได้ถึง 87 เปอร์เซ็นต์ซึ่งบีตากลูแคนที่ได้มีความบริสุทธิ์ถึง 92 เปอร์เซ็นต์

Khunrae (2001) ทำการสกัดกลูแคนจากยีสต์ใช้แล้วในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล พบว่าสามารถสกัดกลูแคนที่มีความบริสุทธิ 50เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเมื่อคำนวณเป็นค่าการผลิตกลูแคนผงจากยีสต์ใช้แล้วในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์พบว่ามีต้นทุนการผลิต 161.3 บาทต่อ 1 กิโลกรัมของกลูแคนผง

Wang *et al.* (2003) ศึกษาการผลิตกลูแคนจาก *Saccharomyces cerevisiae*FL1 โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายตัวเองของเซลล์แล้วจึงสกัดกลูแคนด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองได้โดยการเติม 1.5 เปอร์เซ็นต์เอธิลแอซีเตตร่วมกับการปรับ pH เป็น 5.5 อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เมื่อผ่านไป 36 ชั่วโมงของเกิดการย่อยสลายตัวเองสารภายในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมา 42 เปอร์เซ็นต์และสามารถสกัดกลูแคนได้ 22.9 เปอร์เซ็นต์

พัตราพร จอมเมืองบุตร(2557) ได้ทำการศึกษาการสกัดบีตากลูแคนจากข้าวเหนียวดำ โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดบีตากลูแคน ได้แก่ ปริมาตรน้ำ ระยะเวลา พีเอช และอุณหภูมิ ประสิทธิภาพในการสกัด[u9ากลูแคนรายงานในรูปปริมาณสารสกัดและปริมาณ บีตากลูแคนในสารสกัด ผลการทดลองพบว่า พีเอช (4และ 7) และอุณหภูมิ (> 35°C) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดบีตากลูแคนมากกว่าปริมาตรน้ำและระยะเวลา จะเห็นได้จากปริมาณสารสกัดและปริมาณบีตากลูแคนที่เพิ่มสูงขึ้น ปริมาณบีตากลูแคนสกัดที่โดยใช้น้ำ 150 ml พีเอช 7 อุณหภูมิ 55°C ระยะเวลา 5 ชั่วโมง ได้ปริมาณสูงสุด คือ 5.74 mg/100 g ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลด้วยวิธีThin Layer Chromatographyตรวจพบ1,3:1,4-Beta-gluco-triose(G3)และ1,3:1,4-Beta-gluco-tetraose(G4) ในบีตากลูแคนจากข้าวเหนียวดำ ซึ่งน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้เป็นองค์ประกอบหลักในบีตากลูแคนจากธัญพืช

มลฤดี (2541) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารบีตากลูแคน จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบการกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารบีตากลูแคน ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถกำจัดแบคทีเรียในน้ำเลือดและต้านทานต่อเชื้อ *Vribio harveyi* ปิยธิดา (2557) ได้ทำการศึกษาการศึกษาบีตากลูแคนที่แยกได้จากเห็ดนางฟ้า ในการกระตุ้นการผลิตไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 และกระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 จากผลการทดลองพบว่า บีตากลูแคนชนิด alkaline insolubie B-glucan-containing crude extract และ purified soluble B-glucan ไม่สามารถกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้ผลิตไนตริกออกไซต์ได้และในส่วนของ B-glucan-containing polysaccharide extract จากเห็ดนางฟ้าที่ได้มาจากการสกัดโดยใช้น้ำร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และกำจัดส่วนโปรตีนบางส่วนออกโดย Sevag reagent อาจจะเหนี่ยวนำการสร้างไนตริกออกไซด์ในเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ได้แต่ผลการทดลองยังไม่ชัดเจนและต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม นอกจากนี้การสารสกัดดังกล่าวสามารถกระตุ้นการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อชนิด L6 โดยการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์อาจเกิดขึ้นผ่านทางการทำงานของเอนไซม์ชนิด PI3K/Akt และP38 MAPK ซึ่งวิถีและกลไกของการกระตุ้นยังคงต้องศึกษาต่อไป

Lietuvos M. Akademija et al. (2012) ได้ศึกษาการสกัด β-Glucan จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้ *Actinomyces rutgersensis* 88 ผลที่ได้ สลายเซลล์ยีสต์ 6 ชั่วโมงโดยใช้ *Actinomyces rutgersensis* 88 ที่เป็นของแข็ง เซลล์ยีสต์แยกจากผนังเซลล์ยีสต์ที่ได้ละลายน้ำได้และสกัดบีตากลูแคนโดยใช้ NaOH 0.5 ใช้เวลา4ชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้ได้อย่างรวดเร็วและไม่ซับซ้อน ใช้สกัดบีตากลูแคนเพื่อใช้ในการวิจัยที่แตกต่างกัน

สุภารัตน์ จันทร์เหลือง (2015) ได้ศึกษาการศึกษาหาปริมาณสารบีตากลูแคน โปรตีน และเส้นใยในเห็ดป่าที่ใช้บริโภค ในจังหวัดอุบลราชธานี การหาปริมาณสารบีตากลูแคน ในงานวิจัยนี้ใช้ชุดทดสอบหาปริมาณสารบีตากลูแคนใน เห็ดราของ บริษัท Megazyme โดยมีหลักการคือ การหาปริมาณสารกลูแคนทั้งหมด (total-glucan) (Alpha-glucan + β-glucan) หักลบออกด้วยปริมาณสารอัลฟากลูแคน (α-glucan) โดยอาศัยหลักการที่สาย 1,3:1,6- β-D-glucan, 1,3- β-D-glucans และ α-glucans จะถูกละลายในกรด HCl เข้มข้น หลังจากนั้นพันธะจะถูกตัดด้วย 1.3 N HCl ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ได้เป็น D-glucose โดยสมบูรณ์ด้วยการ incubation ร่วมกับเอนไซม์ exo-1,3- β-glucanase และ β-glucosidase แล้วหาปริมาณ D-glucose ด้วยวิธี glucose oxidase test

Xiao-Yong Liu ศึกษาวิธีใหม่สำหรับการสกัด β-D-glucan จาก *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งประกอบด้วยการชักนำให้เกิดการย่อยตัวเองด้วยน้ำ และตัวทำละลายอินทรีย์ โดยทำให้เป็นเนื้อเดียวกันและย่อยสลายโปรติเอส เมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบเดิม ข้อดีคือได้รับผลตอบแทนที่สูงและได้ β-D-glucans ที่มีความบริสุทธิ์ และβ-D-glucans จะยังอยู่ในสภาพเดิม นอกจากนี้วิธีการสกัดไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและมีการปรับใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมได้อย่างง่าย ขั้นตอนการทดลองแสดงให้เห็นว่าการสกัดมีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อ β-D-glucans โดยเฉพาะอย่างยิ่งทำให้เกิดการย่อยตัวเองและทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน หลังจาก 24 ชั่วโมงของการย่อยตัวเองทำให้เกิด 48% (w/w) ของสารที่ถูกปล่อยออกมาในขณะที่ผนังเซลล์ยังคงสภาพสมบูรณ์โดยใช้น้ำร้อน ความแข็งแรงของผนังเซลล์ยีสต์จะลดลงด้วยการกำจัดของแมนโนโปรตีน ซึ่งทำให้ผนังเซลล์ยีสต์ถูกรบกวนได้ง่าย ผลที่ตามมาอัตราส่วนของเซลล์ยีสต์แตกหักน้อยกว่า 95% หลังจากผ่านการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน 70 MPa สุดท้ายได้ β-D-glucans 91% ของอัตราส่วนแรกเริ่มในผนังเซลล์ของยีสต์ และมีความบริสุทธิ์ถึง 93% (w/w)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งอยู่ในอาณาจักรฟังไจ (Fungi) ซึ่งเป็นอาณาจักรเดียวกับรา ยีสต์มีเซลล์ชนิดยูคาริโอต(Eukaryote) เป็นเซลล์เดี่ยวรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 5 ไมครอน (สาวิตรี, 2540) ประมาณ 75% น้ำหนักแห้งของผนังเซลล์ยีสต์ (yeast cell wall) เป็นสารประเภทโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) (Kogan and Kocher, 2007) ซึ่งประกอบด้วย บีตากลูแคน (ß-glucans) 29- 64%, แมนแนน (mannans) 31%, และไคติน (chitin) รวมถึงสารประเภทอื่น ๆ ได้แก่ โปรตีน 13% และไขมัน 9% แต่ทั้งนี้องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ยังขึ้นอยู่กับอาหารที่ใช้ ในการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ (Jaehring et al., 2008) ผนังเซลล์ยีสต์ Saccharomyces cerevisiaeประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ชั้น คือ ชั้นใน (inner layer) ทำหน้าที่กำหนดรูปร่างและโครงสร้างของเซลล์ ประกอบด้วยบีต้า1,3กลูแคน (ß-1,3 glucan) บีต้า1,6กลูแคน (ß-1,6 glucan) และไคติน และโครงสร้างชั้นนอก (outer layer) ประกอบด้วย แมนแนน ที่เกาะอยู่กับโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) เรียกว่า แมนโนโปรตีน (mannoprotein)หลายทศวรรษที่ผ่านมาผนังเซลล์ยีสต์ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริมทั้งสำหรับคนและสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration, FDA) ว่าสามารถใช้เติมลงไปในอาหารสัตว์ได้อย่างปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) โดยมีรูปร่างลักษณะดังภาพที่ 2.2

ภาพที่ 2.2 รูปร่างยีสต์ และโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์

ที่มา: เมทินี (2554)

2.3.1 การจัดลำดับชั้นอนุกรมวิธานของยีสต์ (ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

เป็นการจำแนกยีสต์ออกเป็นหมวดหมู่ตามสายวิวัฒนาการ โดยจะเริ่มจาก Kingdom ไป Phylum ไป Class ไป Order ไป Family ไป Genus ไป Species ดังต่อไปนี้

Kingdom : Fungi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phylum : Ascomycota

Subphylum : Saccharomycotina (true yeasts)

Class : Ascomycetes

Order : Saccharomycetales

Family : Saccharomycetaceae

Genus : *Saccharomyces*

2.3.2 สัณฐานวิทยาของยีสต์

โดยทั่วไปขนาดเซลล์ยีสต์ใหญ่กว่าแบคทีเรีย แต่ยีสต์ที่ขนาดเล็กที่สุดยังไม่ใหญ่เท่าแบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ขนาดของยีสต์แตกต่างกันตั้งแต่ ความกว้าง 1-5 ไมโครเมตร และความยาว 5-30 ไมโครเมตร หรือมากกว่า มักมีรูปไข่ แต่บางชนิดมีรูปร่างยาว และบางชนิดเป็นทรงกลม ยีสต์แต่ละชนิดจะมีรูปร่างโดยเฉพาะ แม้จะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ก็ยังมีความแตกต่างที่ขนาดรูปร่างของแต่ละเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุ และสภาพแวดล้อม ยีสต์ไม่มีแฟลกเจลลาหรืออวัยวะอื่นในการเคลื่อนที่

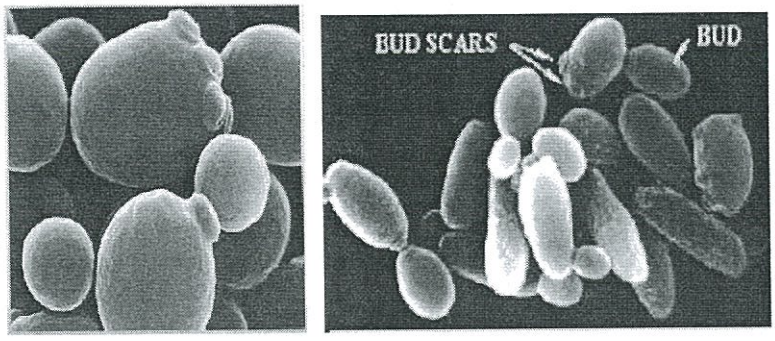
2.3.3 สรีรวิทยาของยีสต์

ในพวกยีสต์พบว่ามีปฏิกิริยาทางสรีรวิทยาแตกต่างกันเช่นเดียวกับสัณฐานวิทยาและกลไกการสืบพันธุ์ การย่อยสลายน้ำตาล เช่น กลูโคสอาจเกิดในลักษณะไม่ใช้ออกซิเจน(กระบวนการหมัก) หรือใช้ออกซิเจน(การหายใจ) กระบวนที่นิยมมากที่สุด คือการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนหรือกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งผลสุดท้ายจะได้เอทิลแอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ ยีสต์ได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อนำไปสร้างโปรตีน และยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียไอออนได้ ความสามารถในการใช้ไนเตรต และไนไตรต์ และสามารถดึงหมู่อะมิโนออกจากกรดอะมิโน ช่วยแยกความแตกต่างของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ได้ ยีสต์พวกที่ชอบออสโมซิสสูงสามารถเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูงๆ ได้ โดยมีความขึ้นจำกัด และยีสต์สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0-27 องศาเซลเซียสบางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส ต่ำกว่านี้ อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ที่ 20-30 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ก่อโรคเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปยีสต์เจริญได้ดีในอาหารที่มีความเป็นกรดระหว่าง พีเอช 3.5-3.8 ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ (ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

2.3.4 การขยายพันธุ์ของยีสต์

ยีสต์ส่วนมากขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อ (Budding) แต่ยีสต์บางชนิดอาจขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยการสร้างสปอร์ ซึ่งมีชื่อเรียกว่า แอสโคสปอร์ (Ascospore)หรือ เบสิดิโอสปอร์ (Basidiospore) (สาวิตรี, 2540) การขยายพันธุ์ของยีสต์แสดงดังภาพที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 การแตกหน่อของยีสต์

ที่มา: เมทินี (2554)

2.3.5 ชนิดของยีสต์

ยีสต์ที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เรียกว่า ดิวเทอโรมัยซิท (Deuteromycetes) หรือยีสต์เทียม ยีสต์ที่ขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบไม่อาศัยเพศ และอาศัยเพศ โดยการสร้างแอสโคสปอร์เป็นยีสต์แท้ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม แอสโคมัยซีส (Ascomycete) ได้แก่ *Saccharomyces* ยีสต์เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ยีสต์ที่เจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจนเรียกว่า ยีสต์ออกซิเดทีฟ (Oxidative Yeast) โดยเกิดเป็นฟิล์มที่ผิวหน้าของอาหารเหลวส่วนยีสต์ที่เจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน เจริญได้ทุกส่วนของอาหารจัดเป็นพวกเฟอร์เมนเตทีฟยีสต์ (Fermentative Yeast) (สาวิตรี, 2540)

2.3.6 นิเวศวิทยาของยีสต์

ยีสต์พบทั่วไปในธรรมชาติ และแพร่กระจายไปโดยอาศัยแมลง และกระแสลมยีสต์ส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์ (Saprophytism) อาศัยอยู่บนสารอินทรีย์ที่ตายแล้ว บางชนิดเป็นปรสิตอาศัยโฮสต์ ที่มีชีวิต และทำให้เกิดโรคแก่ คน และพืชได้ จากการสำรวจพบว่ายีสต์สามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมทุกชนิดทั้ง น้ำจืด น้ำเค็ม ปากอ่าว และพบมากที่สุดที่ชายฝั่งเนื่องจากมี 13 สารอาหารสะสมมาก อย่างไรก็ตามก็ยังพบยีสต์ในกลางมหาสมุทรที่มีความลึก 4000 เมตร ในทะเลดำ จำนวนยีสต์ที่มีมากที่ระดับ 1000 เมตรแรก ของระดับน้ำ แต่ยิ่งลึกลงไปก็จะพบยีสต์เพียงร้อยละ25 อาจเนื่องจากความเข้มข้นของออกซิเจนลดลง และมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนซัลไฟด์มากในทะเลสาบออนตาริโอพบยีสต์ได้ทั้งในน้ำ และในตะกอนดิน แต่ยีสต์จะแตกต่างกันตามความลึก(ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

2.3.7 การใช้ยีสต์ในทางอุตสาหกรรม (มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมธิราช, 2526)

(1) การใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิต เหล้า, เบียร์, ไวน์

(2) การใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์

(3) การใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิต ซีอิ้ว

(4) การใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิตการทำขนมปัง

(5) การใช้ยีสต์ในการผลิตอาหารเสริมของสัตว์จากน้ำเสียของโรงงานกระดาษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมัก

2.3.8.1.อาหาร

อาหารที่ยีสต์ใช้ได้ดีได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทส ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ไดแซ็กคาไรด์พวกมอลโทส ซูโคส หรือ แลกโทสได้ ส่วนพอลีแซ็กคาไรด์ที่ยีสต์บางชนิดใช้ได้ คือ แป้ง ยีสต์ที่สามารถใช้แป้งได้ เช่น *Saccharomyces diastaticus, S. chevalieri, Endomycopsis fibuligera* มียีสต์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถให้น้ำตาลเพนโทสได้ดีกว่าน้ำตาลเฮกโซส เช่น *Cryptococcus* ยีสต์บางพวก เช่น ฟิล์มยีสต์สามารถใช้กรดอินทรีย์ได้ ยีสต์มีกระบวนการไกลโคลไลติก 2 กระบวนการ คือ สภาพที่ไม่มีออกซิเจนยีสต์จะใช้กระบวนการเอมบ์เดน เมเยอร์ฮอฟพาร์นาส (EMP) ถึง 90 % (ใน *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida utilis*) ส่วนในสภาพมีออกซิเจนนอกจากกระบวนการเอมบ์เดนเมเยอร์ฮอฟพาร์นาสใน *Saccharomyces cerevisiae* จะใช้กระบวนการเฮกโซสมอนอฟอสเฟต 6-30 % และใน *C. utilis* 30-50% ในสภาพไม่มีออกซิเจนน้ำตาลจะเข้าสู่กระบวนการหมักได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อการหมักให้ได้เอทานอลนี้ไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในสภาพไม่มีออกซิเจนเท่านั้น อาจเกิดขึ้นได้เมื่อเลี้ยงยีสต์ในน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงแม้อยู่ในสภาพที่มีออกซิเจนทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลูโคสที่มีความเข้มข้นมากกว่า 5 % จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการหายใจ แต่ถ้าหากไม่มีน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเป็นการกระตุ้นหรือเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ในวัฏจักรเครบส์ นอกจากนี้การมีน้ำตาลยังยับยั้งการสร้างไมโทคอนเดรียอีกด้วย ในสภาพมีออกซิเจนและความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำๆ ยีสต์จะใช้น้ำตาลไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำหรือเกิดกระบวนการหายใจเช่นเดียวกับในพืชและสัตว์

2.3.8.2. อุณหภูมิ

ยีสต์แต่ละชนิดเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกมีโซไฟล์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์ยังสามารถเจริญเติบโตได้ประมาณ35-47องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้อยู่ระหว่าง 0-5 องศาเซลเซียส แต่ยีสต์บางชนิดที่เป็นพวกไซโครไฟล์สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เช่น *Candida frigida, C. gelida* และ *C. nivalis* มีอุณหภูมิต่ำสุดที่ (-5) - (-7) องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 15 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเติบโตที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส หรือจัดเป็นพวก ออบลิเกต ไซโครไฟล์ สำหรับยีสต์ที่เป็นเทอร์โมไฟล์หรือสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียสไม่พบ นอกจากอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตแล้ว ยังมีผลต่อการสร้างแอสโครสปอร์ของยีสต์อีกด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแอสโครสปอร์ของยีสต์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น *Saccharomyces cerevisiae* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส สูงสุดประมาณ 35 องศาเซลเซียส ต่ำสุด 11-12 องศาเซลเซียส *S. ellipsoideus* ต่ำสุด 4-7.5 เหมาะสม 25 สูงสุด 30-33 องศาเซลเซียส *S. intermedius* ต่ำสุด 0.5-4 เหมาะสม 25 สูงสุด 27-29 องศาเซลเซียส *S. pastorianus* ต่ำสุด 0.5-4 เหมาะสม 27.4 สูงสุด 29-31.5 องศาเซลเซียส *S. turbidans* ต่ำสุด 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสม 29 สูงสุด 33-35 องศาเซลเซียส *S. validus* ต่ำสุด 4.8-5.0 เหมาะสม 25 สูงสุด 27-29 องศาเซลเซียส ส่วนพวก *Schizosaccharomyces octosporus*, *S. tombe*, *Kluyveromyces sp.*สร้างแอสโคสปอร์ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.3.8.3. ออกซิเจน

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกเฟคัลเททีฟ แอนแอโรบ แต่ยีสต์เติบโตในสภาพมีออกซิเจนได้ดี ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนเติบโตได้ช้า ในสภาพมีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาล โดยการออกซิเดชันโดยสมบูรณ์ได้ คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจน ยีสต์ใช้น้ำตาล โดยการหมักส่วนใหญ่เป็นการให้ เอทานอล ในการหมักโดยยีสต์ให้ได้เอทานอลนั้น หากมีออกซิเจนยีสต์จะใช้น้ำตาลให้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แทนการหมักให้เอทานอล หรือการหมักถูกยับยั้งโดยการหายใจเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Pasteur effect" ยกเว้นในยีสต์บางชนิด ได้แก่ Brettanomycesซึ่งออกซิเจนช่วยกระตุ้นการหมัก (negative Pasteur effect) ในสภาพมีออกซิเจนแต่ถ้าหากมีน้ำตาลความเข้มสูง ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลให้เอทานอลแทนการหายใจให้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ หรือการหายใจถูกยับยั้งด้วยการหมัก(revese Pasteur efect","Grabtree effect") ยีสต์บางชนิดสามารถเติบโตได้เฉพาะในสภาพมีออกซิเจนไม่มีความสามารถในการหมัก (oxidative yeast) ยีสต์พวกนี้ได้แก่ *Rhodotorula, Sporobolomyces, Endomycopsis* เป็นต้น

2.3.8.4. ความเป็นกรด-เบส

ยีสต์เติบโตได้ใน pH ช่วงกว้าง pH ต่ำสุดที่ยีสต์สามารถเติบโตได้คือ 1.5 ส่วน pH สูงสุด 8.0-8.5 สำหรับ pH ที่เหมาะสม สำหรับการเติบโตของยีสต์แตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 4.0-4.5 ยีสต์ส่วนใหญ่จะเติบโตไม่ดีในสภาพที่เป็นด่าง นอกจาก pH มีผลต่อการเติบโตแล้วยังมีผลต่อการสร้างแอสโคสปอร์ของยีสต์อีกด้วย pH ในการสร้างสปอร์ของยีสต์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น *Saccharomyces cerevisiae* pH สูงสุด 9.1-9.2 pH ต่ำสุด 2.4-2.6 *Schzosaccharomyces pombe* pH สูงสุด 8.0-8.2 ต่ำสุด 4.0-4.3

2.3.9 ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis*

2.3.9.1 ลักษณะและความสำคัญ

Saccharomyces carlsbergensis หรือ *Saccharomyces pastorianus* คือ Bottom ยีสต์ เมื่อสิ้นสุดการหมักยีสต์เหล่านี้จะตกตะกอนและสะสมอยู่ที่ก้นถังหมัก ยีสต์นี้จะหมักน้ำตาลทำให้เกิดรสชาติที่ชัดเจนจะพบในเบียร์ประเภทลาเกอร์ *Saccharomyces carlsbergensis* เชื่อว่าเป็นลูกผสมของ *Saccharomyces bayanus* กับ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่ง *Saccharomyces cerevisiae* จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้สำหรับการผลิตเบียร์ที่มีรสหวานและเบียร์ผลไม้ จะเจริญที่อุณหภูมิระหว่าง 16°c และ 24°c ส่วน *Saccharomyces carlsbergensis* จะเจริญที่อุณหภูมิระหว่าง 6°c - 12°c

2.3.9.2 **โครงสร้างเซลล์ เมตาบอริซึมและวงจรชีวิต**

Saccharomyces carlsbergensis เป็นจุลินทรีย์ยูคาริโอต มีรูปร่างยาว มีลักษณะเป็นเส้นใย ยีสต์นี้มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการแตกหน่อโดยการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์หรือแบสิดิโอสปอร์ การตกตะกอนของ *Saccharomyces carlsbergensis* จะเป็นยีสต์ที่ก้นถังหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะยับยั้งตะกอน ค่าพีเอชอยู่เหนือจุดไอโซอิเล็กทริก เซลล์จะมีแคลเซียมร่วมอยู่และยังมีลักษณะของเซลล์เป็นอัลโลโพลีพลอย มีการเชื่อมกับโครโมโซมจากหลากหลายสายพันธุ์

Saccharomyces มาจากภาษาละติน 'เชื้อราน้ำตาล' เพราะใช้น้ำตาลในกระบวนการเมตาบอริซึมและกระบวนการสลายของน้ำตาล ที่มีความสำคัญในการอยู่รอดของยีสต์ และเกี่ยวข้องกับกลูโคสหรือมอลโทส ซึ่งแบ่งออกเป็นโมโนเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส โดยอาศัยเอนไซม์ในระหว่างกระบวนการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนและเซลล์จะสร้างพลังงานจากไกลโคไลซิสและวัฏจักรเครปเป็นวัฏจักรที่สร้าง ATP ให้กับผลิตภัณฑ์ ในกรณีที่ไม่มีออกซิเจน การกมักแบบไม่มีออกซิเจน คาร์บอนจะถูกดึงมาใช้ ในการใช้อากาศเซลล์จะผลิตคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์จากวัฏจักรเครป เมื่อการหมักแบบไม่มีออกซิเจนเกิดขึ้นจะเกิดความหลากหลายของโมเลกุล

Saccharomyces carlsbergensis เป็นยีสต์ที่ทนความเย็นกว่า *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำ ในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 5°c - 14°c ในระหว่างกระบวนการหมักจะทำให้ค่าpHลดลง มีการเพิ่มขึ้นของแอลกอฮอล์ และแหล่งอาหารคาร์บอนกับไนโตรเจนจะหมดลง ยีสต์นี้จะต้องการแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลในการเจริญเติบโต แหล่งน้ำตาลมักพบที่ผิวของผลไม้ หรือคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ความสัมพันธ์ทางชีวภาพอาจเป็นไปได้ว่ายีสต์หลาบสายพันธุ์อยู่ร่วมกันในสภาวะที่มีประโยชน์ร่วมกัน สายพันธุ์ของ *Saccharomyces carlsbergensis* จะหมักร่วมกันสายพันธุ์ที่เป็นท็อปยีสต์ได้ *Saccharomyces carlsbergensis* เป็นลูกผสมจากสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* นอกจากนี้ยังสันนิษฐานว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีการพัฒนาและมีการปรับตัวต่ออุณหภูมิที่เย็นของการหมักในระหว่างการผลิตเบียร์ การศึกษากลไกของการผสมพันธุ์จึงมีความสำคัญต่อกลุ่มวิทยาศาสตร์

ความสำคัญของ *Saccharomyces carlsbergensis* มาจากการทำให้สิ่งมีชีวิตเน่าเสียเป็นทั้งที่ไม่เป็นประโยชน์และเป็นประโยชน์ เช่นเมื่อไหร่ที่ไม่สามารถควบคุมความเครียดของยีสต์จะทำให้ผิวของผลไม้มีสีน้ำตาล เช่น องุ่น ซึ่งจะทำให้เกิดการเน่าเสีย เป็นอันตรายต่อผลทำให้เกิดการสุกก่อนเวลา อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมการควบคุม *Saccharomyces carlsbergensis* มีผล เพราะทำให้เกิดกระบวนการหมักที่นำไปสู่กับผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ในการหมักข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลีที่ทำให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบียร์ ในกระบวนการเมตาบอริซึมที่ไม่ใช้อากาศ ยีสต์จะสร้างเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์และเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของสภาพแวดล้อมโดยรอบ

2.3.10 ส่วนประกอบของสารสกัดจากยีสต์

สารสกัดจากยีสต์มีโปรตีนและกรดแอมิโน เป็นส่วนประกอบหลัก คือประมาณ ร้อยละ 50-75 ที่เหลือคือ คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 4-13 และมีลิพิด (lipid) น้อยมาก วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสารสกัดจากยีสต์ คือ เซลล์ยีสต์ สายพันธุ์ของยีสต์ที่นำเซลล์ยีสต์มาผลิตสารสกัด ได้แก่ Saccharomyces cerevisiae ซึ่งเป็นสายพันธุ์เดียวกับยีสต์ที่ใช้ผลิตขนมปัง หรือที่เรียกว่า baker yeast และผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ยังผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์ *Candida utilis* และ *Kluyveromyces marxianus* เป็นต้น

2.3.11 **การเพาะเลี้ยงแบบ batch culture**

เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบระบบปิด คือ เซลล์มีการเจริญในปริมาตรอาหารที่คงที่ซึ่งมีการเขย่าตลอดเวลาเพื่อให้ เซลล์เดี่ยวและกลุ่มเซลล์มีการกระจายสม่ำเสมอ และช่วยให้มี การแลกเปลี่ยนอากาศอย่างเพียงพอ ระหว่างที่อินคิวเบทนั้นจะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์จนถึงจุดสูงสุด (maximum yield) อย่างรวดเร็วในเวลาสั้น ๆ เมื่อถึงจุดนี้อาหารเริ่มขาดแคลนหรือมีปัจจัยอื่น ๆ เช่น การสะสม สารพิษเพิ่มขึ้น ทำให้การเจริญของเซลล์หยุดชะงัก ถ้าต้องการเลี้ยงเซลล์ให้เจริญต่อไปจะต้อง ทำการย้ายไปยังอาหารใหม่ เซลล์จึงเริ่มรูปแบบการเจริญซ้ำเหมือนเดิมอีก

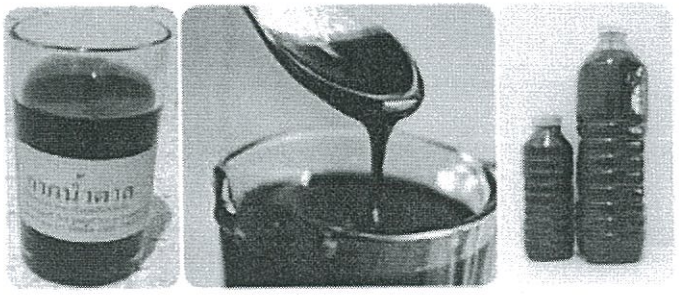
shake culture เครื่องเขย่าที่ใช้ในเชคคัลเจอร์เป็นแบบออบิทัลแพลทฟอร์มเชคเกอร์ (orbital platform shaker) ซึ่งมีการหมุนเขย่าเป็นวงกลม ในการเลี้ยงเซลล์ของยาสูบ ลักษณะเครื่องเขย่าแบบนี้มีแพลทฟอร์มเป็นแผ่น ซึ่งมีคลิปหลายขนาด เพื่อจับยึดฟลาสก์ขนาดต่าง ๆ มีปุ่มเร่งความเร็วที่สามารถเขย่าได้ในช่วง 60 -80 รอบต่อนาที นิยมใช้ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของพืชจำนวนมาก

2.4 กากน้ำตาล

กากน้ำตาล (Molasses) เป็นของเหลวสีดำที่เหนียวข้น (ภาพที่ 2.4) ซึ่งไม่สามารถจะตกผลึกน้ำตาลได้อีก เป็นเนื้อของสิ่งที่ไม่ใช่น้ำตาลที่ละลายปนอยู่ในน้ำอ้อย ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ท และสารเคมี เช่น ปูนขาว ซึ่งใช้ในการตกตะกอนให้น้ำอ้อยใสส่วนประกอบของกากน้ำตาลจะไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับพันธุ์อ้อย และกรรมวิธีการผลิต แต่ส่วนมากพบว่าส่วนประกอบส่วนใหญ่คือ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ท และน้ำ ปัจจุบันนี้ โรงงานน้ำตาลที่ทันสมัย มีความสามารถในการสกัดน้ำตาลออกจากกากน้ำตาลได้มากขึ้นแต่ก็ยังมีหลงเหลืออยู่ เพราะการสกัดออกทั้งหมดจะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีน้ำตาลซูโครสบางส่วนที่สูญเสียไปกับกากน้ำตาล ซึ่งเป็นการสูญเสียค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการสูญเสียแบบอื่น (นฤมล, 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 2.4 กากน้ำตาล(Molasses)

ที่มา: นฤมล (2549)

กากน้ำตาล มี 3 ชนิด ได้แก่ (ปริษฎางค์, 2547)

1. Blackstrap molasses หรือ Final molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาล ร้อยละ 50-60 การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจะใช้น้ำตาลประเภทนี้เป็นวัตถุดิบ
2. Refinery molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวมีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 48
3. Highest molasses หรือ Invert molasses คือกากน้ำตาลที่ไม่ใช่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล แต่ได้จากการนำบางส่วนของน้ำอ้อยไปแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหยซึ่งมีปริมาณน้ำตาล ร้อยละ 77

โดยกากน้ำตาลมีส่วนประกอบ ดังมีรายละเอียดในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบของกากน้ำตาล

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

ที่มา: กนกวรรณ (2547)

2.4.1 การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

148854

1. การใช้กากน้ำตาล เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยงแบคทีเรีย (Keller, 1967)

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

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

4. การใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งวิตามิน บี จำนวนมากมาใช้หรือผลิตเป็นอาหารสัตว์ (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2510)

5. การเพาะเลี้ยงสาหร่าย สไปรูลินาพลาเทนซิส ซีเอม็ ยู 2 ด้วยน้ำกากส่าเหล้า (กากน้ำตาล) ในระบบบ่อเพาะเลี้ยงน้ำวน (ปาวลี, 2550)

2.5 การกดดันยีสต์

จุลินทรีย์จะมีการปรับตัว(Adaptation) ทั้งทางกายภาพและทางยีนเมื่ออยู่ในสภาวะกดดัน เช่น osmotic stress, oxidative stress, temperature stress, การกดกดันด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ซึ่งกลไกทางสรีรวิทยาจะสามารถช่วยให้จุลินทรีย์ทนกับความเครียดได้

JimenezและBenitez ศึกษาการปรับสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ยีสต์โดยการกดดันด้วยเอทานอล พบว่า Saccharomyces spp. มีอัตราส่วนของไขมันและโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีเอทานอลและการเพิ่มขึ้นของพีเอช ทำให้เพิ่ม passive diffusion ของ proton ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

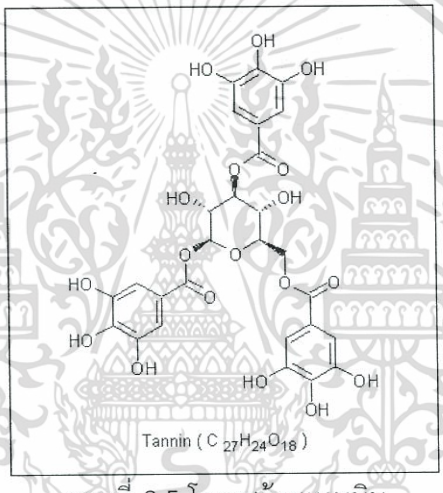
Apse(1999) ศึกษาการใช้สภาวะเครียดโดยใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์(Nacl)และความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก Hydrogen peroxide ทำให้เกิด hyperosmotic เซลล์ยีสต์จะมีกลไลกำจัด Na^+ และ Cl^- ออก

2.6 แทนนิน

แทนนิน (tannin) เป็นสารทีมีโมเลกุลใหญ่และสูตรโครงสร้างทีซับซ้อน เป็นกรดอ่อน มีรสฝาด จึงเป็นสารให้ความฝาดในพืช พบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น เปลือก ใบ ผล แก่นไม้ และส่วนทีปูดออกมาจากส่วนนั้น เมื่อต้นไม้ได้รับอันตราย เป็นต้น แทนนิน มี 2 ชนิด คือ ไฮโดรไลซ์แทนนิน (hydrolysable tannins) ซึ่งเป็นกลูโคสิดิก - ไกลโคไซด์ของโพลิแกลลอย์ไกลโคไซด์(ขวัญใจ, 2535) มีโครงสร้างประกอบด้วย2 ส่วนใหญ่ ๆ คือน้ำตาลและกรดฟีนอลิก(ประกร, 2553) และเมื่อไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนินละลายในกรดหรือน้ำย่อย จะได้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง ได้แก่ กรดแกลลิก กรดเอลลาจิก และกลูโคส (อัญมณี,2540) พบมากในส่วนใบ ฝัก และส่วนทีปูดออกมาจากปกติเมื่อต้นไม้ได้รับอันตราย และคอนเดนส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แทนนิน (condensed tannins) เป็นสารทีมีโมเลกุลใหญ่ และซับซ้อนมากกว่าไฮโดรไลซ์เซเบิลแทนนิ น คอนเดนส์แทนนิน เป็นพอลิเมอร์ของฟลาโวนอยด์ที่เกิดจากการรวมตัวของพวก Flavan-3-ol (ขวัญใจ, 2535)ไม่สามารถไฮโดรไลซ์ด้วยกรดหรือด่าง แต่ละลายได้ดีในน้ำร้อน แอลกอฮอล์ และอะซีโตน พบได้ในส่วนเปลือกต้น และแก่นไม้เป็นส่วนใหญ่ แทนนินมีคุณสมบัติตกตะกอนโปรตีน ทำให้หนังสัตว์ไม่เน่าเปื่อย จึงมีการใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง และแทนนินมีฤทธิฝาดสมานจึงใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม เช่น รักษาอาการพุพอง อาการท้องเสีย มีฤทธิ์เป็นยา ต้านไวรัส เป็นต้น นอกจากนี้แทนนินยังนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เช่น การย้อมผ้า บำบัดน้ำเสีย กาว ปุ๋ย ธุรกิจปลาสวยงาม ผลิตเครื่องสำอาง น้ำหมึก หมึกพิมพ์ สีย้อมผ้าต่าง ๆ กาวในอุตสาหกรรมไม้อัด ใช้เป็นสารเสริมรสชาติอาหารในการผลิตไวน์ เบียร์ สาเก ชา กาแฟ และ น้ำผลไม้ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารเคลือบอาหาร ได้แก่ เนื้อสัตว์ โดยผสมกับเจลาตินหรือโปรตีนจากนมทำให้เก็บรักษาอาหารได้นานยิ่งขึ้น แทนนินมีโครงสร้างดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างแทนนิน

ที่มา: http://www.vcharkarn.com/vcafe/42064

2.6.1 ประโยชน์แทนนิน

1. ใช้สำหรับเป็นสารฟอกหนังสัตว์ ทำให้โปรตีนตกตะกอน ทำให้หนังสัตว์อ่อนนุ่ม ช่วยเคลือบติดหนังสัตว์ทำให้ไม่เน่าเปื่อย ป้องกันเชื้อจุลินทรีย์

2. ใช้เป็นส่วนผสมของยาภายใน และภายนอก อาทิ ยารักษาโรคเบาหวานเพื่อช่วยควบคุมสมดุลการหลั่งฮอร์โมนจากตับอ่อน รวมถึงใช้เป็นส่วนผสมในยาถ่ายพยาธิ ยาแก้ท้องเสีย ท้องเดิน ส่วนยาใช้ภายนอกมักใช้เป็นส่วนผสมของยารักษา และสมานแผลช่วยให้เส้นเลือดหดตัว ป้องกันการสูญเสียน้ำของแผล โดยเฉพาะแผลที่โดนไฟไหม้ น้ำร้อนลวกจะช่วยให้แผลหายได้เร็ว

3. ใช้ผสมยาลดกรดเพื่อแต่งรส รวมถึงมีฤทธิ์ช่วยลดกรดได้ด้วย

4. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม อาทิ เบียร์ ไวน์ ชา และกาแฟ เพื่อให้มีสีใส และมีรสขม ฝาด การป้องกันการเหม็นหืน การป้องกัน และต้านเชื้อแบคทีเรียในอาหาร ป้องกันการเน่าเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริม ช่วยต้านอนุมูลอิสระ และลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด

6. ใช้เคลือบยา อาหารหรืออาหารเสริมในรูปของส่วนผสมหรือแคปซูลสำหรับป้องการย่อยตัวยาบริเวณกระเพาะอาหารเพื่อให้ถูกดูดกลืนบริเวณลำไส้มากที่สุด

7. ใช้แทนนินเป็นสารจับกับโปรตีน และไอออนของโลหะในกระบวนการผลิตอาหาร เครื่องดื่มเพื่อกำจัดกลิ่น รสที่ไม่ต้องการ และตกตะกอนโลหะที่เจือปน

8. ใช้สำหรับผลิตกาวไม้อัด เช่น การใช้โปรแอนโทรไซยานิดินแทนนินแทนสารฟีนอลสังเคราะห์ในการผลิตไม้อัด

9. ใช้แทนนินจับกับเกลือของเหล็ก ได้สารประกอบสีน้ำเงินสำหรับผลิตเป็นหมึกพิมพ์ สี และสีย้อม

10. ใช้แทนนินทำปฏิกิริยากับเจลาตินสำหรับใช้เคลือบอาหารบางชนิด เช่น เนื้อสัตว์ เพื่อยืดอายุการเก็บให้นานขึ้น

11. ใช้สำหรับการย้อมแห อวน เชือก เพื่อให้เกิดสีเหลืองหรือน้ำตาล และทำให้มีความทนทานต่อสภาพความเป็นกรด และการผุพัง

2.6.2 การสกัดแทนนิน

1. การใช้น้ำ และแอลกอฮอล์หรือตัวทำละลายอื่นๆ
2. การสกัดด้วยวิธีสมัยใหม่
   - 2.1 Supercitrical fluid extraction
   - 2.2 Vortical extraction
   - 2.3 extraction by electrical energy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

Saccharomyces carlbergensis RU01

Molass

จามจุรี

3.1.2 สารเคมี

Yeast extract, Scharlua, Spain

Malt extract, Himedia, India

Peptone, Himedia, India

Dextrose, Pure Chem, Taiwan

Agar, Himedia, India

Ammonium sulfate, RIEDEL-DE-HAEN AG SEELZE-HANNOVER, Germany

Tannic acid

Sodium hydroxide, Malinckrodt, Sweden

3,5-Dinitrosalicylic acid, Acros, USA

Potassium tartrate, CARLO ERBA REAGENTS, Italy

Phenol, CARLO ERBA REAGENTS, Italy

Sulfuric Acid, CARLO ERBA REAGENTS, Italy

Methylene blue

Distilled water

3.2 อุปกรณ์

Shaker

Microscope, Nikon, ECLIPSE E200, Japan

Hemocytometer, Boeco, Germany

UV-VIS Spectrophotometer, Thermo scientific, Genesys20, USA

Centrifuge, Hettich zentrifugen, Rotofix32A, Germany

Magnetic stirrer, Combination

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องชั่งละเอียด, Sartorius, Germany

Autoclave, Tomy, ES-315, Japan

Micropipette

Centrifuge tube 1.5 ml

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces calbergensis* RU01

ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 สายพันธุ์ที่ถูกพัฒนาให้สามารถหมักเอทานอลในสภาวะที่มีความเข้มข้นแทนนินได้ โดยเขี่ยเชื้อ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ลงใน flask ในอาหารเหลว Yeast extract malt extract (YM) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

3.3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01

3.3.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลในอาหาร

นำยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเป็น 1,2,3,4,5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นแบบไม่ใส่แหล่งไนโตร และ ใส่แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1เปอร์เซ็นต์ ในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใส่เชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.3.1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์พร้อมทั้งวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) ทุกๆ 2 ชั่วโมงจนครบ8 ชั่วโมง และหลังจากนั้นเก็บผลทุกๆ 4 ชั่วโมงจนครบ 36 ชั่วโมง คัดเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารที่ทำให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3.2.2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหาร

นำยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้คัดเลือกจากข้อ 3.3.2.1 ปรับปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารโดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05,0.1และ0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยใส่เชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.3.1 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์พร้อมทั้งวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) เก็บผลทุกๆ 4 ชั่วโมงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนครบ 36 ชั่วโมง คัดเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารที่ทำให้ได้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3.3 หาปริมาณแทนนินที่สามารถกระตุ้นบีตากลูแคนในยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้คัดเลือกจากข้อ 3.3.2.1 ปริมาณไนโตรเจนในอาหารที่ได้คัดเลือกจากข้อ 3.3.2.2 และปรับปริมาณแทนนิน 0,0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) ทุกๆ 2 ชั่วโมงจนครบ8 ชั่วโมง และหลังจากนั้นเก็บผลทุกๆ 4 ชั่วโมงจนครบ 36 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างเซลล์มาสกัดบีตากลูแคนด้วยวิธี Hot water และวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนในรูปของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid

3.3.4 การสกัดบีตากลูแคน

1. นำน้ำหมักที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อครบ36 ชั่วโมงแล้วมาหมุนเหวี่ยงโดยใช้เครื่อง centrifuge เพื่อแยกส่วนของตะกอนและส่วนใสออกจากกัน

2. ทำการล้างตะกอนเซลล์ 2 รอบ โดยใช้สารละลายเกลือ 0.9เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และปิเปตน้ำกลั่นลงในตะกอนที่ล้างแล้ว 1 มิลลิลิตรแล้วทำการชะตะกอนเซลล์ออกให้หมดเทใส่หลอดทดลองแก้ว

3. นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาให้ความร้อนด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้อุณหภูมิเย็นลงจนกระทั่งถึงอุณหภูมิห้อง vortexให้เข้ากันเพื่อรอทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid ต่อไป

3.3.5 การวิเคราะห์บีตากลูแคน

3.3.5.1 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

1. นำน้ำหมักที่แยกเซลล์ยีสต์ออกไปแล้ว 0.5 มิลลิลิตร โดยเจือจางตัวอย่างให้เหมาะสม

2. เติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. ปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้ว นำไปให้ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที

4. ทำให้เย็นโดยการแช่ในน้ำเย็น

5. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาว 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานและคำนวณหาปริมาตรน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

3.3.5.2 ดูลักษณะเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 หลังการเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมงโดยย้อมเซลล์ยีสต์ด้วย Congo red

1. นำน้ำหมักที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อครบ36 ชั่วโมงแล้วมาหมุนเหวี่ยงโดยใช้เครื่อง centrifuge เพื่อแยกส่วนของตะกอนและส่วนใสออกจากกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ทำการล้างตะกอนเซลล์ 2 รอบ โดยใช้สารละลายเกลือ 0.9เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3. ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง

4. เตรียมรอย smear และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน

5. หยดสี Congo red ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 15 นาที

6. เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งให้แห้ง

7. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100x โดยหยดน้ำมันก่อน ส่วนประกอบของโครงสร้างยีสต์ที่เป็นคาร์โบไฮเดรตจะติดสีแดงของCongo red

3.5.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

1. นำตะกอนเซลล์ที่ผ่านการสกัดแล้วจากข้อ 3.3.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

2. ดึงตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเติมสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ Phenolปริมาตร 1มิลลิลิตร

3. เติม Conc. Sulfuric Acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตรทันที

4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

5. vortex ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที

6. วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานและคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่าง

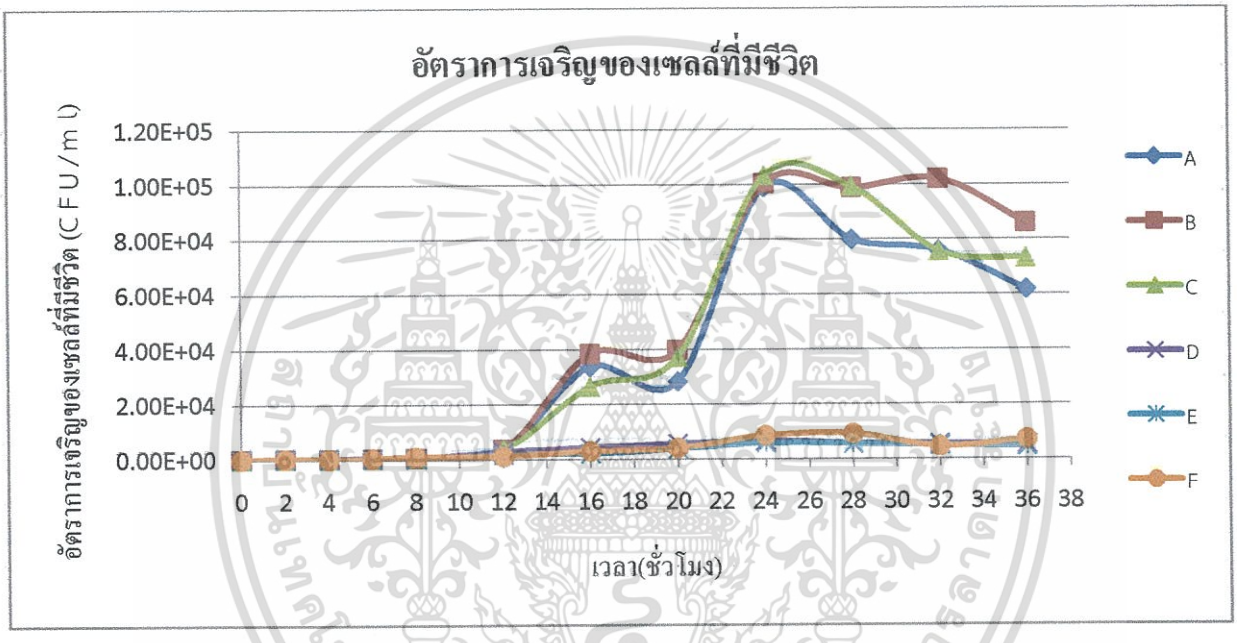
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *Saccharomyces carbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

4.1.1 ผลอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *Saccharomyces carbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ

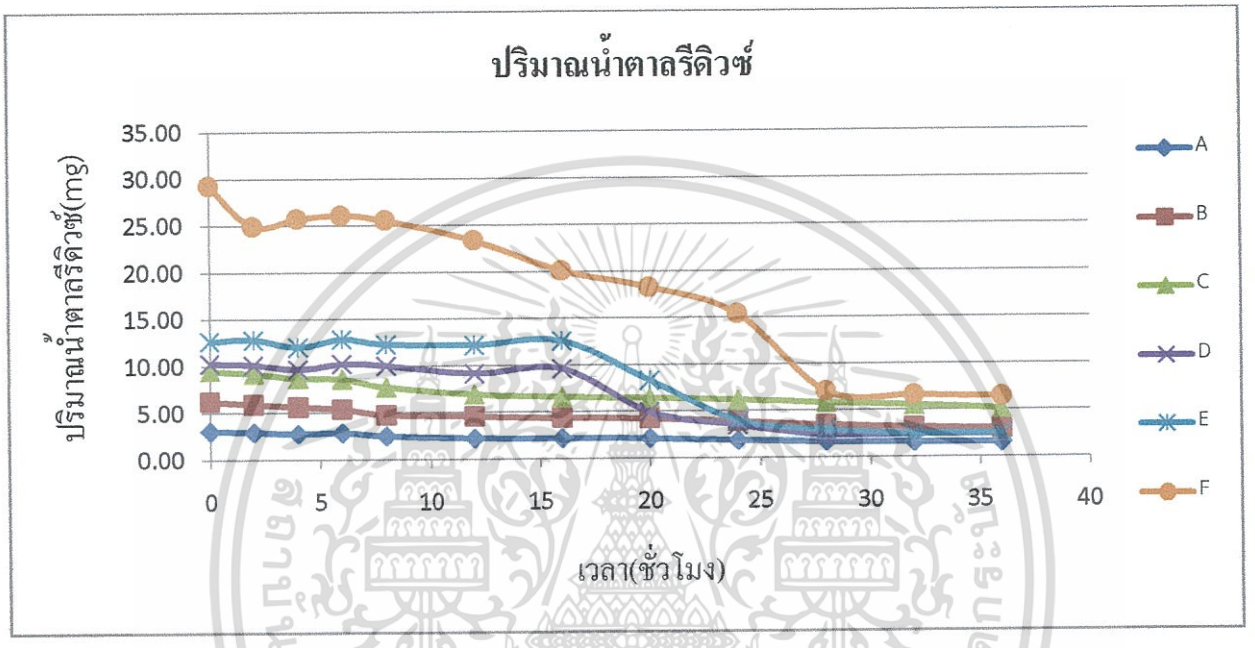


ภาพที่ 4.1 อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้นดังนี้ คือ A = molass 1%, B = molass 2%, C = molass 3%, D = molass4%, E = molass 5% และ F = molass 10%

จากภาพที่ 4.1 แสดงถึงอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้น1,2,3,4,5และ10% เมื่อนำแต่ละความเข้มข้นของกากน้ำตาลมาเปรียบเทียบกัน จากการทดลองพบว่า ที่ชั่วโมงที่ 36 ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2% ยีสต์อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด คือ 8.60 $\times 10^4$ CFU/ml และเมื่อผ่านชั่วโมงที่ 24 ไปแล้ว ยีสต์เริ่มมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เริ่มหมดและเกิดการสะสมของเสีย จึงทำให้ปริมาณเซลล์ยีสต์ลดลงที่ชั่วโมงที่ 28 และเริ่มคงที่ จากภาพความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ 1,2และ3 % ยีสต์มีอัตราการเจริญของเซลล์สูงกว่าอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตของความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่4,5และ10% เนื่องจาก ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาลสูงๆ จะเกิดความดันออสโมติก(osmotic pressure) คือแรงดันที่เกิดขึ้นเพื่อต้านการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายที่ผ่านเยื่อบางๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

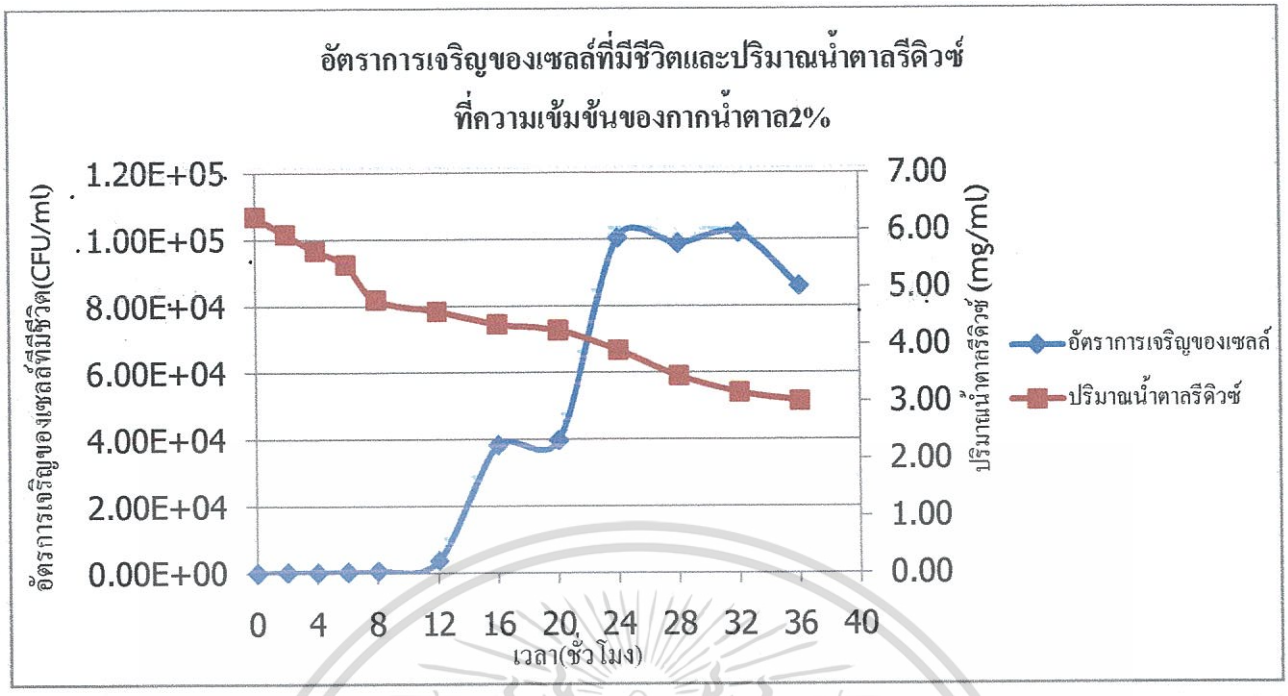
เช่นเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นหากความเข้มข้นของกากน้ำตาลสูงเกินไป จะทำให้เกิดลักษณะ hypertonic solution สารละลายที่มีความเข้มข้นมากกว่าความเข้มข้นภายในเซลล์ ทำให้เซลล์น้ำออสโมซิสออกนอกเซลล์ เซลล์จะเหี่ยว และ หากมีออกซิเจนยีสต์จะใช้น้ำตาลให้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แทนการหมักให้เอทานอล หรือการหมักถูกยับยั้งโดยการหายใจเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “Pasteur effect” ทำให้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลสูงๆ มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตที่น้อยกว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่ำๆ



ภาพที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ วิเคราะห์โดยวิธีDinitrosalicylic acid (DNS) เปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้นดังนี้ คือ A = molass1%, B = molass 2%, C = molass3%, D = molass4%, E = molass5% และ F = molass10%

จากภาพที่ 4.2 แสดงถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้น1,2,3,4,5และ10% จากการทดลองพบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงเหมือนกันในทุกๆความเข้มข้นของกากน้ำตาล เนื่องจากจุลินทรีย์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ โดยส่วนมากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่24 เนื่องจากเป็นช่วงที่ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

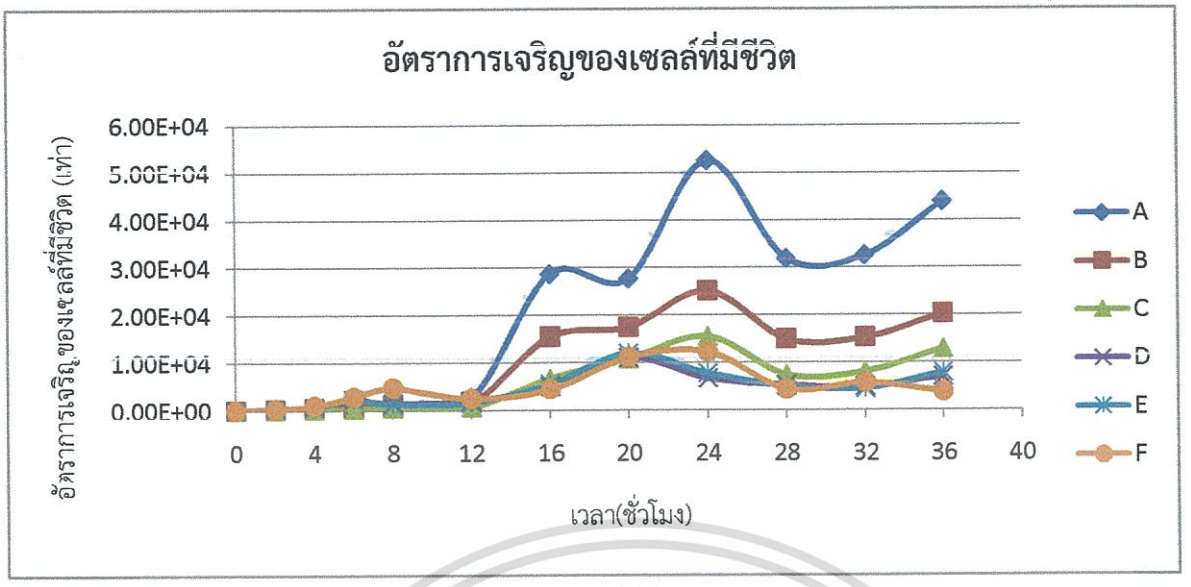


ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2%

จากภาพที่ 4.3 แสดงถึงอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2% จากการทดลองพบว่าที่ชั่วโมงที่ 36 ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 2% ยีสต์มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด คือ 8.60×10^4 CFU/ml และเมื่อผ่านชั่วโมงที่ 24 ไปแล้ว ยีสต์เริ่มมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์เริ่มหมดและเกิดการสะสมของเสีย จึงทำให้ปริมาณเซลล์ยีสต์ลดลงที่ชั่วโมงที่ 28 และเริ่มคงที่ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงค่อนข้างคงที่ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นคือ 6.24มิลลิกรัม เมื่อเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 3.01 มิลลิกรัม เนื่องจากจุลินทรีย์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ

4.1.2 ผลอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *Saccharomyces carbergensis* RU01 โดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่างๆ และมีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%

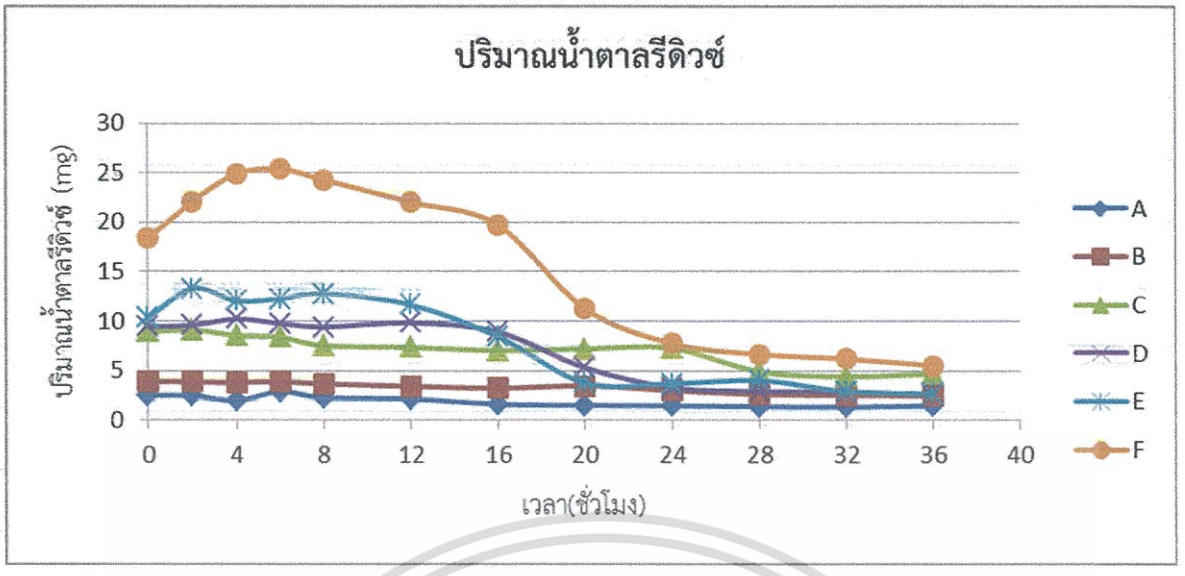
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นดังนี้ A = molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, B = molass 2%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, C = molass 3%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% , D = molass 4%+$(NH_4)_2SO_4$0.1% , E = molass 5%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% และ F = molass 10%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%

จากภาพที่4.4 แสดงถึงอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้น 1,2,3,4,5และ10% โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% เมื่อนำแต่ละความเข้มข้นของกากน้ำตาลมาเปรียบเทียบกัน จากการทดลองพบว่าที่ชั่วโมงที่ 36 ความเข้มข้นของกราฟ A คือ molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% ยีสต์มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด คือ 4.40×10^4 CFU/ml

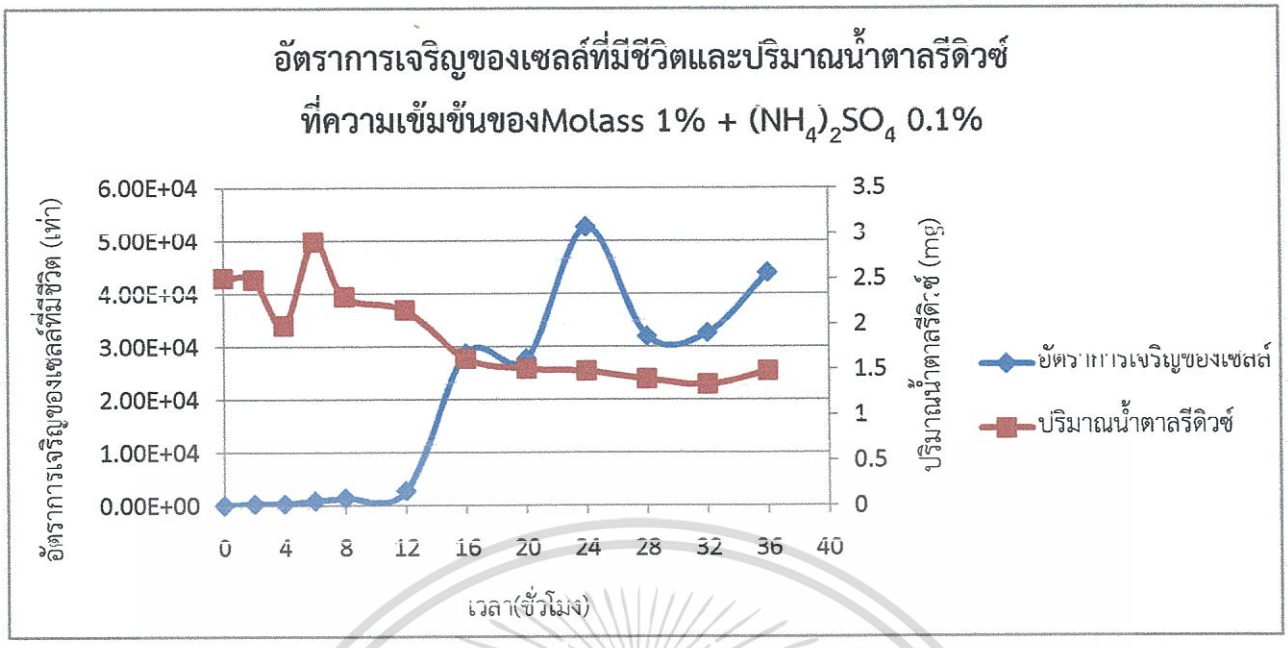
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีDinitrosalicylic acid (DNS) เปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นดังนี้ A = molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, B = molass 2%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% , C = molass 3%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, D = molass 4%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, E = molass 5%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%และ F = molass 10%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%

จากภาพที่ 4.5 แสดงถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้น1,2,3,4,5และ10% โดยมีแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% จากการทดลองพบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงเหมือนกันในทุกๆความเข้มข้นของกากน้ำตาล เนื่องจากจุลินทรีย์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ โดยส่วนมากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่24 เนื่องจากเป็นช่วงที่ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

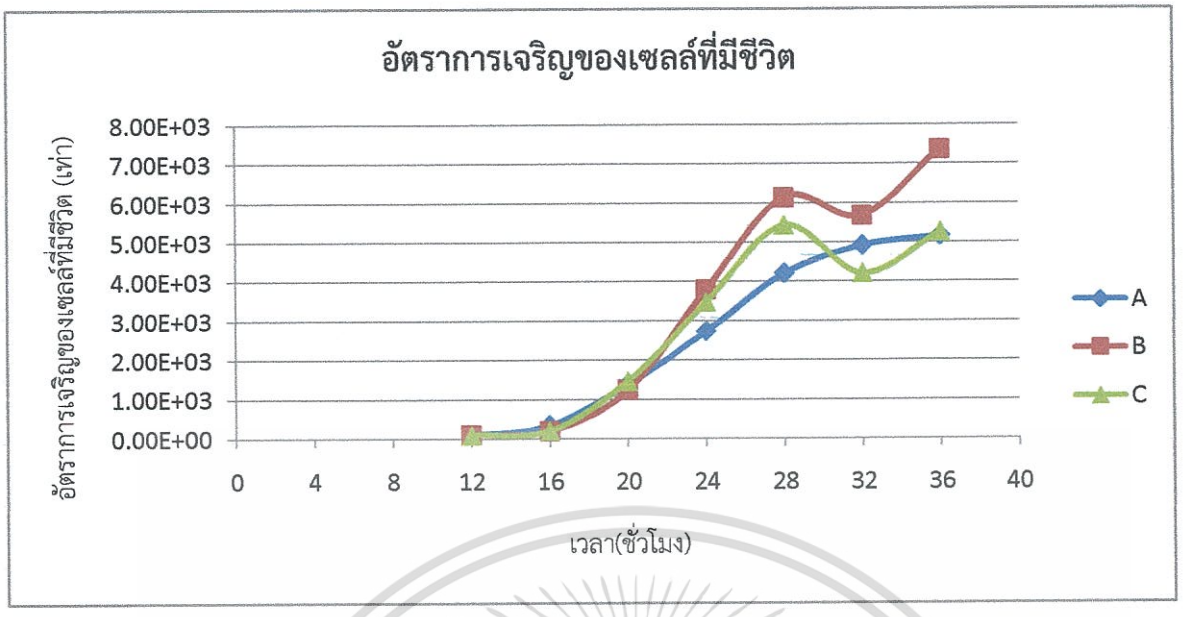


ภาพที่ 4.6 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1 %และ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%

จากภาพที่ 4.6 แสดงถึงอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% โดยมีแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1จากการทดลองพบว่าที่ชั่วโมงที่ 36 ความเข้มข้นของกราฟ A คือ molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% ยีสต์มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด คือ 4.40×10^4 CFU/ml และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงและค่อนข้างคงที่เมื่อผ่านไป 16 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นคือ 2.45 มิลลิกรัม เมื่อเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 1.45 มิลลิกรัม เนื่องจากจุลินทรีย์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ

4.1.3 ผลอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *Saccharomyces carbergensis* RU01 โดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.05,0.1 และ 0.2%

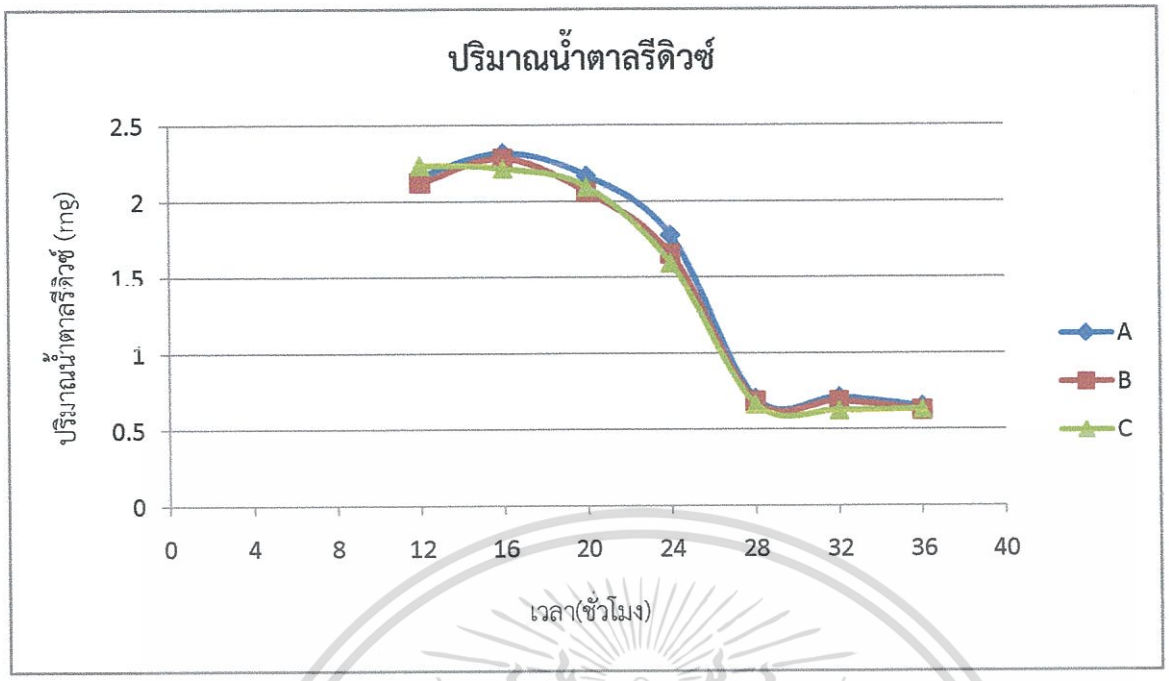
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นดังนี้ A = molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.05% , B = molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% และ C = molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%

จากภาพที่ 4.7 แสดงถึงอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) เข้มข้น 1% โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.05,0.1และ0.2% โดยเริ่มเก็บผลตั้งแต่ชั่วโมงที่12 ถึง 36 จากการทดลองพบว่าที่ชั่วโมงที่ 28 กราฟ B คือ molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% ยีสต์มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด คือ 7.37×10^3 CFU/ml แสดงให้เห็นว่า การใส่ $(NH_4)_2SO_4$ ในอาหาร 0.2% ทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตน้อยกว่า การใส่ $(NH_4)_2SO_4$ ในอาหาร 0.1% อาจเนื่องมาจาก $(NH_4)_2SO_4$ มีคุณสมบัติเป็นกรด ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเปลี่ยน ไม่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์

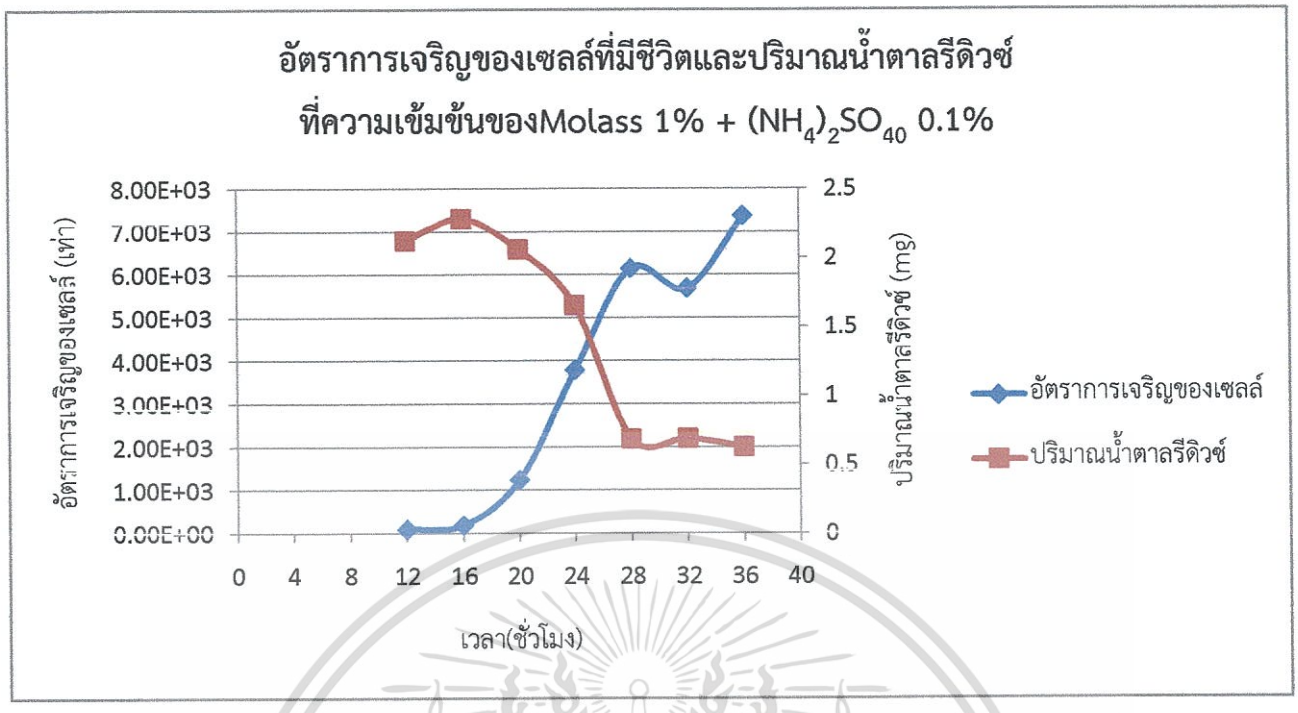
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีDinitrosalicylic acid (DNS) เปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นดังนี้ A = molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.05% , B = molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% และ C= molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%

จากภาพที่ 4.8 แสดงถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) เข้มข้น 1% โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.05,0.1และ 0.2% โดยเริ่มเก็บผลตั้งแต่ชั่วโมงที่12 ถึง 36 จากการทดลองพบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากจุลินทรีย์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่28 เนื่องจากเป็นช่วงที่ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

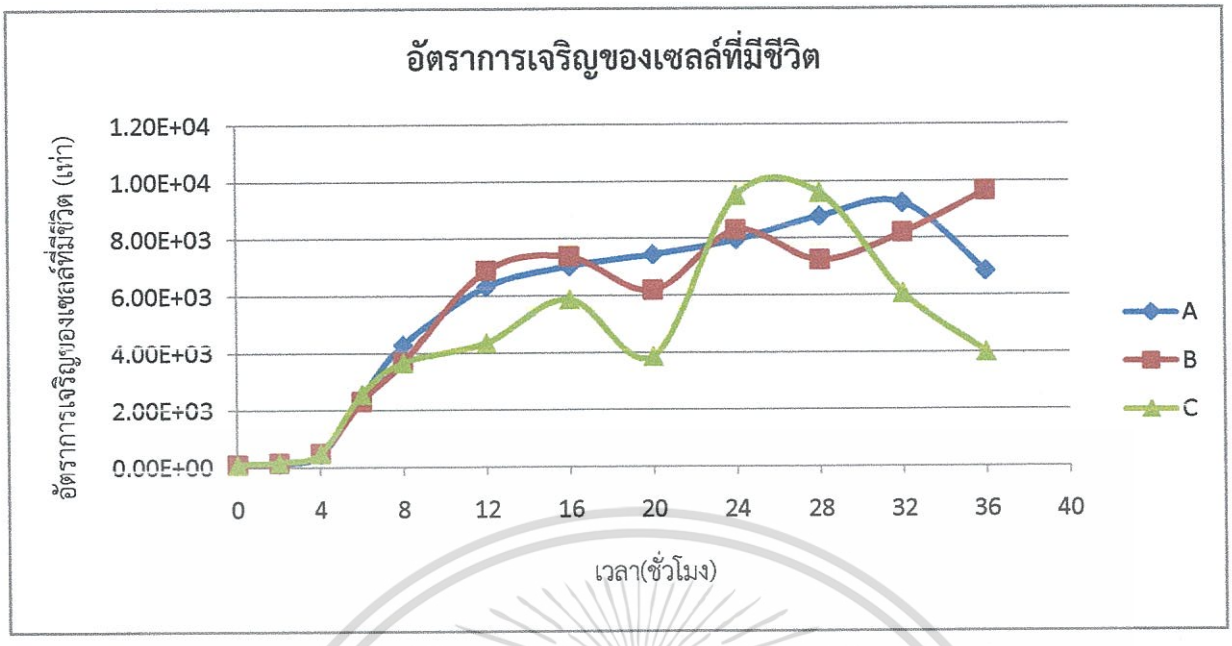


ภาพที่ 4.9 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1 %และ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1%

จากภาพที่ 4.9 แสดงถึงอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% โดยมีแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% จากการทดลองพบว่าที่ชั่วโมงที่ 36 ยีสต์มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด คือ 7.37×10^3 CFU/ml แสดงให้เห็นว่า การใส่ $(NH_4)_2SO_4$ ในอาหาร 0.2% ทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตน้อยกว่า การใส่ $(NH_4)_2SO_4$ ในอาหาร 0.1% อาจเนื่องมาจาก $(NH_4)_2SO_4$ มีคุณสมบัติเป็นกรด ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเปลี่ยน ไม่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากจุลินทรีย์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 28 เนื่องจากเป็นช่วงที่ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงที่สุด

4.1.4 ผลอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์ *Saccharomyces carbergensis* RU01 โดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% และ กดดันยีสต์ด้วย Tannic acid ความเข้มข้น 0,0.05และ0.1%

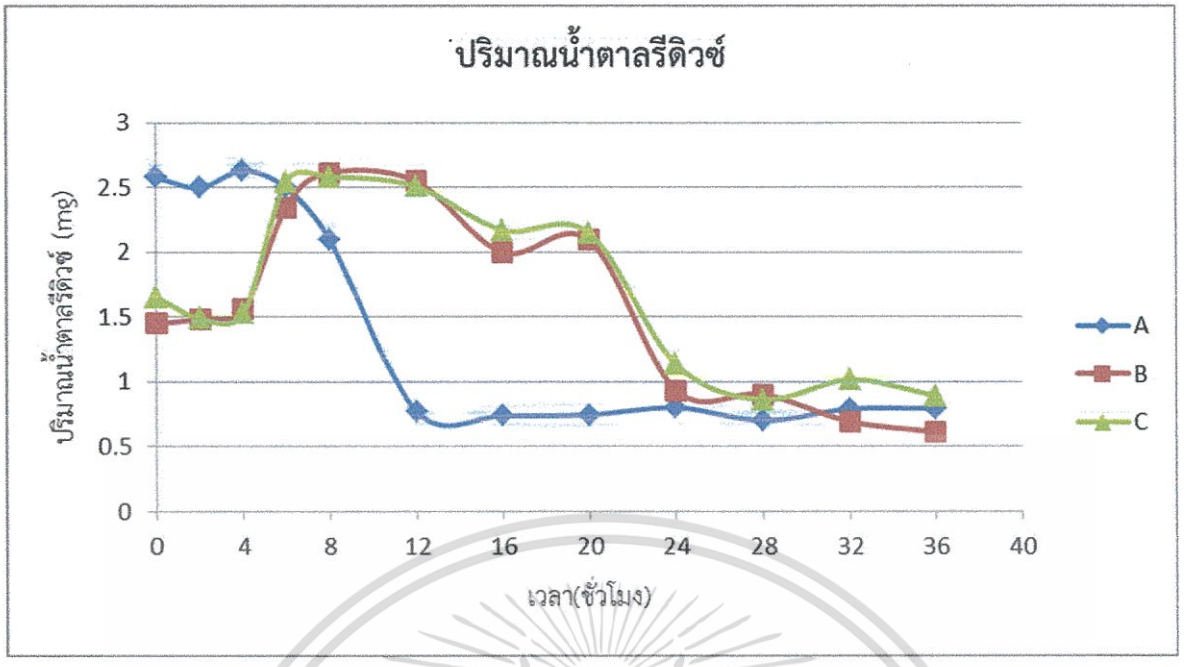
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นดังนี้ A = molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0% , B = molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.05% และ C= molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.1%

จากภาพที่ 4.10 แสดงถึงอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% และ กดดันยีสต์ด้วย Tannic acid ความเข้มข้น 0,0.05และ0.1% จากการทดลอง กราฟ A molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0% ที่เป็นกราฟควบคุมที่มีลักษณะกราฟ ที่มีอัตราการเจริญแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นปกติ และ ลดลงที่ชั่วโมงที่ 32 กราฟ B และ C มีการใส่สารเคมี คือ Tannic acid ซึ่งกราฟ B คือ molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.05% และ กราฟ C คือ molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.1% พบว่ากราฟB มีลักษณะอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตเพิ่มสูงขึ้นต่อได้อีกเมื่อครบ 36 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกราฟ C ที่มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่ากราฟB ที่ชั่วโมงที่ 24 แต่เมื่อผ่านไป 28 ชั่วโมง พบว่า กราฟมีอัตราการเจริญที่ลดลง การใส่ Tannic acid ทำให้ยีสต์เกิดการปรับตัว(adaptation)ทำให้ยีสต์มีความทนทาน (tolerance)มากขึ้น เนื่องจากยีสต์มีการรบกวนจากสารเคมี คือ Tannic acid การนำ Tannic acid มาใช้กระตุ้นยีสต์นั้นเพราะเป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลที่พบได้ในพืช และสามารถยับยั้งเชื้อไม่ให้เจริญได้ จึงใช้นำมาสร้างสภาวะกดดันกับยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01ที่ถูกพัฒนาให้ทนแทนนินจากน้ำจามจุรีได้

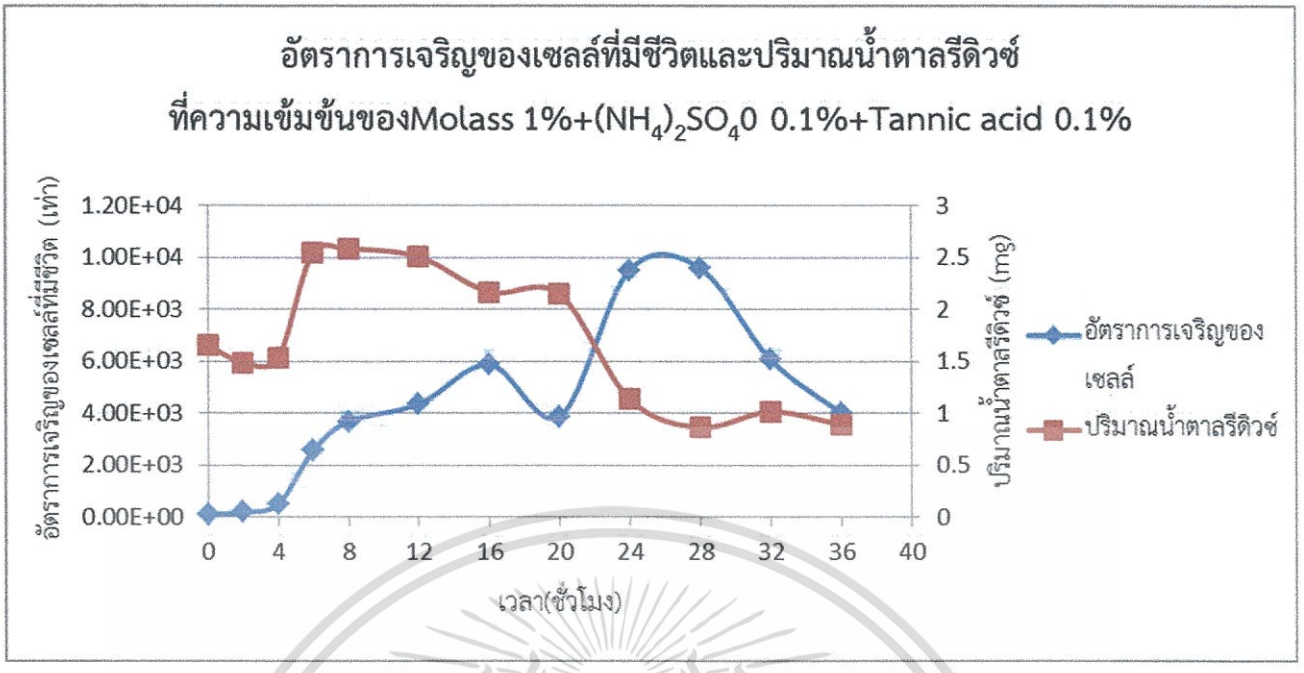
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีDinitrosalicylic acid (DNS) เปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นดังนี้ ดังนี้ A = molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0% , B = molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.05% และ C= molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.1%

จากภาพที่ 4.11 แสดงถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% และ กดดันยีสต์ด้วย Tannic acid ความเข้มข้น 0,0.05และ0.1% จากการทดลองพบว่า กราฟ A molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0% ที่เป็นกราฟควบคุม เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากจุลินทรีย์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่8 และค่อนข้างคงที่ แต่กราฟ B และ C มีการใส่สารเคมี คือ Tannic acid ซึ่งทำให้ยีสต์เกิดการปรับตัว(adaptation) ทำให้ยีสต์มีความทนทาน(tolerance)มากขึ้น ยีสต์เกิดการปรับสภาพ(adaptation) จึงมีการใช้น้ำตาลที่ช้า มีการเริ่มใช้น้ำตาลในชั่วโมงที่ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



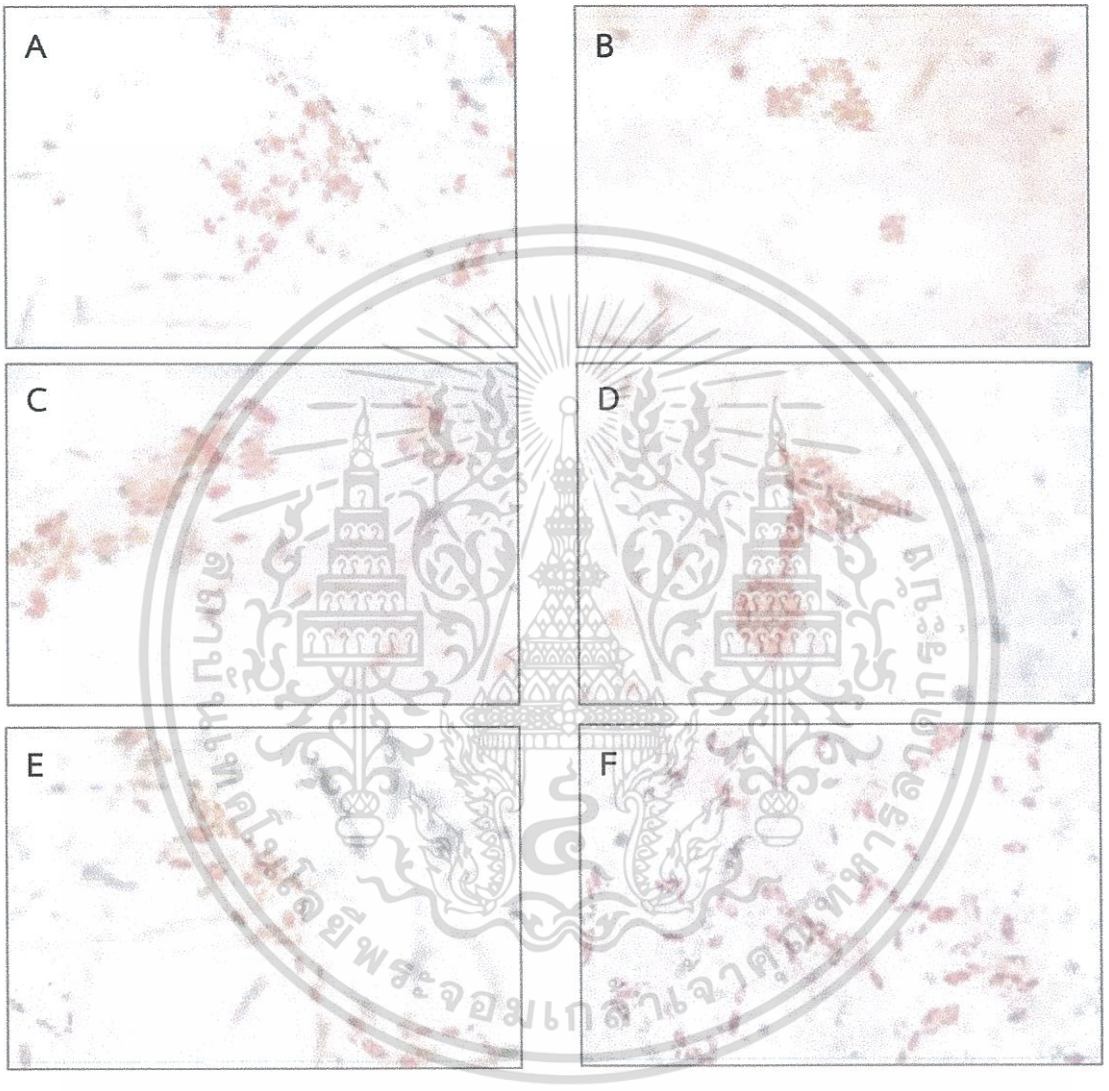
ภาพที่ 4.12 เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นของ molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.1%

จากภาพที่ 4.12 แสดงถึงอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% และกดดันยีสต์ด้วย Tannic acid ความเข้มข้น 0.1% จากการทดลองพบว่า อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 แต่เมื่อผ่านไป 28 ชั่วโมง พบว่า กราฟมีอัตราการเจริญที่ลดลง จากกราฟปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สังเกตได้ว่าเมื่อผ่านไป 4 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เกิดการปรับตัว(adaptation)ทำให้ยีสต์มีความทนทาน(tolerance)มากขึ้น เนื่องจากยีสต์มีการรบกวนจากสารเคมี คือ Tannic acid การนำ Tannic acid มาใช้กระตุ้นยีสต์นั้นเพราะเป็นสารจำพวกโพลีฟีนอลที่พบได้ในพืช และสามารถยับยั้งเชื้อไม่ให้เจริญได้ จึงใช้นำมาสร้างสภาวะกดดันกับยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01ที่ถูกพัฒนาให้ทนแทนนินจากน้ำจามจุรีได้ ยีสต์จะผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสซึ่งสามารถเร่งการสลายตัวของสับเสตรท เช่น ซูโครส(sucrose) ให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งเป็นสารที่เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการเจริญของยีสต์ เพื่อให้ยีสต์สามารถทนในสภาวะที่กดดันและสามารถเจริญต่อไปได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อยๆลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24 เนื่องจากเป็นช่วงที่ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ดูลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยย้อมเซลล์ยีสต์ด้วย Congo red

4.2.1 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 1,2,3,4,5และ10% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



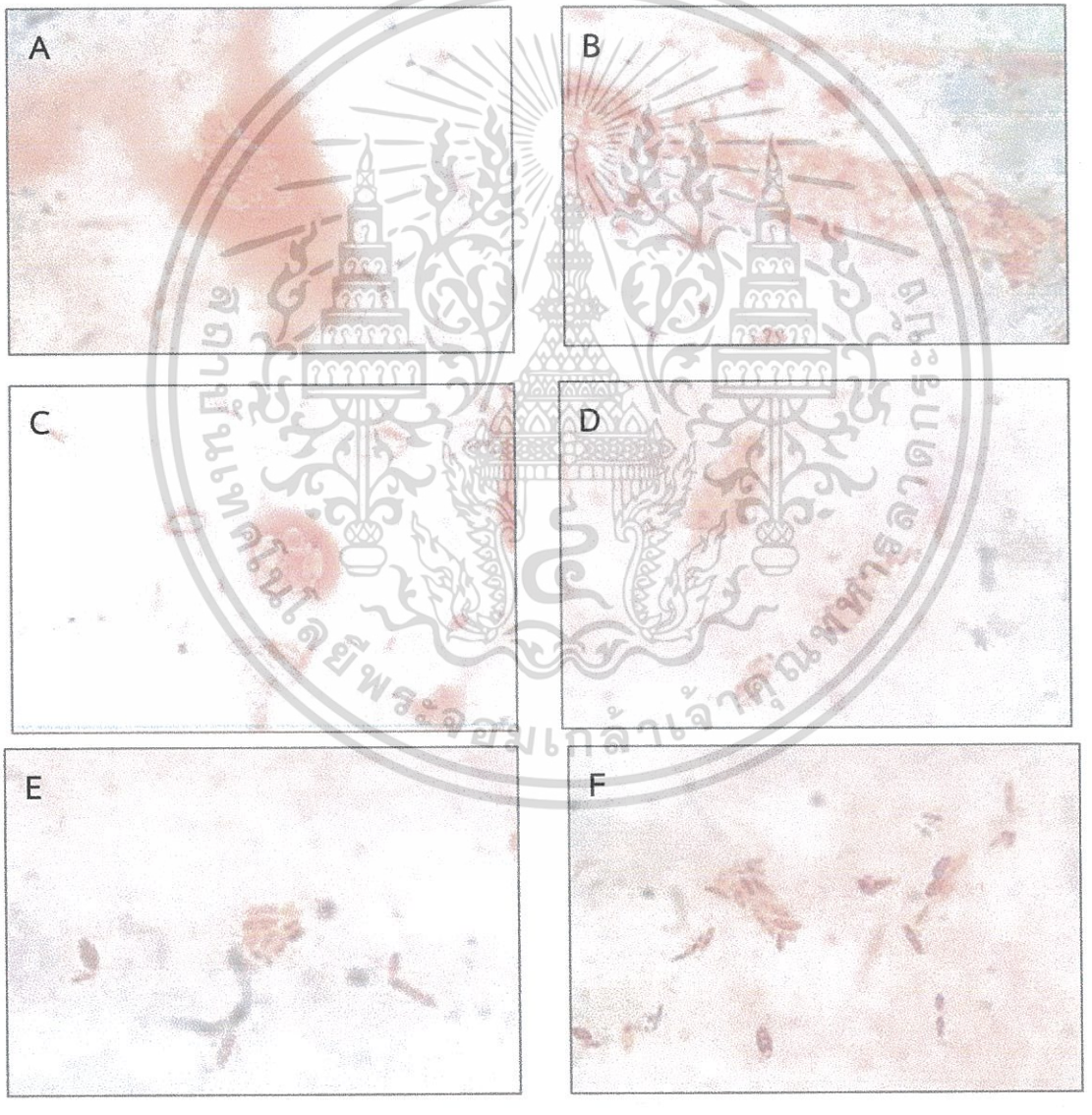
ภาพที่ 4.13 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้นดังนี้ คือ A = molass 1%, B = molass 2%, C = molass 3%, D = molass4%, E = molass 5% และ F = molass 10%

จากภาพ 4.13 แสดงลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้น 1,2,3,4,5และ10% เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพพบว่า เมื่อดูโครงสร้างยีสต์โดยย้อมเซลล์ด้วย Congo red แต่ละความเข้มข้นของกากน้ำตาล ยีสต์ย้อมติดสี Congo red ในลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก เนื่องจาก ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตของโครงสร้างยีสต์ เช่น ผนังเซลล์ ที่จะสามารถย้อมติดสี Congo red ได้ แสดงว่า ความเข้มข้นของกากน้ำตาล(molass)ที่ต่างกัน ไม่ทำให้ผนังเซลล์ยีสต์มีความหนาแตกต่างกัน

4.2.2 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.14 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้นดังนี้ A = molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, B = molass 2%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, C =

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

molass 3%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% , D = molass 4%+$(NH_4)_2SO_4$0.1% , E = molass 5%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% และ F = molass 10%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%

จากภาพ 4.14 แสดงลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากภาพพบว่า เมื่อดูโครงสร้างยีสต์โดยย้อมเซลล์ด้วย Congo red แต่ละความเข้มข้นของกากน้ำตาล ยีสต์ย้อมติดสี Congo red ในลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก เนื่องจาก ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตของโครงสร้างยีสต์ เช่น ผนังเซลล์ ที่จะสามารถย้อมติดสี Congo red ได้ แสดงว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาล(molass)ที่ต่างกัน โดยมีมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% ไม่ทำให้ผนังเซลล์ยีสต์มีความหนาแตกต่างกัน แต่ในบางภาพเช่น ภาพ A,BและC อาจย้อมติดสีไม่ชัด อาจเป็นเพราะ เทคนิคของผู้ย้อมยังไม่ดีนักหรือย้อมเปนเวลาสั้นเกินไป ทำให้ติดสีน้อย

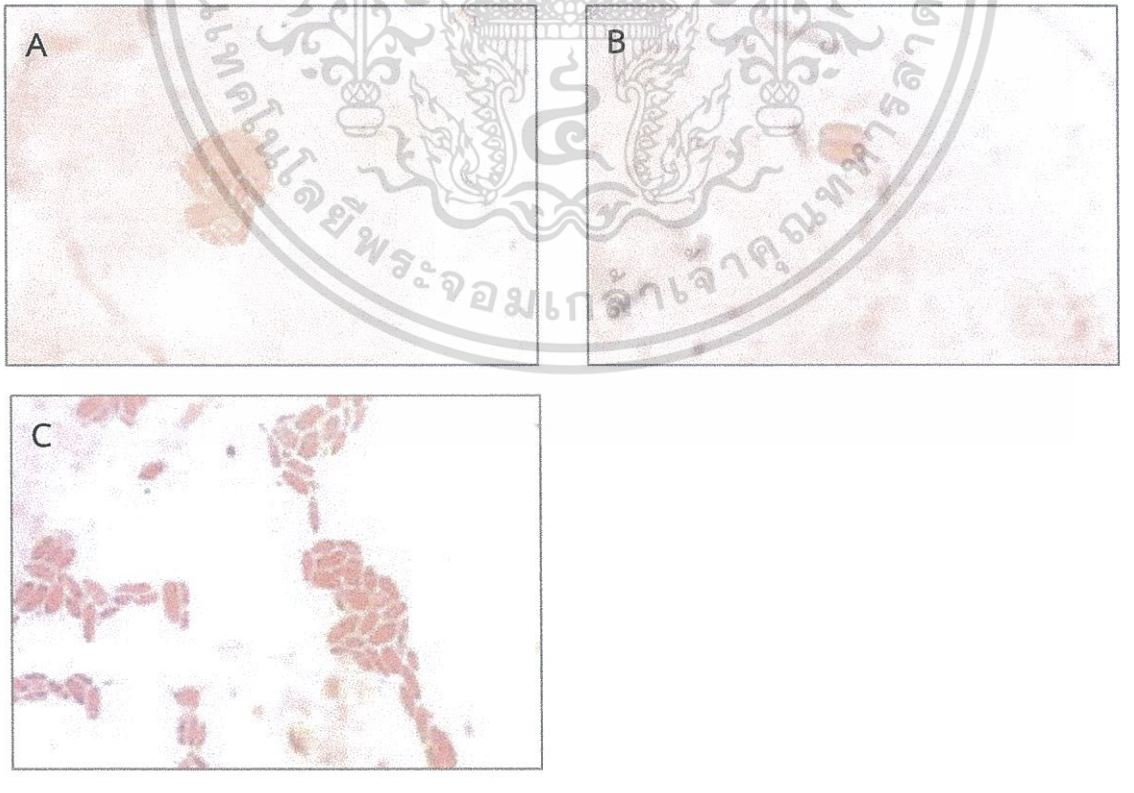
4.2.3 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.05,0.1 และ 0.2% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.15 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้นดังนี้ A = molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.05% , B = molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% และ C = molass 1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%

จากภาพ 4.15 แสดงลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.05,0.1 และ 0.2% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากภาพพบว่า เมื่อดูโครงสร้างยีสต์โดยย้อมเซลล์ด้วย Congo red แต่ละความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ยีสต์ย้อมติดสี Congo red ในลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก เนื่องจาก ส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตของโครงสร้างยีสต์ เช่น ผนังเซลล์ ที่จะสามารถย้อมติดสี Congo red ได้ แสดงว่า ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แตกต่างกัน ไม่ทำให้ผนังเซลล์ยีสต์มีความหนาแตกต่างกัน

4.2.4. ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% และ กดดันยีสต์ด้วย Tannic acid ความเข้มข้น 0,0.05และ0.1% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

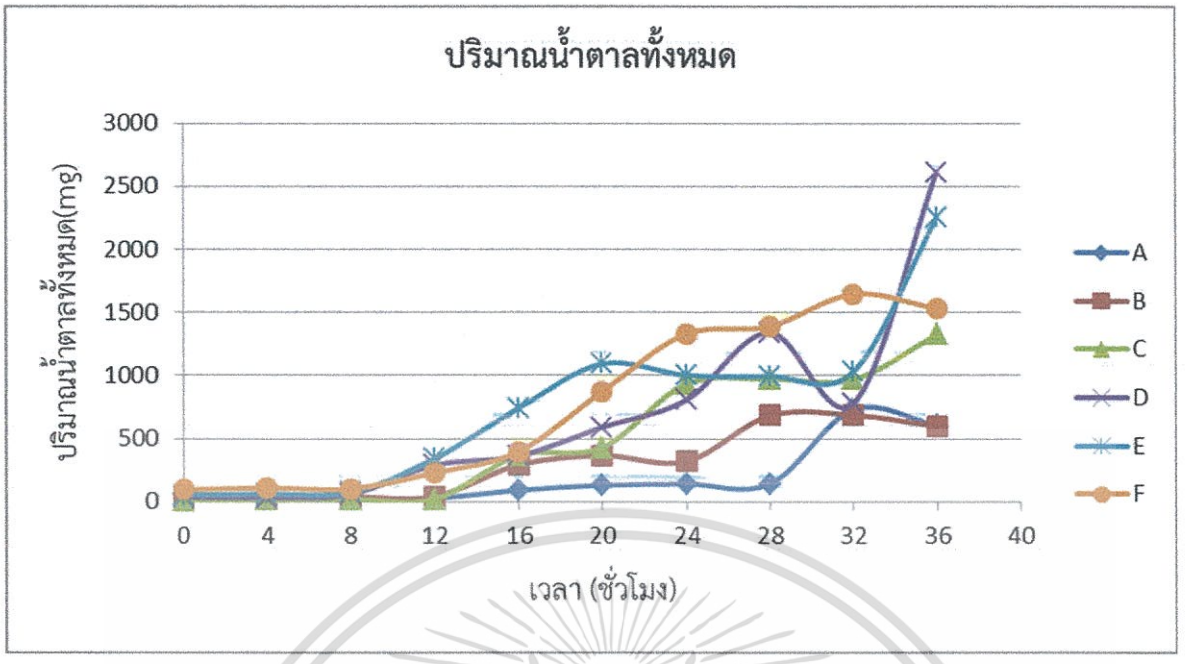
ภาพที่ 4.16 ลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้นดังนี้ A = molass1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0% , B = molass1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.05% และ C= molass1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.1%

จากภาพ 4.16 แสดงลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% และ กดดันยีสต์ด้วย Tannic acid ความเข้มข้น 0,0.05และ0.1% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากภาพพบว่า เมื่อดูโครงสร้างยีสต์โดยย้อมเซลล์ด้วย Congo red แต่ละความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ยีสต์ย้อมติดสี Congo red ในลักษณะที่ต่างกัน คือ ภาพ A คือ molass1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0% เป็นภาพควบคุม(control) ที่ไม่ใส่Tannic acid พบว่ายีสต์ย้อมติดสี Congo red ในลักษณะปกติ เหมือนภาพ 4.13-4.15 แต่ภาพ B และ C ที่มีการใส่สารเคมี คือ Tannic acid ซึ่งเป็นการใส่สารรบกวนเพื่อให้ยีสต์เกิดการปรับตัว(adaptation) ทำให้ยีสต์มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อป้องกันสารเคมีเหล่านั้น โดยผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมีองค์ประกอบของกรดไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้น ซึ่งคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นทำให้ยีสต์ย้อมติดสี Congo red มากขึ้น แสดงว่า การใส่สารเคมี คือ Tannic acid ทำให้ยีสต์มีผนังเซลล์ที่หนาขึ้น และมีการพบสารบีตากลูแคนเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ ดังนั้นการนำยีสต์มากระตุ้นให้มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นส่งผลให้ปริมาของบีตากลูแคนเพิ่มขึ้นไปด้วย

4.3 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด(Total sugar) ในตัวอย่างที่ผ่านการสกัดด้วยวิธี Hot water

4.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces carbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

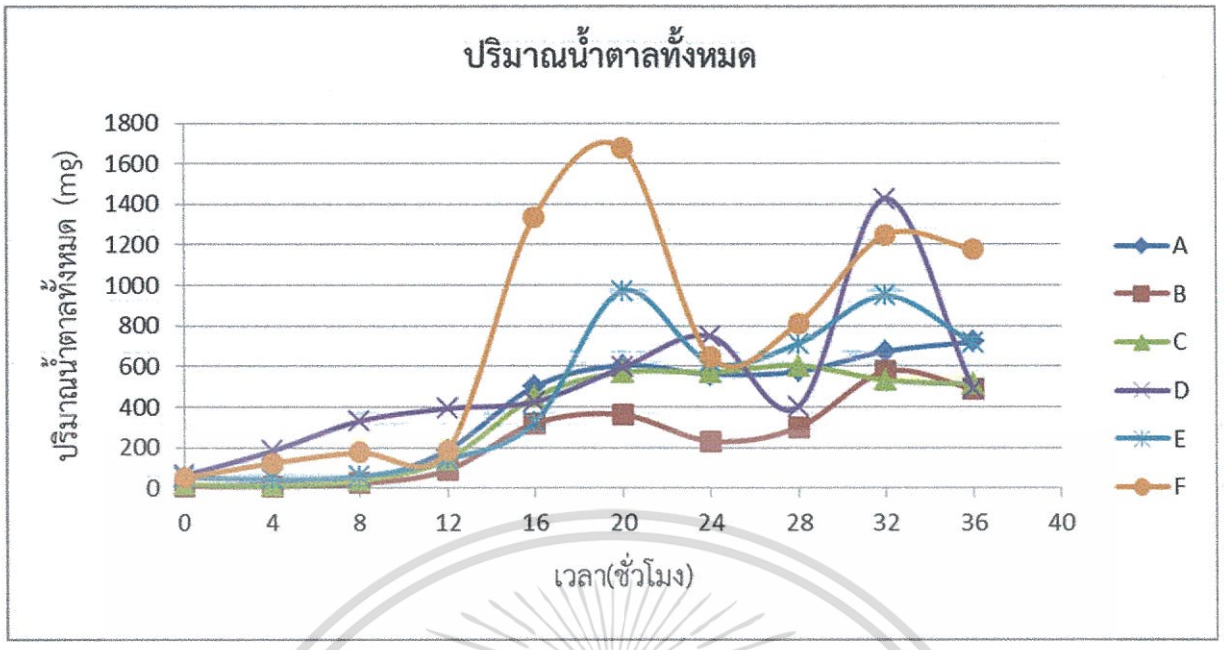


ภาพที่4.17 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้นดังนี้ คือ A = molass 1%, B = molass 2%, C = molass 3%, D = molass4%, E = molass 5% และ F = molass 10%

จากภาพที่ 4.17 แสดงถึงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยเพาะเลี้ยงยีสต์เปรียบเทียบความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้น1,2,3,4,5และ10% จากการทดลองพบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเหมือนกันในทุกๆความเข้มข้นของกากน้ำตาล เนื่องจากบีตากลูแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบได้ในผนังเซลล์ยีสต์ เมื่อเวลามากขึ้น ยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้น จึงเป็นไปได้ที่จะมีบีตากลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์มากขึ้นด้วย

4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces carbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

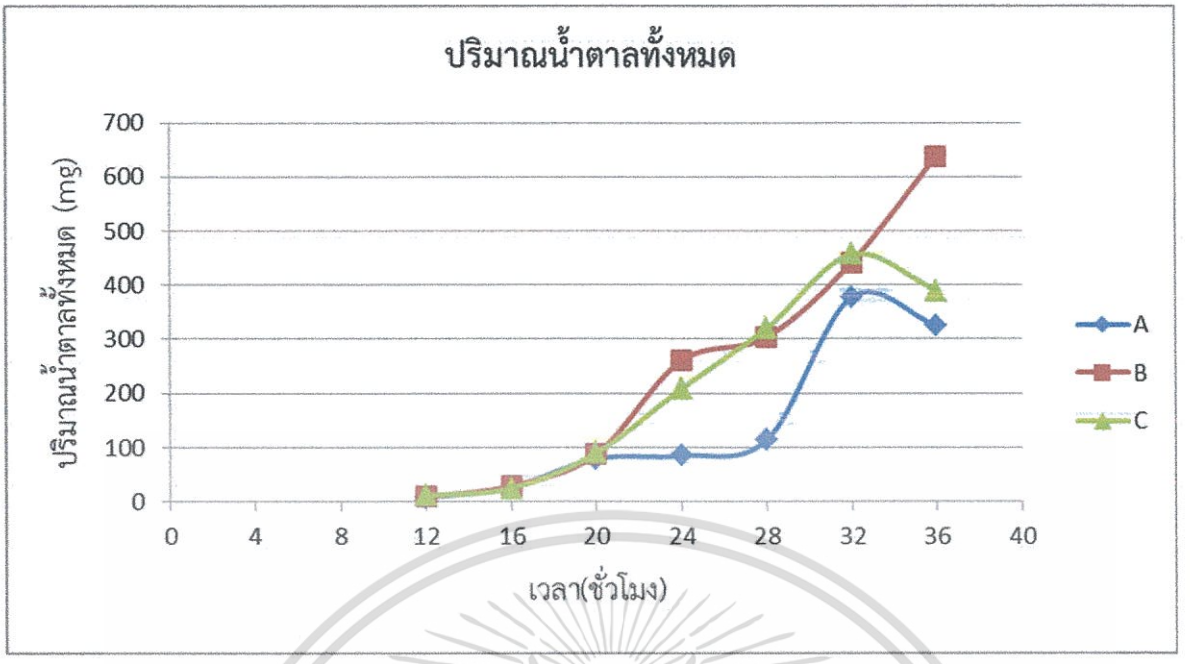


ภาพที่4.18 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้นดังนี้ A = molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, B = molass 2%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, C = molass 3%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% , D = molass4% +$(NH_4)_2SO_4$0.1% , E = molass 5%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% และ F = molass 10%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%

จากภาพที่ 4.18 แสดงถึงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% จากการทดลองพบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีแนวโน้มขึ้นๆลงๆเหมือนกันในทุกๆความเข้มข้นของกากน้ำตาลโดยเพิ่มขึ้นสูงในช่วงชั่วโมงที่ 20 และ32 เพราะเป็นช่วงที่ยีสต์มีการเจริญสูง บีตากลูแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบได้ในผนังเซลล์ยีสต์ เมื่อยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นจึงเป็นไปได้ที่จะมีบีตากลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์มากขึ้นด้วย

4.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces carbergensis* RU01 โดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.05,0.1 และ 0.2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

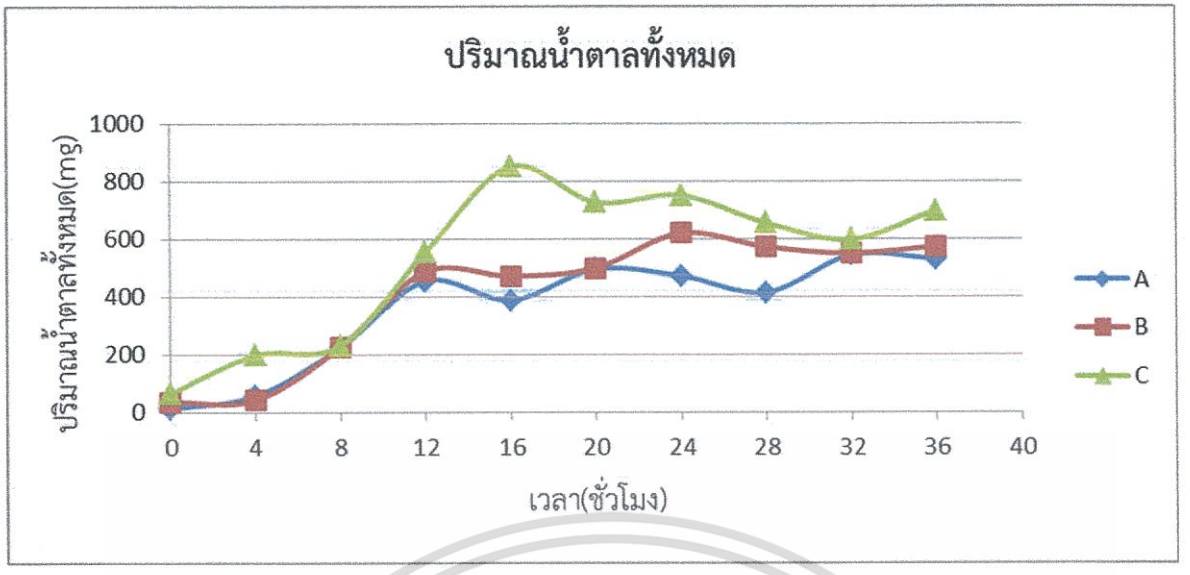


ภาพที่4.18 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้นดังนี้ A = molass1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.05% , B = molass1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% และ C = molass1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%

จากภาพที่ 4.18 แสดงถึงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลโดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.05,0.1 และ 0.2% จากการทดลองพบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเหมือนกันในทุกๆความเข้มข้น แต่กราฟB คือ molass1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% มีแนวโน้มปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงขึ้นต่อไปได้อีก เนื่องจาก จากภาพแสดงอัตาการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิต ในภาพที่4.7 กราฟ B คือ molass 1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1% ยีสต์มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงจากภาพ พบว่าที่ชั่วโมงที่36 ยีสต์สามารถเจริญต่อไปได้อีก ดูได้จากอัตราการเจริญที่มีแนวโน้มสูงขึ้น จึงทำให้สรุปได้ว่า $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% ทำให้ยีสต์มีอัตราการเจริญและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่สูงที่สุด และเมื่อยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นจึงเป็นไปได้ที่จะมีบีตากลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์มากขึ้นด้วย

4.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces carbergensis* RU01 โดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.05,0.1 และ 0.2%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่4.19 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี *Phenol sulfuric* ของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นดังนี้ A = molass1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0% , B = molass1%+$(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.05% และ C= molass1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.1%

จากภาพที่ 4.19 แสดงถึงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลวกากน้ำตาลโดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.05,0.1 และ 0.2% จากการทดลองพบว่าในทุกๆความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเริ่มคงที่เมื่อผ่านไป16ชั่วโมง แต่กราฟ C คือ molass1% + $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%+Tannic acid 0.1%มีแนวโน้มปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่ากราฟ Aและ B เนื่องจากการใส่สารเคมี คือ Tannic acid ซึ่งเป็นการใส่สารรบกวนเพื่อให้ยีสต์เกิดการปรับตัว(adaptation) ทำให้ยีสต์มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อป้องกันสารเคมีเหล่านั้น โดยผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมีองค์ประกอบของกรดไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้น บีตากลูแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบได้ในผนังเซลล์ยีสต์ เมื่อยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้น จึงเป็นไปได้ที่จะมีบีตากลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในผนังเซลล์มากขึ้นด้วย จึงสามารถสรุปได้ว่า การกดดันยีสต์โดยการใส่ Tannic acid 0.1% ทำให้ยีสต์สร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมากที่สุด ส่งผลให้มีบีต้ากลูแคนมากที่สุดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

บีตากลูแคน (beta-glucan) เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) สกัดได้จากเห็ด ผนังเซลล์ของยีสต์ (yeast) รา (mold) เมล็ดธัญพืช (cereal grain) เป็นไฮโดรคอลลอยด์ (hydrocolloid) ไม่ละลายในน้ำแต่ดูดน้ำได้ดี ในยีสต์บีตากลูแคนประกอบด้วยสายโครงหลักและสายที่เป็นกิ่งก้านโดยภายในสายโครงสร้างหลักประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1,3 (1,3- β-linkage) สำหรับสายที่เป็นกิ่งก้านประกอบด้วยกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะบีตา 1,6 (1,6- β-linkage) มีการพบสารบีตากลูแคนเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ โดยถ้ายีสต์มีการรบกวนจากสารเคมี เช่น แทนนิน จะมีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อป้องกันสารเคมีเหล่านั้น โดยผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมีองค์ประกอบของกรดไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้น จากแนวคิดนี้จึงมีการนำยีสต์มากระตุ้นให้มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อเพิ่มปริมาณของบีตากลูแคน และเนื่องจากบีตากลูแคนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในผนังเซลล์ของยีสต์เกิดการสร้างเมื่อเซลล์มีการแตกหน่อและสร้างผนังเซลล์ของเซลล์ลูกดังนั้นการผลิตบีตากลูแคน จึงสามารถกระทำได้โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เซลล์มีมวลเซลล์มากเพราะปริมาณบีตากลูแคนแปรผันโดยตรงต่อมวลเซลล์

จากการทดลองศึกษาหาสภาวะการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 ที่เหมาะสมที่สุดจากความเข้มข้นของกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างกัน ผลการทดลองพบว่าอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล(molass) ที่ความเข้มข้น 1% โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% ที่ชั่วโมงที่ 24 ยีสต์มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด คือ 5.27×10^4 เท่า ซึ่งอาจจะมีอัตราการเจริญไม่สูงเท่าความเข้มข้นของกากน้ำตาล 3% ที่ไม่ใส่แหล่งไนโตรเจนในอาหาร แต่พบว่าที่ชั่วโมงที่ 36 ยีสต์สามารถเจริญต่อไปได้อีกที่สุด ดูได้จากอัตราการเจริญที่มีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งการใช้ความเข้มข้นกากน้ำตาลสูงๆ จะเกิดความดันออสโมติก (osmotic pressure) ในลักษณะ hypertonic solution สารละลายที่มีความเข้มข้นมากกว่าความเข้มข้นภายในเซลล์ ทำให้เซลล์น้ำออสโมซิสออกนอกเซลล์ เซลล์จะเหี่ยว และ หากมีออกซิเจนยีสต์จะใช้น้ำตาลให้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แทนการหมักให้เอทานอล หรือการหมักถูกยับยั้งโดยการหายใจเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “Pasteur effect” ทำให้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลสูงๆ มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตที่น้อยกว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่ำๆ และการใส่ $(NH_4)_2SO_4$ ในอาหาร0.2% ทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตน้อยกว่า การใส่ $(NH_4)_2SO_4$ ในอาหาร 0.1% อาจเนื่องมาจาก $(NH_4)_2SO_4$ มีคุณสมบัติเป็นกรด ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเปลี่ยน ไม่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ และเมื่อศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ทดลองพบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงเหมือนกันใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทุกๆความเข้มข้นของกากน้ำตาล เนื่องจากจุลินทรีย์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญ โดยส่วนมากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่24 เนื่องจากเป็นช่วงที่ยีสต์มีอัตราการเจริญสูง จึงถือว่าความเข้มข้น 1% และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการเจริญของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการกระตุ้นบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 โดยใช้กากน้ำตาลผสมกับแทนนิน ผลการทดลองพบว่าอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% และ กดดันยีสต์ด้วย Tannic acid ความเข้มข้น 0.1% มีอัตราการเจริญของเซลล์ที่มีชีวิตสูงที่สุด ที่ชั่วโมงที่ 24 แต่เมื่อผ่านไป 28 ชั่วโมง พบว่า กราฟมีอัตราการเจริญที่ลดลง การใส่ Tannic acid ทำให้ยีสต์เกิดการปรับตัว(adaptation)ทำให้ยีสต์มีความทนทาน(tolerance) มากขึ้น เนื่องจากยีสต์มีการรบกวนจากสารเคมี คือ Tannic acid และเมื่อศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าเมื่อผ่านไป 4 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจาก ยีสต์เกิดการปรับสภาพ(adaptation) ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสซึ่งสามารถเร่งการสลายตัวของสับเสตรท เช่น ซูโครส(sucrose) ให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งเป็นสารที่เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการเจริญของยีสต์ เพื่อให้ยีสต์สามารถทนในสภาวะที่กดดันและสามารถเจริญต่อไปได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ค่อยๆลดลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24 เนื่องจากเป็นช่วงที่ยีสต์มีอัตราการเจริญสูงที่สุด

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของบีตากลูแคนจากยีสต์ ได้แก่ โครงสร้างของเซลล์ยีสต์ โดยย้อมเซลล์ยีสต์ด้วย Congo red จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* RU01 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 1% และมีแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 0.1% และ กดดันยีสต์ด้วย Tannic acid ความเข้มข้น 0,0.05และ0.1% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างเซลล์ที่ไม่ใส่Tannic acid พบว่ายีสต์ย้อมติดสี Congo red ในลักษณะปกติ แต่ลักษณะโครงสร้างเซลล์ที่มีการใส่สารเคมี คือ Tannic acid ซึ่งเป็นการใส่สารรบกวนเพื่อให้ยีสต์เกิดการปรับตัว(adaptation) ทำให้ยีสต์มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อป้องกันสารเคมีเหล่านั้น โดยผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้น ซึ่งคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้นทำให้ยีสต์ย้อมติดสี Congo red มากขึ้น แสดงว่า การใส่สารเคมี คือ Tannic acid ทำให้ยีสต์มีผนังเซลล์ที่หนาขึ้น และมีการพบสารบีตากลูแคนเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ ดังนั้นการนำยีสต์มากระตุ้นให้มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นส่งผลให้ปริมาณของบีตากลูแคนเพิ่มขึ้นไปด้วย และเมื่อทำการสกัดบีตากลูแคนด้วยวิธี Hot water ศึกษาแสดงถึงปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่าการกดดันยีสต์ด้วย Tannic acid 0.1% มีแนวโน้มปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุด เนื่องจากการใส่สารเคมี คือ Tannic acid ซึ่ง ทำให้ยีสต์มีการสร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นเพื่อป้องกันสารเคมีเหล่านั้น โดยผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมีองค์ประกอบของกรดไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่เพิ่มขึ้น บีตากลูแคนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบได้ในผนังเซลล์ยีสต์ เมื่อยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้น จึงเป็นไปได้ที่จะมีบีตากลูแคนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในผนัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์มากขึ้นด้วย จึงสามารถสรุปได้ว่า การกดดันยีสต์โดยการใส่ Tannic acid 0.1% ทำให้ยีสต์สร้างผนังเซลล์ที่หนาขึ้นมากที่สุด ส่งผลให้มีบีต้ากลูแคนมากที่สุดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กนกทิพย์ ปัญญาไชย. 2014. บทบาทของผนังเซลล์ยีสต์ในการเป็นสารเสริมอาหารสัตว์. วารสารสัตวศาสตร์ แห่งประเทศไทย. 2: 1-10.

พัตราพร จอมเมืองบุตร. 2557. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดเบต้ากลูแคนจากข้าวเหนียวดำ. Agricultural Sci. 45: 153-156.

ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. Tannin.[ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2376/tannin. 26 พฤษภาคม 2559.

มลฤดี สิทธิพันธุ์. 2542. การสกัดสารเบต้ากลูแคนจากยีสต์และการประยุกต์ใช้ในกุ้งกุลาดำ. บัณฑิตวิทยาลัย. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร (เทคโนโลยีชีวภาพ). มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. 2558. การวิเคราะห์และเปรียบเทียบยีสต์บีตากลูแคน จากลูกแป้งข้าวหมากในภาคกลางของประเทศไทย. ภาควิชาชีววิทยาและหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม เพื่อการเรียนรู้. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สุดารัตน์ แซ่โจว. 2555. การแยกและการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งเพื่อผลิตเอทานอล. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. คณะศิลปะศาสตร์และวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภารัตน์ จันทร์เหลือง. 2558. การศึกษาหาปริมาณสารเบต้ากลูแคน โปรตีน และเส้นใยในเห็ดป่าที่ใช้บริโภค ในจังหวัดอุบลราชธานี. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. 2553. ยีสต์บีตากลูแคน:อาหารเสริมระบบภูมิต้านทาน. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏ.

BETA-G. เบต้ากลูแคน.[ออนไลน์].เข้าถึงได้จาก: http://www.betag.co.th. 26 พฤษภาคม 2559.

Freimund et al. 2003. Application of Diff erent Drying Methods on β-Glucan Isolated from Spent Brewer's Yeast Using Alkaline Procedure. Agriculturae Conspectus Scientifi cus. 75: 45-50.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Khunrae. 2001. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 16: 527-539.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM BROTH

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารเหลวซึ่งเป็นอาหารที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ*Saccharomyces calbergensis* โดยในส่วนผสมของอาหารประกอบด้วย (ปริมาตร 50 ml)

Yeast extract	0.15g
Malt extract	0.15g
Peptone	0.25g
Glucose	10.50g

นำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมกันในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. คนให้เข้ากัน จนส่วนผสมต่างๆละลายจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

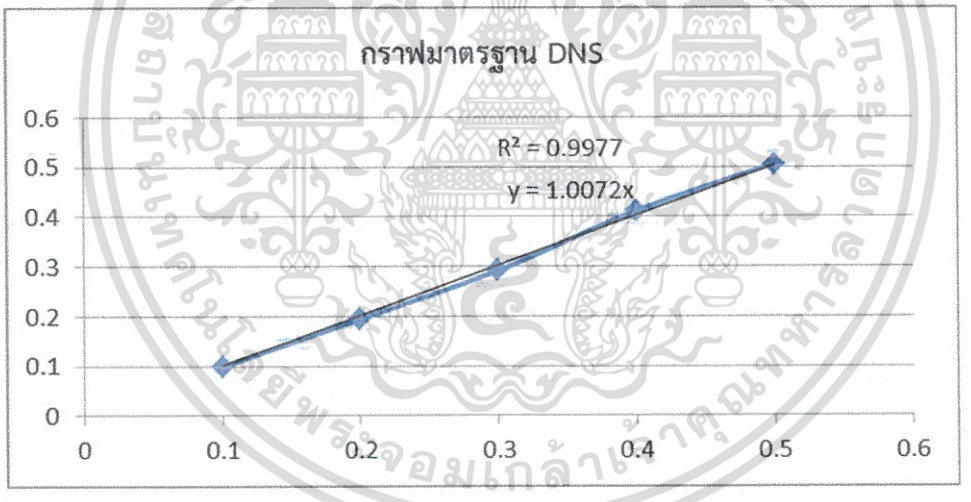
ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

วิธีการนี้สามารถใช้ตรวจหาปริมาณน้ำตาล Reducing sugar ที่มีปริมาณอยู่ในช่วงระหว่าง 5 – 500 ไมโครกรัมของน้ำตาลกลูโคส

ข.2 หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

การต้มน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายด่างที่มีกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5-dinitrosalicylic acid) อยู่ด้วยปฏิกิริยาดังกล่าวจะทำให้สารละลายมีสีเข้มขึ้นและสามารถ ดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 500–550 นาโนเมตร ซึ่งเชื่อว่าสีของผลิตภัณฑ์นั้นเกิดจากกระบวนการรีดักชันทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของ 3,5-dinitrosalicylic acid ไป เป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid ซึ่งปฏิกิริยานี้จะดำเนินไปจนกว่าสารตั้งต้นคือน้ำตาลรีดิวซ์จะหมด



ภาคผนวก ข-1กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 nm
0.1	0.099
0.2	0.195
0.3	0.291
0.4	0.412
0.5	0.505

ภาคผนวก ข-1 ตารางความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส

ภาคผนวก ข-2

กราฟมาตรฐาน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด(total sugar)

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

การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

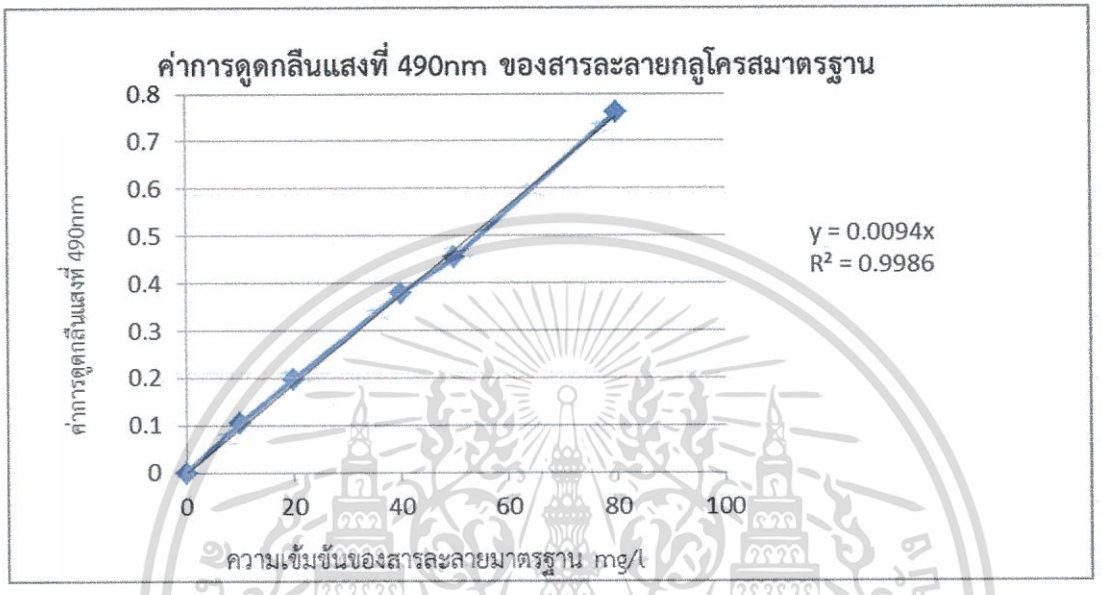
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสง (OD_{490}) x $\frac{1}{\text{ความชัน}}$ x $\frac{1}{\text{การเจือจาง}}$

โดยที่ความชัน = ค่าความชัน (slope) ของกราฟมาตรฐาน

และการเจือจาง = ค่าการเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์



ภาคผนวก ข-2กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

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

ภาคผนวก ข-2ตารางความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายธนวัฒน์ บุญสนอง
วัน เดือน ปี เกิด	4 มกราคม 2557
ประวัติการศึกษา	ชั้นปีที่4 สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร
ประสบการณ์การทำงาน และผลงานวิจัย	ฝึกงานที่บริษัทยูนิลิเวอร์ไทย โฮสดิ้ง จำกัด (วอลล์)
รางวัลที่เคยได้รับ	-

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวณัฐพร โชติกาวินทร์
วัน เดือน ปี เกิด	29 พฤศจิกายน 2536
ประวัติการศึกษา	ชั้นปีที่4 สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร
ประสบการณ์การทำงาน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ฝึกงานที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร และผลงานวิจัย
รางวัลที่เคยได้รับ	ผลการเรียนดีเด่น (2551) เข้าร่วมแข่งขันตอบปัญหาวิชาการ งานกีฬาเปิดกระป๋องครั้งที่28 (2559)

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสวรส แย้มคงเมือง
วัน เดือน ปี เกิด	30 สิงหาคม 2536
ประวัติการศึกษา	ชั้นปีที่4 สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร
ประสบการณ์การทำงาน และผลงานวิจัย	ฝึกงานที่บริษัท บีทาเก้น จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รางวัลที่เคยได้รับ	เข้าร่วมการแข่งขันประกวดแผนธุรกิจกะเทาะเปลือกปีที่2(รอบชิงชนะเลิศ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้