

โครงสร้างและสมบัติเชิงหน้าที่ของบีตากลูแคนที่สกัดจากยีสต์ *Saccharomyces*  
ต่างชนิดและสายพันธุ์



นางสาววีรญา จันทรไพแสง

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF  $\beta$ -GLUCAN EXTRACTED FROM  
DIFFERENT SPECIES AND STRAINS OF *Saccharomyces*



Miss Weeraya Janpaisaeng

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

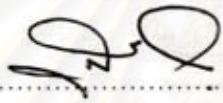
Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University


หัวข้อวิทยานิพนธ์ โครงสร้างและสมบัติเชิงหน้าที่ของบีตาไกลูแคนที่สกัดจาก  
ยีสต์ *Saccharomyces* ต่างชนิดและสายพันธุ์  
โดย นางสาววีรญา จันทรไพแสง  
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร. ชนิษฐา ธนานุวงศ์  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทมหาบัณฑิต

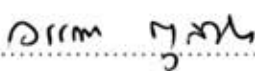
  
..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ นารหนองบัว)

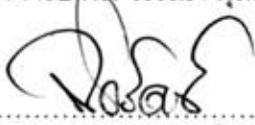
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมนี สงวนดีกุล)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(อาจารย์ ดร. ชนิษฐา ธนานุวงศ์)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรรณฯ ตูลยธัญ)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จีรารัตน์ ทัดติยกุล)

วีรญา จันทรีไพแสง : โครงสร้างและสมบัติเชิงหน้าที่ของบีตากลูแคนที่สกัดจากยีสต์ *Saccharomyces* ต่างชนิดและสายพันธุ์ (STRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF  $\beta$ -GLUCAN EXTRACTED FROM DIFFERENT SPECIES AND STRAINS OF *Saccharomyces*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร.ชนิษฐา ธนานุวงศ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร.ชินจิต ประภคชัยวัฒนา, 100 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างและสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces* 5 สายพันธุ์ คือ *S. bayanus* EC1118 *S. cerevisiae* FT1 *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup> *S. cerevisiae* Sc90 และ *S. cerevisiae* TISTR 5051 (ควบคุมภาวะในการเลี้ยงและสกัดบีตากลูแคนให้เหมือนกันสำหรับยีสต์ทุกสายพันธุ์) เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ที่มีจำหน่ายทางการค้า (Innovacan<sup>®</sup>) จากผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน (13-15% โดยน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง) ยกเว้น *S. cerevisiae* TISTR 5051 ที่ให้ผลผลิตสารสกัดบีตากลูแคนสูงถึง 25% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง อย่างไรก็ตาม สารสกัดจาก *S. cerevisiae* TISTR 5051 ประกอบด้วยบีตากลูแคนในปริมาณต่ำที่สุดคือ 28% โดยน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สารสกัดจากยีสต์ชนิดอื่นและสารสกัดทางการค้ามีปริมาณบีตากลูแคนใกล้เคียงกันคือ 40-46% โดยน้ำหนักแห้ง จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างบีตากลูแคนในสารสกัดโดยใช้ Fourier Transform Infrared spectroscopy พบว่าข้อมูลจากสารสกัดจากยีสต์ทุกสายพันธุ์ประกอบด้วยสเปกตรัมส่วนที่บ่งบอกการมีอยู่ของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน และ  $\beta$ -1,6 กลูแคน เช่นเดียวกับที่พบในข้อมูลจากสารมาตรฐาน Laminarin และสามารถแบ่งสารสกัดออกเป็น 2 กลุ่มตามสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) คือ กลุ่มที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) สูง ได้แก่ สารสกัดจาก *S. bayanus* EC1118 *S. cerevisiae* FT1 และ *S. cerevisiae* Sc90 และกลุ่มที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ต่ำ ได้แก่ สารสกัดจาก *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup> *S. cerevisiae* TISTR 5051 และสารสกัดทางการค้า เมื่อทดสอบสมบัติเชิงหน้าที่ ได้แก่ ความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมัน และความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันของสารสกัด พบว่าสารสกัดจาก *S. cerevisiae* TISTR 5051 มีสมบัติเชิงหน้าที่ทั้ง 3 ประการดีกว่าสารสกัดจากยีสต์สายพันธุ์อื่น ส่วนสารสกัดจากยีสต์อีก 4 สายพันธุ์มีสมบัติเชิงหน้าที่ทั้ง 3 ประการที่ใกล้เคียงกัน และยังพบว่าสารสกัดทางการค้ามีความสามารถในการอุ้มน้ำมันดีกว่า แต่มีความสามารถในการอุ้มน้ำและความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันใกล้เคียงกับสารสกัดจากยีสต์เกือบทุกสายพันธุ์ (ยกเว้น *S. cerevisiae* TISTR 5051) เมื่อวิเคราะห์พฤติกรรมการไหลของสารสกัดที่ความเข้มข้น 10% (w/w) พบว่าสารแขวนลอยของสารสกัดบีตากลูแคนที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) สูง มีพฤติกรรมการไหลแบบ yield-pseudoplastic หรือ Bingham plastic ส่วนสารแขวนลอยของสารสกัดที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ต่ำ มีพฤติกรรมการไหลแบบ pseudoplastic

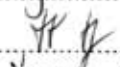
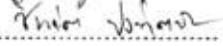
ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต..... *วีรญา จันทรีไพแสง*.....  
 สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... *ดร. ชนิษฐา*.....  
 ปีการศึกษา..... 2551..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... *ดร. ชินจิต*.....

# # 4872603123 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS :  $\beta$ -glucan / *Saccharomyces* / YEAST

WEERAYA JANPAISAENG : STRUCTURE AND FUNCTIONAL PROPERTIES  
OF  $\beta$ -GLUCAN EXTRACTED FROM DIFFERENT SPECIES AND STRAINS OF  
*Saccharomyces*. ADVISOR : KANITHA TANANUWONG, Ph.D., CO-ADVISOR  
: ASST. PROF. CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., 100 pp.

The objectives of this study was to investigate structure and functional properties of  $\beta$ -glucan extracted from 5 strains of yeast *Saccharomyces*, *S. bayanus* EC1118, *S. cerevisiae* FT1, *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup>, *S. cerevisiae* Sc90, *S. cerevisiae* TISTR 5051 (for every yeast strain, cell cultivation and  $\beta$ -glucan extraction were done under the same condition), comparing to those of commercial yeast  $\beta$ -glucan extract (Innovacan<sup>®</sup>). The results showed that yield of  $\beta$ -glucan extract obtained from all yeast strains were similar (13-15% based on cell dry weight), except the extract from *S. cerevisiae* TISTR 5051 which provided the highest yield of 25% based on cell dry weight. However, the extract from *S. cerevisiae* TISTR 5051 contented the lowest  $\beta$ -glucan while the extracts from the other yeast strains and the commercial extract had similar  $\beta$ -glucan contents. Analysis of  $\beta$ -glucan structure using Fourier Transform Infrared spectroscopy revealed that data from  $\beta$ -glucan extracts from all yeast strains consisted of the spectrum regions corresponding to  $\beta$ -1,3 glucan and  $\beta$ -1,6 glucan as found in the data from Laminarin. Additionally, the extracts were divided into 2 groups according to the ratio of  $\beta$ -1,3 glucan to  $\beta$ -1,6 glucan ( $\beta$ -(1,3:1,6)) in the extract. The first group with higher  $\beta$ -(1,3:1,6) ratio in the extracts consisted of the extracts from *S. bayanus* EC1118, *S. cerevisiae* FT1 and *S. cerevisiae* Sc90. The second group with lower  $\beta$ -(1,3:1,6) ratio in the extracts consisted of the extracts from *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup>, *S. cerevisiae* TISTR 5051 and the commercial extract. According to the determination of functional properties, water and oil holding capacities and emulsion stabilizing capacity, all of the tested properties of the extract from *S. cerevisiae* TISTR 5051 were inferior to those of the extracts from the other yeast strains. While the functional properties of the extracts obtaining from the other 4 strains were similar. Moreover, comparing to the extracts from four yeast strains (except *S. cerevisiae* TISTR 5051), the commercial extract had lower oil holding capacity but similar water holding capacity as well as emulsion stabilizing capacity. Flow behavior analysis of 10% (w/w)  $\beta$ -glucan suspension indicated that the the suspensions of the extracts with high  $\beta$ -(1,3:1,6) ratio showed yield-pseudoplastic or Bingham plastic behavior whereas the suspensions of extracts with low  $\beta$ -(1,3:1,6) ratio showed pseudoplastic behavior.

Department : Food Technology..... Student's Signature Weeraya Janpaisaeng  
Field of Study : Food Technology..... Advisor's Signature   
Academic Year : 2008..... Co-Advisor's Signature 

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ขนิษฐา ธนาวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำข้อคิดเห็นต่างๆ และความช่วยเหลือทางด้านวิชาการตลอดระยะเวลาของการปฏิบัติงานวิจัยนี้ รวมทั้งการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์สำหรับงานวิจัยนี้ และกรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. วรณา ตุลยธัญ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิราวัฒน์ ทัตติยกุล ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และกรุณาตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบริษัท สเปเชียลตี้ ไบโอเทค ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างสารสกัดปีตากลูแคน บริษัท สपोर्टเทค ประเทศไทย จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์โปรตีนเวย์ไอโซเลต โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา ที่ให้ความอนุเคราะห์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้และอบรมสั่งสอนในระหว่างการศึกษา ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ ตลอดงานวิจัยขอขอบคุณ พี่ น้อง และเพื่อนร่วมสถาบันและต่างสถาบันทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาวที่ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาโดยตลอด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 วารสารปริทัศน์.....	2
2.1 ยีสต์ (Yeast).....	2
2.2 องค์ประกอบและโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ <i>Saccharomyces</i> spp.....	5
2.3 ปีตากลูแคนจากยีสต์ <i>Saccharomyces</i> spp.....	7
2.4 การสกัดปีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์.....	8
2.5 การนำปีตากลูแคนที่สกัดจากยีสต์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ.....	10
2.6 ผลของชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์ต่อปริมาณ โครงสร้าง และสมบัติต่างๆ ของปีตากลูแคนจากยีสต์.....	12
2.7 พูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR spectroscopy).....	14
3 การดำเนินงานวิจัย.....	20
3.1 ขอบเขตงานวิจัย.....	20
3.2 สายพันธุ์ยีสต์.....	20
3.3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	21
3.4 การวางแผนการทดลองทางสถิติ.....	29
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	30
4.1 ผลผลิตของเซลล์ยีสต์.....	30

บทที่	หน้า
4.2 ผลผลิตของสารสกัดปีตากูแคนจากเซลล์ยีสต์.....	30
4.3 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์และสารสกัดปีตากูแคน.....	35
4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างของปีตากูแคนโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy.....	40
4.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดปีตากูแคน.....	52
4.6 พฤติกรรมการไหลของสารสกัดปีตากูแคน.....	56
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	60
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	69
ภาคผนวก ก การเตรียมหัวเชื้อยีสต์และวิธีการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์.....	70
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	73
ภาคผนวก ค ผลการวิเคราะห์โดยใช้ Fourier Transform Infrared Spectroscopy .....	86
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์หาสมบัติเชิงหน้าที่.....	92
ภาคผนวก จ การวิเคราะห์พฤติกรรมการไหล.....	95
ภาคผนวก ฉ ผลการวิเคราะห์พฤติกรรมการไหล.....	97
ภาคผนวก ช การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	98
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	100



## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
2.2	ช่วงคลื่นอินฟราเรดย่านต่างๆ.....	15
2.3	องค์ประกอบที่สอดคล้องกับสเปกตรัมที่ตำแหน่งต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ ผนังเซลล์ยีสต์ และสารสกัดจากยีสต์.....	17
3.1	สายพันธุ์และแหล่งที่มาของยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	21
4.1	ความชื้นของเซลล์เปียกและผลผลิตของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	30
4.2	ผลผลิตของสารสกัดในแต่ละขั้นตอนของการสกัดปีตากูแคนจากเซลล์ยีสต์	32
4.3	ผลผลิตของสารสกัดปีตากูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา.....	34
4.4	องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	37
4.5	องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดปีตากูแคนจากเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า.....	38
4.6	พื้นที่ได้กราฟในช่วงเลขคลื่นต่างๆ ของเซลล์ยีสต์.....	42
4.7	พื้นที่ได้กราฟในช่วงเลขคลื่นต่างๆ ของสารสกัดปีตากูแคนจากยีสต์.....	43
4.8	ตำแหน่งของสเปกตรัมย่อยที่พบใน FTIR สเปกตรัมของตัวอย่างเซลล์ยีสต์ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 cm <sup>-1</sup> .....	45
4.9	ตำแหน่งของสเปกตรัมย่อยที่พบใน FTIR สเปกตรัมของตัวอย่างสารสกัดปีตากูแคนและสารมาตรฐานในช่วงเลขคลื่น 925-1190 cm <sup>-1</sup> .....	46
4.10	พื้นที่ได้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่บ่งบอกการมีอยู่ของปีตากูแคนในช่วงเลขคลื่น 925-1190 cm <sup>-1</sup> ของเซลล์ยีสต์และสารสกัดปีตากูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ.....	47
4.11	สัดส่วนของ $\beta$ -(1,3:1,6) ในเซลล์ยีสต์.....	50
4.12	สัดส่วนของ $\beta$ -(1,3:1,6) ในสารสกัด.....	51
4.13	ความสามารถในการข้มน้ำ ข้มน้ำมัน และเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันที่ได้จากสารสกัดปีตากูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ และสารสกัดทางการค้า.....	53

ตารางที่		หน้า
4.14	ข้อมูลการอธิบายพฤติกรรมการไหลของสารสกัดปีตากลူးแคนจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ Herschel-Bulkley model.....	57
ช.1	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าความชื้น โปรตีน ไขมัน และไขมันของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	98
ช.2	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของคาร์โบไฮเดรตและปีตากลူးแคนของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	98
ช.3	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของโปรตีน ไขมัน และไขมันของสารสกัดปีตากลူးแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า.....	98
ช.4	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของคาร์โบไฮเดรตและปีตากลူးแคนของสารสกัดปีตากลူးแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า.....	99
ช.5	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของความสามารถในการอุ้มน้ำ และอุ้มน้ำมันที่ได้จากสารสกัดปีตากลူးแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า.....	99
ช.6	การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันของเวย์โปรตีน สารสกัดปีตากลူးแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ และสารสกัดทางการค้า.....	99

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบและโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ....	6
2.2 โครงสร้างของ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-linked glucan ชนิดที่ไม่ละลายทั้งในด่างและกรด...	7
2.3 โครงสร้างของ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-linked glucan.....	8
3.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ยีสต์.....	22
3.2 ขั้นตอนการสกัดบีตากลูแคน.....	25
4.1 FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์.....	40
4.2 FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ สารสกัด บีตากลูแคนทางการค้า (Innovacan <sup>®</sup> ) และสารมาตรฐาน Laminarin.....	41
ก1.(ก) ตารางของ counting chamber แสดงช่อง A, B, C, D, E สำหรับนับเซลล์.....	72
ก1.(ข) วิธีนับเซลล์ในแต่ละช่อง A, B, C, D, E .....	72
ค1. FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ <i>S. bayanus</i> EC1118 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	86
ค2. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ <i>S. bayanus</i> EC1118 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟ ส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	86
ค3. FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup> ในช่วงเลขคลื่น 925- 1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	87
ค4. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup> ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟ ส่วนบน).....	87
ค5. FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> FT1 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	88

ภาพที่	หน้า
ค6. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> FT1 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	88
ค7. FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> Sc90 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	89
ค8. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> Sc90 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	89
ค9. FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	90
ค10. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	90
ค11. FTIR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน Laminarin ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	91
ค12. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบีตากลูแคนทางการค้า (Innovacan <sup>®</sup> ) ในช่วงเลขคลื่น 925-1190 $\text{cm}^{-1}$ ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน).....	91
จ1. ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเงื่อนไขและความเค้นเงื่อนไขของสารแขวนลอย บีตากลูแคนความเข้มข้น 10% จากยีสต์ โดยที่ (ก) <i>S. bayanus</i> EC1118; (ข) <i>S. cerevisiae</i> FT1; (ค) <i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup> ; (ง) <i>S. cerevisiae</i> Sc90; (จ) สารสกัดทางการค้า (Innovacan <sup>®</sup> ).....	97

## บทที่ 1

### บทนำ

ปีตากุลูแคนจัดเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของ กลูโคสต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกแบบปีตา ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำสารสกัดปีตากุลูแคนมาใช้ ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ กันอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหารมนุษย์และสัตว์ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมยา ตัวอย่างการใช้ประโยชน์จากปีตากุลูแคนใน อุตสาหกรรมอาหารได้แก่ การใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด สารเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำและ น้ำมัน สารเพิ่มเสถียรภาพให้กับอิมัลชัน สารทดแทนไขมัน และเป็นแหล่งของใยอาหาร (Reed และ Nagodawithana, 1991; Temelli, 1997; Temelli และ Burkus, 2000) นอกจากนี้ ปีตากุลูแคนยังเป็นสารที่มีสรรพคุณทางยา เช่น ใช้เป็นสารต้านมะเร็ง สารต้านอนุมูลอิสระ สารที่ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของแอนติไบโอติก และเป็นสารที่ช่วยลดระดับ LDL คอเลสเตอรอลใน ร่างกาย (Kim, Chang และ Yun, 2004) ในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตปีตากุลูแคนมีอยู่ใน หลายประเทศ โดยส่วนใหญ่มักเป็นประเทศที่มีความเจริญก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี และมีอุตสาหกรรมเบียร์ภายในประเทศ เช่น เยอรมนี ญี่ปุ่น แคนาดา และจีน (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2549)

ปีตากุลูแคนสามารถผลิตได้จากธัญพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโอ๊ตและข้าวบาร์เลย์ นอกจากนี้ยังสามารถสกัดได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น เชื้อราและยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งใน ปัจจุบันการสกัดปีตากุลูแคนที่เป็นที่นิยมและมีการสกัดเพื่อใช้ประโยชน์เป็นจำนวนมาก ก็คือการ สกัดสารปีตากุลูแคนจากผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (สำนักงานนวัตกรรม แห่งชาติ, 2549; Manners Masson และ Patterson, 1973; Bohn และ BeMiller, 1995; Jamas Rha และ Sinskey, 1991) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าปีตากุลูแคนที่สกัดจากยีสต์ต่างชนิดและ สายพันธุ์จะมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลให้ปีตากุลูแคนมีสมบัติแตกต่างกันด้วย แต่ยังไม่ มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบโครงสร้างและสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดปีตากุลูแคนที่ผลิตมา จากยีสต์ *Saccharomyces* ต่างชนิดและสายพันธุ์กันอย่างชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะ ศึกษาในหัวข้อดังกล่าว ซึ่งคาดว่าข้อมูลที่ได้จะเป็นแนวทางในการหายีสต์สายพันธุ์ที่เหมาะสมเพื่อ นำมาใช้ในการสกัดปีตากุลูแคนที่ให้ผลผลิตสูงและมีสมบัติที่เท่าเทียมหรือดีกว่าปีตากุลูแคนจาก ยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae* ที่มีจำหน่ายทางการค้าในปัจจุบันได้

## บทที่ 2

### วารสารปริทัศน์

#### 2.1 ยีสต์ (Yeast)

##### 2.1.1 ขนาด รูปร่างและโครงสร้างของเซลล์ยีสต์

ยีสต์ จัดเป็นรากลุ่มหนึ่งซึ่งโดยส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีโครงสร้างเป็นเซลล์ยูคาริโอต ขนาดและรูปร่างของเซลล์ยีสต์นั้นจะขึ้นอยู่กับชนิด อายุ และสภาพแวดล้อม โดยทั่วไปจะมีความกว้างของเซลล์ประมาณ 2.5–10.5  $\mu\text{m}$  และมีความยาวประมาณ 4.5–21  $\mu\text{m}$  เซลล์ยีสต์ 1 เซลล์ จะมีปริมาตรประมาณ 40  $\mu\text{m}^2$  และมีน้ำหนักแห้งประมาณ  $1 \times 10^{-10}$  g โดยเฉลี่ย ส่วนรูปร่างของเซลล์ยีสต์มีหลายแบบ ได้แก่ กลม (round, spheroidal, spherical) เช่น *Citeromyces* spp., รี (ellipsoidal) หรือ รูปไข่ (oval, ovoidal) เช่น *Saccharomyces* spp., สามเหลี่ยม (triangular) เช่น *Trigonopsis* spp., รีและปลายด้านหนึ่งแหลม (ogival หรือ boat) เช่น *Dekkera* spp. และ *Brettanomyces* spp., กระจุกที่มีปลายมน เช่น *Schizosaccharomyces* spp. มะนาวฝรั่ง (apiculate) เช่น *Hanseniaspora* spp. และ *Saccharomyces* spp., ฟลัสก์ (flask) เช่น *Pityosporon* spp., ยาว (elongated), เป็นสาย (filamentous) เช่น *Candida* spp. ยีสต์บางชนิดมีการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) เช่น *C. albicans* และ *C. boidinii* และบางชนิดสร้างเส้นใยแท้ (true mycelium) เช่น ทุกสปีชีส์ของ *Trichosporon* spp. การสืบพันธุ์ของยีสต์สามารถสืบพันธุ์ทั้ง 2 แบบ คือ แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ และแบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือแบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ไม่มีแฟลกเจลลาหรืออวัยวะอื่นที่ใช้ในการเคลื่อนที่ (นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544; สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549; Ray และ Bhunia, 2008)

โดยทั่วไปเซลล์ของยีสต์ประกอบด้วยโครงสร้างต่างๆ ดังนี้ คือ ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane หรือ plasma membrane) เพอริพลาซึม (periplasm) นิวเคลียส (nucleus) ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) แวกิวโอล (vacuole) และ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) (Matile และคณะ, 1969; Walker, 1998)

## 2.1.2 ประโยชน์ของยีสต์ในอุตสาหกรรม

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มีมนุษย์รู้จักนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางมาเป็นเวลานาน นับตั้งแต่เมื่อ 6000 ปีก่อนคริสตศักราช มนุษย์ได้มีการนำยีสต์มาใช้ผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งซึ่งเรียกว่า Boozar ต่อมาได้มีการนำยีสต์มาใช้ในการผลิตไวน์ ขนมอบัง วิสกี้ และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ตามลำดับ และในปัจจุบันได้มีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งตัวอย่างยีสต์ที่นำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมมีดังนี้

### 2.1.2.1 ยีสต์สำหรับการผลิตเอทานอล

ยีสต์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม คือ *S. cerevisiae*, *S. uvarum* (*carlsbergensis*), *Schizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces fragilis* สำหรับ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น ดังนั้นในปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549)

### 2.1.2.2 ยีสต์สำหรับการผลิตไวน์

ไวน์ยีสต์ (wine yeast) มีความหมายกว้างๆ คือยีสต์ที่พบบนผลองุ่นและร่วมในการหมักน้ำองุ่น แต่ความหมายที่แคบลงมาก็คือยีสต์ที่เลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทำไวน์ และเกือบทั้งหมดเป็น *S. cerevisiae* (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549)

### 2.1.2.3 ยีสต์สำหรับการผลิตเบียร์

ยีสต์ที่ใช้สำหรับการผลิตเบียร์ที่เรียกว่าบรีวเวอร์สยีสต์ (brewer's yeast) หรือ บรีวิงยีสต์ (brewing yeast) ที่สำคัญแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามความแตกต่างของการหมัก คือ ท็อปเฟอร์เมนติงยีสต์ คือ *S. cerevisiae* ใช้ผลิตเอลเบียร์ (ale beer) ลักษณะในการหมักก็คือในระหว่างการหมักเชื้อจะกระจายอย่างสม่ำเสมอในซบัสเตรตที่อยู่ในถังหมัก แต่เมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุดเชื้อจะถูกก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ดันให้ลอยขึ้นมาอยู่บนผิวหน้าเป็นชั้นหนา

บอตทอมเฟอร์เมนติงยีสต์ คือ *S. uvarum* (*carlsbergensis*) ที่ใช้ในการผลิตลาเกอร์เบียร์ (lager beer) ลักษณะในการหมักก็คือในระหว่างการหมักเชื้อจะกระจายอย่างสม่ำเสมอในซบัสเตรตที่อยู่ในถังหมัก แต่เมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุดเชื้อจะจับกลุ่มตกตะกอนลงสู่ก้นของถังหมัก (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549)

#### 2.1.2.4 ยีสต์ขนมปัง

ยีสต์ขนมปัง (baker's yeast) เป็นยีสต์ที่มีความคงทนทางด้านสรีรวิทยา ซึ่งเป็นที่รู้จักดีในด้านการนำไปใช้ทำให้โดขนมปังขึ้นฟู โดยเมื่อผสมยีสต์ขนมปังกับแป้งสาลีที่ขึ้นและมีน้ำตาลอยู่แล้วเล็กน้อยยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งจะถูกกักอยู่ภายในแป้งโดเมื่อมีปริมาณมากจะเป็นสาเหตุให้โดขึ้นฟู เมื่อนำขนมปังที่ขึ้นฟูนั้นไปอบความร้อนจะไล่คาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอลออกไปเหลืออุรูนทิ้งไว้ในก้อนขนมปังทำให้ขนมปังมีลักษณะโปร่งเบา นุ่มฟู ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะ นอกจากนั้นยีสต์ยังให้รสชาติที่จำเพาะกับขนมปัง และยังช่วยเพิ่มคุณค่าอาหารของขนมปังด้วย (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549; สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2549)

#### 2.1.2.5 ยีสต์อาหารคนและยีสต์อาหารสัตว์

ปัจจุบันยีสต์ถูกใช้เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของอาหารสัตว์ที่เรียกว่าฟีดยีสต์ (feed yeast) หรือฟอดเดอร์ยีสต์ (fodder yeast) และอาจใช้เป็นอาหารเสริม (nutritional supplement) หรือสารปรุงแต่งรส (flavor additive) ในอาหารสำหรับคน เชลล์ยีสต์มีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นประโยชน์หลายอย่าง คือ มีโปรตีน 47-50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งพบว่าโปรตีนในเชลล์ยีสต์นั้นมีกรดอะมิโนจำเป็นอย่างครบถ้วน โดยเฉพาะกรดอะมิโนไลซีน มีคาร์โบไฮเดรต 30-35% ซึ่งประกอบด้วยไกลโคเจน กลูแคน และแมนแนน มีไนโตรเจน 7.5-9% กรดนิวคลีอิก 6-12% ไขมัน 5-9.5% และไขมัน 2-6% นอกจากนั้นยีสต์ยังประกอบด้วยวิตามินหลายชนิด เช่น วิตามินบีรวม และยังประกอบด้วยเกลือแร่ที่จำเป็นต่อคนและสัตว์อีกหลายชนิด เช่น โครเมียม ซีลีเนียม โมลิบดีนัม และสังกะสี ยีสต์ไม่เพียงจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นประโยชน์หลายอย่างตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น แต่ยังมีรสชาติที่ดีช่วยเพิ่มความน่ารับประทานของอาหาร ดังนั้นยีสต์จึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของอาหารสัตว์และใช้เป็นแหล่งธาตุอาหารเสริมหรือเพิ่มรสชาติของอาหารคนและสัตว์ ตัวอย่างยีสต์ที่ใช้เป็นอาหารคนและสัตว์มีหลายชนิดได้แก่ *Candida*, *Kluyveromyces*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* และ *Saccharomyces* spp. (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549)

ปัจจุบันยีสต์มีอยู่ประมาณ 93 สกุล และ 678 สปีชีส์ (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549) มีหลายสกุลที่ได้ศึกษาค้นคว้าว่ามีประโยชน์ต่อมนุษย์ แต่ยีสต์ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมนั้นมีเพียงไม่กี่สกุล ตัวอย่างสกุลที่เป็นที่รู้จักและนิยมนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ *Saccharomyces* spp. โดยเฉพาะยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่จัดอยู่ใน Phylum Eumycetes, Class Acetomycetes, Order Saccharomyces, Family Saccharomycetaceae, Sub-family Saccharomycetoidae, Genus *Saccharomyces*, Species *S. cerevisiae* จาก



การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับยีสต์ในกลุ่ม *Saccharomyces* spp. ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันจึงได้ทราบรายละเอียดเกี่ยวกับองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ในกลุ่มนี้ จึงทราบว่าไม่เพียงเซลล์ยีสต์เท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้ แต่ยังมีสารสกัดจากเซลล์ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษ และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อีกด้วย เช่น ยีสต์สกัด (yeast extract) สารสกัดแมนแนน ( $\alpha$ -mannans) และสารสกัดบีตาไกลูแคน ( $\beta$ -glucans) เป็นต้น

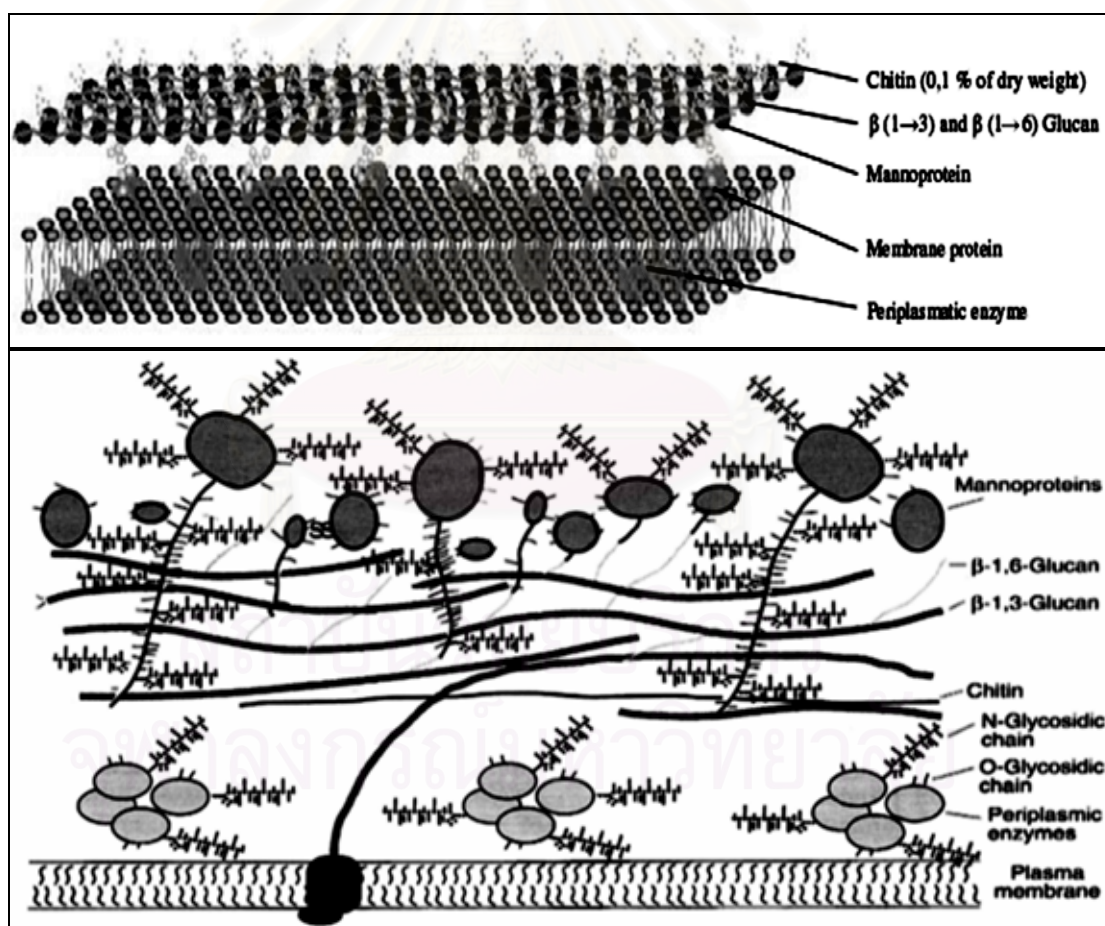
## 2.2 องค์ประกอบและโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces* spp.

ผนังเซลล์ของยีสต์เป็นโครงสร้างที่มีความแข็งแรง และเหนียว มีความหนาประมาณ 100-200 nm และคิดเป็น 15-25% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง (Fleet, 1991; Nguyen และคณะ, 1998; Kim และ Yun, 2006 ) องค์ประกอบและโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ จะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ แต่โดยส่วนใหญ่ผนังเซลล์ยีสต์จะประกอบด้วยบีตาไกลูแคนและแมนโนโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก และมีไคติน ไชมัน และสารอินทรีย์ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบส่วนน้อย ส่วนโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์จะประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น คือ ผนังชั้นในกับผนังชั้นนอก ผนังชั้นในจะเป็นส่วนที่อยู่ติดกับเซลล์เมมเบรนซึ่งประกอบด้วยบีตาไกลูแคนและไคติน โดยบีตาไกลูแคนที่พบที่ผนังชั้นในจะมีอยู่ 2 ชนิด คือ  $\beta$ -1,3 และ  $\beta$ -1,6 กลูแคน ซึ่งจะเชื่อมต่อกับไคติน หน้าที่หลักของบีตาไกลูแคนคือทำให้เซลล์คงรูปร่างและป้องกันการแตกของเซลล์ (osmotic layer) ส่วนผนังชั้นนอกประกอบด้วยแมนโนโปรตีนซึ่งจะสร้างพันธะโควาเลนต์เชื่อมต่อกับบีตาไกลูแคนที่อยู่ผนังชั้นใน โดยส่วนใหญ่แมนโนโปรตีนจะทำหน้าที่เป็น surface properties ของเซลล์และเป็นแหล่งเก็บ periplasmic protein (Fleet, 1991; Kim และ Yun, 2006) ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ และโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์แสดงดังตารางที่ 2.1 และรูปที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ส่วนประกอบของผนังเซลล์	ปริมาณ (% ของน้ำหนักผนังเซลล์แห้ง)
แมนแนน (Mannan)	25-50
บีตากลูแคน ( $\beta$ -Glucan)	30-60
ไคติน (Chitin)	1-2
โปรตีน (Proteins)	13
ไขมัน (Lipid)	2-14

ที่มา: Fleet, 1991



รูปที่ 2.1 องค์ประกอบและโครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : Schreuder และคณะ, 1996; Palomero และคณะ, 2009

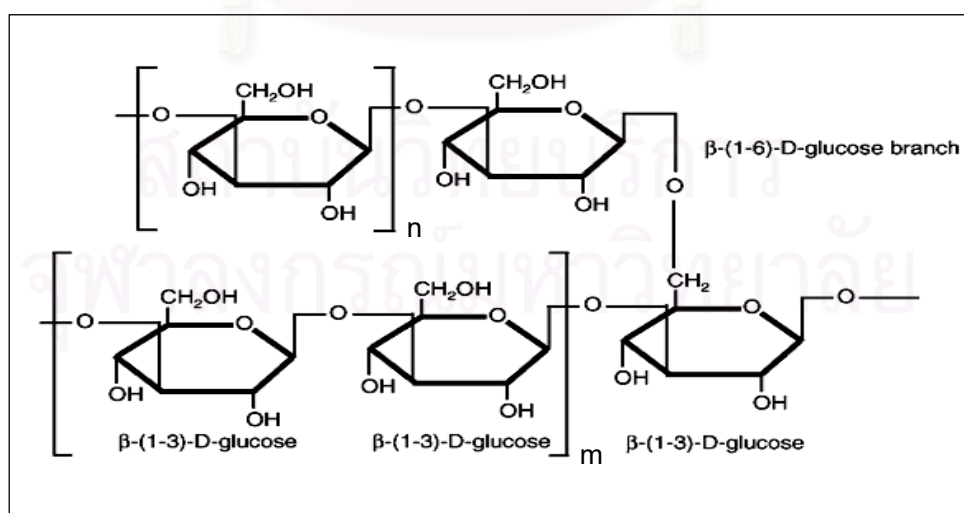
## 2.3 ปีตากุลแคนจากยีสต์ *Saccharomyces* spp.

### 2.3.1 ชนิดและโครงสร้างของปีตากุลแคน

ปีตากุลแคนจากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces* spp. เป็นโฮโมพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดปีตา มีปริมาณสูงถึง 30-60% ของน้ำหนักผนังเซลล์แห้ง (Fleet, 1991) จึงจัดเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ยีสต์ โดยทั่วไปโมเลกุลของปีตากุลแคนที่พบในผนังเซลล์ของยีสต์จะมีอยู่ 2 ชนิด คือ

#### 2.3.1.1 ปีตากุลแคนที่เป็นเส้นตรง

$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-linked glucan ชนิดที่ไม่ละลายทั้งในด่างและกรด มีลักษณะเป็นโมเลกุลสายตรงมีกิ่งก้านเล็กน้อย ซึ่งโมเลกุลจะประกอบด้วยโพลิเมอร์สายหลัก ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส 1500 โมเลกุลมาเรียงต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด  $\beta$ -1,3 และมีโพลิเมอร์สายกิ่ง ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส 40-50 โมเลกุล มาเชื่อมต่อกับโพลิเมอร์สายหลักด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด  $\beta$ -1,6 และพบว่าปีตากุลแคนชนิดนี้มีปริมาณเป็น 85% ของปีตากุลแคนทั้งหมดที่พบในผนังเซลล์ยีสต์ (Manners และคณะ, 1973; Kapteyn Ende และ Klis, 1999; Klis และคณะ, 2002; Freimund และคณะ, 2003; Liu และคณะ, 2008) (รูปที่ 2.2)

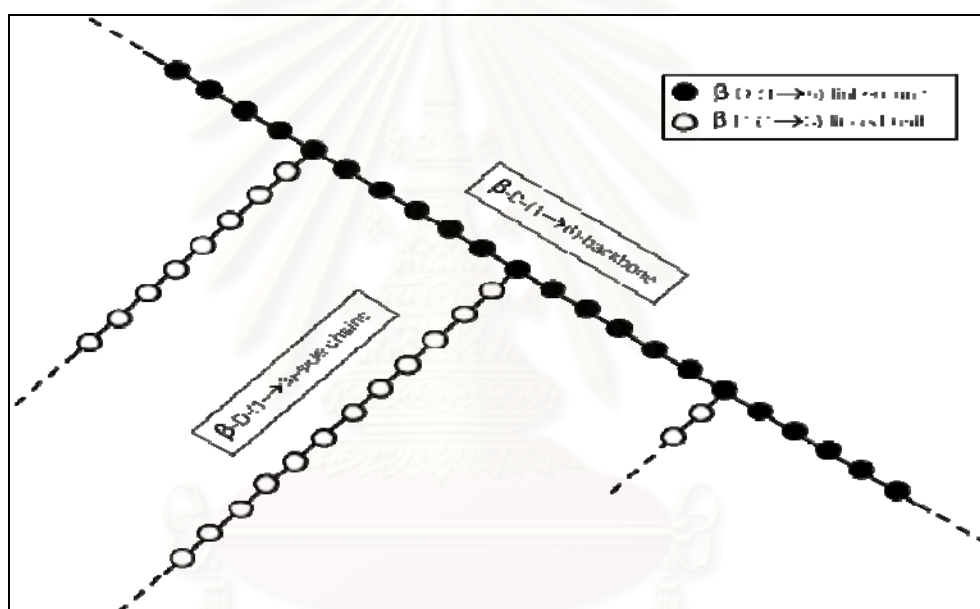


รูปที่ 2.2 โครงสร้างของ  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-linked glucan ชนิดที่ไม่ละลายทั้งในด่างและกรด

ที่มา : Volman และคณะ, 2008

### 2.3.1.2 บีตาไกลูแคนที่เป็นกิ่งก้าน

$\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-linked glucan ชนิดที่ไม่ละลายทั้งในน้ำและละลายในกรด มีลักษณะเป็นโมเลกุลสายตรงที่มีกิ่งก้านมากมาย โดยพอลิเมอร์สายหลักจะประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 600 โมเลกุลมาต่อเชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด  $\beta$ -1,6 เป็นสายยาว และมีพอลิเมอร์สายกิ่ง ซึ่งจะเชื่อมต่อกับพอลิเมอร์สายหลักด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด  $\beta$ -1,3 และพบว่าบีตาไกลูแคนชนิดนี้มีปริมาณเป็น 15% ของบีตาไกลูแคนทั้งหมดที่พบในผนังเซลล์ยีสต์ (Manners และคณะ, 1973; Klis และคณะ, 2002; Freimund และคณะ, 2003; Liu และคณะ, 2008) (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-linked glucan

ที่มา : Iorio และคณะ, 2008

## 2.4 การสกัดบีตาไกลูแคนจากเซลล์ยีสต์

ยีสต์เป็นแหล่งผลิตบีตาไกลูแคนที่สำคัญเนื่องจากเซลล์ยีสต์นั้นมีบีตาไกลูแคนในปริมาณสูง เจริญเติบโตเร็ว ใช้ต้นทุนต่ำในการผลิต และให้บีตาไกลูแคนที่มีสมบัติพิเศษต่างๆ มากมาย การสกัดบีตาไกลูแคนจากยีสต์มีอยู่หลากหลายวิธี ซึ่งการสกัดแบบดั้งเดิมที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมคือ การสกัดด้วยน้ำและกรด โดยน้ำจะช่วยให้สกัดแยกโปรตีน กรดนิวคลีอิก แมนแนน กลูแคนที่ละลายในน้ำ และลิพิดที่มีขี้ ส่วนกรดจะช่วยให้แยกไกลโคเจน (glycogen) ไคติน (chitin) ไคโตซาน (chitosan) และโปรตีนส่วนที่เหลือ วิธีนี้จะให้ผลผลิตบีตาไกลูแคน

ประมาณ 13% (w/w) ของผนังเซลล์ยีสต์ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนในรูปของกลูโคส (ไม่รวมกลูโคสที่ได้จากไกลโคเจน) พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีบีตากลูแคน 55% ของน้ำหนักแห้ง (Thammakiti และคณะ, 2004) ข้อดีของการสกัดด้วยวิธีนี้คือเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย สะดวก ใช้เวลาสั้น และต้นทุนการผลิตต่ำ แต่มีข้อเสียคือต้องใช้สารเคมีจำนวนมาก มีน้ำทิ้งจากกระบวนการสกัดในปริมาณมาก ได้บีตากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์ต่ำและโครงสร้างบีตากลูแคนอาจถูกทำลายบางส่วน (Wang Yao และ Wu, 2003) อย่างไรก็ตามหากมีการดัดแปลงการสกัด เช่น เพิ่มขั้นตอนการโฮโมจีไนซ์ (homogenize) เซลล์ยีสต์ก่อนการสกัด สกัดซ้ำหลายๆ รอบ หรือเพิ่มขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์หลังการสกัด ก็จะช่วยเพิ่มผลผลิตบีตากลูแคนให้เพิ่มมากขึ้นได้ (Wheatcroft และคณะ, 2002; Thammakiti และคณะ, 2004) นอกจากนี้ยังมีการสกัดแบบอื่นๆ อีก เช่น การใช้โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) ในการออกซิไดส์เซลล์ยีสต์ที่ผ่านการย่อยสลายตัวเอง (autolysed cell) เพื่อแยกโปรตีน กรดนิวคลีอิก ลิพิด และแมนแนนออก ซึ่งวิธีนี้มีข้อดี คือให้ผลผลิตบีตากลูแคนสูงถึง 22.9 % (w/w) ของผนังเซลล์ยีสต์ และมีต้นทุนต่ำ ข้อเสียคือใช้เวลานาน (Wang และคณะ, 2003) และการสกัดโดยใช้ภาวะในการสกัดที่ไม่รุนแรง กล่าวคือ สกัดในน้ำอุณหภูมิ 125 °C ที่ pH 7 และตามด้วยการใช้เอนไซม์โปรติเอส เมื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนในรูปของกลูโคส พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีบีตากลูแคนสูงถึง 92% ของน้ำหนักแห้ง และได้ผลผลิตสูงถึง 26 % (w/w) ของผนังเซลล์ยีสต์ (Freimund และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังมีการสกัดบีตากลูแคนโดยใช้ภาวะในการสกัดที่ไม่รุนแรงวิธีใหม่ ซึ่งมีการเพิ่มขั้นตอนทางเคมีและกายภาพ ได้แก่ เพิ่มขั้นตอนการทำเซลล์ยีสต์ให้บริสุทธิ์เบื้องต้น (preliminary purification) และการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยีสต์แตก (induced autolysis) ก่อนการสกัดด้วยน้ำร้อน และมีเพิ่มการโฮโมจีไนส์และการสกัดด้วยอะซิโตนก่อนการใช้เอนไซม์โปรติเอส เมื่อวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนในรูปของกลูโคส พบว่าสารสกัดดังกล่าวมีบีตากลูแคนสูงถึง 93% ของน้ำหนักแห้ง และได้ผลผลิตสูงถึง 21% ของน้ำหนักผนังเซลล์ยีสต์แห้ง (Liu และคณะ, 2008) จะเห็นได้ว่าการสกัดบีตากลูแคนโดยใช้ภาวะในการสกัดที่ไม่รุนแรงนี้มีข้อดีคือให้ผลผลิตบีตากลูแคนปริมาณสูง ได้สารสกัดบีตากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์สูง และโครงสร้างบีตากลูแคนไม่ถูกทำลาย แต่มีข้อเสียก็คือเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน และต้นทุนการผลิตสูง จึงเหมาะที่จะใช้สกัดบีตากลูแคนเพื่อใช้ในการแพทย์หรือใช้ในงานที่ต้องการบีตากลูแคนที่มีความบริสุทธิ์สูง

## 2.5 การนำบีตาไกลูแคนที่สกัดจากยีสต์ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ

### 2.5.1 สรรพคุณทางยาของบีตาไกลูแคนจากยีสต์ (Chen และ Seviour, 2007)

ในปัจจุบันมีงานวิจัยทางการแพทย์หลายฉบับที่กล่าวถึงสรรพคุณทางยาของสารสกัดบีตาไกลูแคนที่สกัดจากยีสต์ ดังตัวอย่างต่อไปนี้

2.5.1.1 ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมีกลไกที่เกี่ยวข้องของหลายประการเช่น บีตาไกลูแคนสามารถจับที่ตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage เพื่อกระตุ้นการทำงานของ macrophage จึงทำให้มีความสามารถในการทำลายเชื้อก่อโรคอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และช่วยควบคุมการหลั่ง cytokines เช่น interleukins เพื่อกระตุ้นการสื่อสารระหว่างเซลล์ต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน

2.5.1.2 มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง โดยมีกลไกที่เป็นไปได้เช่น บีตาไกลูแคนจะช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด macrophage ซึ่งทำหน้าที่กำจัดเซลล์ที่แบ่งตัวผิดปกติ รวมทั้งเซลล์มะเร็ง และยังช่วยกระตุ้นการสร้างเซลล์ natural killer cell ซึ่งทำหน้าที่กำจัดเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจง

2.5.1.3 ช่วยลดปริมาณคอเลสเตอรอล โดยพบว่าผู้ที่ได้รับบีตาไกลูแคนจากยีสต์โดยเฉลี่ย 15 g/day เป็นประจำอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้ปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมดในกระแสเลือดลดลง และช่วยเพิ่มปริมาณคอเลสเตอรอลชนิด high density lipoprotein cholesterol จึงช่วยลดความเสี่ยงจากโรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) ซึ่งกลไกของกระบวนการดังกล่าว ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

เนื่องจากสารสกัดบีตาไกลูแคนที่สกัดจากยีสต์มีสรรพคุณทางยาต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงมีการนำสารสกัดบีตาไกลูแคนมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางกันอย่างแพร่หลาย

### 2.5.2 การใช้บีตาไกลูแคนในผลิตภัณฑ์อาหาร

บีตาไกลูแคนเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีสมบัติไม่สามารถละลายน้ำที่อุณหภูมิห้อง แต่มีความสามารถในการอุ้มน้ำ และให้ความหนืดกับสารละลาย รวมทั้งยังมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารดูดซับไขมัน สารที่ทำให้เกิดความคงตัวในระบบอิมัลชัน สารทดแทนไขมัน และเป็นแหล่งของใยอาหาร (Reed และ Nagodawithana, 1991; Temelli, 1997;

Temelli และ Burkus, 2000) ในปัจจุบันบีตากลูแคนที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่จะสกัดมาจากธัญพืช เช่น ข้าวโอ๊ต และข้าวบาร์เลย์ (Morgan, 2000) ส่วนบีตากลูแคนจากยีสต์มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมยา อาหารเสริม และเครื่องสำอาง แต่การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารยังไม่เป็นที่นิยม งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการนำบีตากลูแคนไปใช้ในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ในผลิตภัณฑ์อาหารยังมีจำกัดซึ่งสามารถสรุปได้ดังนี้

Worrasinchai และคณะ (2006) ศึกษาสมบัติทางกายภาพและลักษณะประสาทสัมผัสของมายองเนสที่ทดแทนไขมันด้วยสารสกัดบีตากลูแคนในสัดส่วนการแทนที่ 25% 50% และ 75% เมื่อประเมินพฤติกรรมวิสโคอีลาสติก (viscoelastic behavior) ของตัวอย่างโดยใช้การทดสอบแบบ dynamic shear (frequency sweep test) ด้วยเครื่อง rheometer พบว่าตัวอย่างมายองเนสทุกสูตรมีสมบัติเป็นเจลอย่างอ่อน เนื่องจากมีค่า storage modulus ( $G'$ ) มากกว่าค่า loss modulus ( $G''$ ) ตลอดช่วงความถี่ที่วิเคราะห์ (0.1-100 Hz) และยังพบว่าเมื่อเพิ่มบีตากลูแคนจากสัดส่วนการแทนที่ 25% เป็น 50% หรือ 75% ให้ค่า  $G'$  สูงขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับอนุภาคของหยดน้ำมันที่มีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) จากการวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัสของตัวอย่างด้วยเครื่อง texture analyzer พบว่าตัวอย่างที่เติมบีตากลูแคนในสัดส่วนการแทนที่ 50% และ 75% มีค่าความแน่นเนื้อและการเกาะตัวใกล้เคียงกับสูตรควบคุม อย่างไรก็ตามจากการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยใช้ 9-point hedonic scale พบว่าคะแนนการยอมรับด้านเนื้อสัมผัสและรสชาติของตัวอย่างที่เติมบีตากลูแคนในสัดส่วนการแทนที่ 75% มีค่าต่ำกว่าสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) แม้ว่าค่าความแน่นเนื้อและการเกาะตัวจะใกล้เคียงกับสูตรควบคุม คะแนนการยอมรับด้านลักษณะปรากฏและสีของตัวอย่างที่ทดแทนไขมันด้วยบีตากลูแคนทุกสัดส่วนการแทนที่มีค่าน้อยกว่าสูตรควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ส่วนคะแนนการยอมรับด้านความชอบโดยรวมของตัวอย่างมีค่าลดลงตามสัดส่วนการแทนที่ของบีตากลูแคนที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามก็ตีตัวอย่างที่เติมบีตากลูแคนในสัดส่วนการแทนที่ 75% เป็นเพียงสูตรเดียวที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ (คะแนนการยอมรับโดยรวมน้อยกว่า 5) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากลักษณะด้านเนื้อสัมผัสและรสชาติ ดังนั้นจึงสามารถทดแทนไขมันด้วยบีตากลูแคนที่ระดับการแทนที่สูงสุด 50% ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์มายองเนสสูตรไขมันต่ำที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสและความคงตัวใกล้เคียงกับสูตรควบคุมและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

Satrapai และ Suphantharika (2007) ศึกษาผลของสารสกัดบีตากลูแคนจากบริวเวอร์สยีสต์ต่อการเกิดเจลลาติโนเซชันและรีโทรเกรเดชันของแป้งข้าว จากการศึกษากการเปลี่ยนแปลงความหนืดของตัวอย่างด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer ของตัวอย่างแป้งข้าวที่

ผสมปีตากลูแคนที่สัดส่วนน้ำหนักแป้งข้าวต่อน้ำหนักปีตากลูแคนเป็น 5.7:0.3 5.4:0.6 และ 5.0:1.0 พบว่าเมื่อเพิ่มปีตากลูแคนในสัดส่วนที่สูงขึ้น ทำให้อุณหภูมิเริ่มเกิดความหนืด (pasting temperature) ของตัวอย่างลดลง แต่ความหนืดสูงสุด (peak viscosity) ความหนืดที่ลดลง (breakdown viscosity) ความหนืดสุดท้าย (final viscosity) และเซตแบค (setback viscosity) ของตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของตัวอย่างด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter พบว่าเมื่อเพิ่มปีตากลูแคนในสัดส่วนที่สูงขึ้น กลับทำให้อุณหภูมิการเกิดเจลที่ในเซชันเพิ่มขึ้น แต่เอนทาลปีของการเกิดเจลที่ในเซชัน (gelatinization enthalpy) ของตัวอย่างลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าเอนทาลปีของการหลอมผลึกแอมิโลเพกตินที่เกิดจากรีโทรเกรดชัน (retrogradation enthalpy) และการแยกตัวของน้ำ (syneresis) ของตัวอย่างที่เก็บไว้ที่ 4 °C นาน 21 วัน มีค่าลดลง เมื่อสัดส่วนปีตากลูแคนในตัวอย่างเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าปีตากลูแคนช่วยชะลอการเกิดรีโทรเกรดชันของเจลแป้งข้าวระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานานได้

## 2.6 ผลของชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์ต่อปริมาณ โครงสร้าง และสมบัติต่างๆ ของปีตากลูแคนจากยีสต์

จากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าปีตากลูแคนที่สกัดได้จากยีสต์ต่างสายพันธุ์ต่างชนิด และต่างสายพันธุ์ จะมีความแตกต่างกันทั้งในเชิงปริมาณ โครงสร้าง และสมบัติต่างๆดังตัวอย่างต่อไปนี้

Nakajima และคณะ (1988) ได้ศึกษาความแตกต่างทางด้านโครงสร้างของสารประกอบประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ดั้งเดิมกับสายพันธุ์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ 2 สายพันธุ์ได้แก่ N3 และ N3-8 เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดปีตากลูแคนที่ละลายในต่างโดยใช้เทคนิค gel filtration chromatography พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของสารดังกล่าวที่สกัดจากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมมีค่า  $1.9 \times 10^5$  ซึ่งมากกว่าค่าดังกล่าวที่ได้จากสารที่พบในยีสต์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งมีค่าประมาณ  $9 \times 10^4$  และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของปีตากลูแคนที่ละลายในต่างโดยใช้วิธี methylation analysis ร่วมกับการย่อยสลายปีตากลูแคนด้วยเอนไซม์  $\beta$ -1,3-glucanase พบว่ายีสต์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์มีสัดส่วนของพันธะ  $\beta$ -1,6-D-ไกลโคซิดิกในโมเลกุลปีตากลูแคนสูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 2-4 เท่า



Jamas Rha และ Sinsky (1989 1991 และ 1992) ได้ศึกษาวิธีการสกัดปีตาไกลูแคนและศึกษาองค์ประกอบ โครงสร้าง และสมบัติของปีตาไกลูแคนที่สกัดจากยีสต์ 32 สายพันธุ์ จำแนกตามจีนัสได้ดังนี้คือ *Saccharomyces* spp. 10 สายพันธุ์ (ประกอบด้วย *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์) *Schizosaccharomyces* spp. 1 สายพันธุ์ *Kluyveromyces* spp. 3 สายพันธุ์ *Candida* spp. 4 สายพันธุ์ *Hansenula* spp. 7 สายพันธุ์ *Pichia* spp. 5 สายพันธุ์ และ *Torulopsis* spp. 2 สายพันธุ์ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดปีตาไกลูแคนจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีส่วนของพันธะ  $\beta$ -1,3-D-ไกลโคซิดิก และพันธะ  $\beta$ -1,6-D-ไกลโคซิดิก ( $\beta$ -(1,3:1,6)) ในโมเลกุลปีตาไกลูแคนที่แตกต่างกัน และยังพบว่าปีตาไกลูแคนที่สกัดจากสายพันธุ์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ (*S. cerevisiae* R4) มีสัดส่วนของพันธะ  $\beta$ -1,6-D-ไกลโคซิดิกในโมเลกุลปีตาไกลูแคนมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (*S. cerevisiae* A364A) ซึ่งสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ในโมเลกุลปีตาไกลูแคนที่แตกต่างกัน จะส่งผลให้สมบัติในด้านต่างๆของสารสกัดปีตาไกลูแคนแตกต่างกันด้วย โดยพบว่าสารสกัดที่ประกอบด้วยโมเลกุลปีตาไกลูแคนที่มีสัดส่วนของพันธะ  $\beta$ -1,6-D-ไกลโคซิดิกลดลง เป็นผลให้มีความสามารถในการอุ้มน้ำ การให้ความหนืด และทนต่อการไฮโดรลิซิสโดยเอนไซม์  $\beta$ -(1,3) glucanase ได้มากขึ้น

Ha และคณะ (2002) ตรวจสอบปริมาณและวิเคราะห์โครงสร้างของปีตาไกลูแคนที่สามารถละลายได้ในน้ำซึ่งสกัดจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ดั้งเดิม (JH) และสายพันธุ์ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตอีก 2 สายพันธุ์ (JUL1 และ JUL3) พบว่าสารสกัดจากยีสต์ JUL1 และ JUL3 มีปริมาณปีตาไกลูแคนที่ละลายได้ในน้ำ 30.0 และ 33.8 mg/g เซลล์ยีสต์แห้ง ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าปริมาณดังกล่าวของสารสกัดจากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม ประมาณ 10 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดปีตาไกลูแคนจากที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ 2 สายพันธุ์มีส่วนของ  $\beta$ -1,6-D-ไกลโคซิดิกภายในโมเลกุลปีตาไกลูแคนเพิ่มขึ้นเมื่อพิจารณาจาก  $^{13}\text{C}$ -NMR สเปกตรัม ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากงานวิจัยทั้งสองที่กล่าวมาข้างต้น และความแตกต่างของโครงสร้างปีตาไกลูแคนในลักษณะดังกล่าวอาจส่งผลให้สารสกัดจากยีสต์ JUL1 และ JUL3 มีความทนทานต่อเอนไซม์ Laminarinase มากกว่าสารสกัดจากสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 273 และ 305 เท่าตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของปีตาไกลูแคนโดยใช้ high-performance size-exclusion chromatography พบว่าปีตาไกลูแคนจากยีสต์ JUL1 และ JUL3 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ  $2.81 \times 10^6$  และ  $1.72 \times 10^6$  ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าน้ำหนักโมเลกุลของปีตาไกลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม (มีน้ำหนักโมเลกุล  $6.0 \times 10^5$ ) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวขัดแย้งกับงานวิจัยของ Nakajima และคณะ (1988) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของยีสต์ที่

นำมาใช้สกัด วิธีการทำให้เซลล์ยีสต์ละลายพันธุ์ และวิธีสกัดปีตากุลูแคนที่แตกต่างกันในงานวิจัยทั้งสอง

Kim และคณะ (2004) ได้ศึกษาการประมาณค่าของปริมาณปีตากุลูแคนที่สามารถละลายน้ำได้จากผนังเซลล์ของยีสต์ต่างสายพันธุ์จำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida bombicola* *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* *Myxozyma melibiosis* *Saccharomyces cerevisiae* *Candida albicans* *Yarrowia lipolytica* *Kluyveromyces marxianus* *Debaryomyces polymorphus* *Candida parapsilosis* *Yamadazyma guilliermondii* และ *Debaryomyces hansenii* var. *hansenii* โดยพิจารณาจากความทนทานต่อ Glucanex<sup>®</sup> 200 ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์  $\beta$ -1,3 glucanase และ  $\beta$ -1,6 glucanase เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (viability) ของเซลล์ยีสต์ภายหลังบ่มเชื้อในเอนไซม์ Glucanex<sup>®</sup> 200 และแอกติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าว โดยพิจารณาจากปริมาณกลูโคสที่ละลายออกจากผนังเซลล์ภายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่ายีสต์แต่ละสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและให้ปริมาณกลูโคสที่ละลายออกจากผนังเซลล์ภายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์แตกต่างกัน โดยเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง (มีความทนทานต่อ Glucanex<sup>®</sup> 200 มาก) มีแนวโน้มที่จะปลดปล่อยกลูโคสออกจากผนังเซลล์มาก และมีปริมาณปีตากุลูแคนที่ละลายน้ำได้ในผนังเซลล์สูงด้วย

## 2.7 ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR spectroscopy)

### 2.7.1 หลักการของเทคนิค FTIR spectroscopy (นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์ และคณิตา ตั้งคณานุรักษ์, 2547; เย็นหทัย แน่นหนา, 2549)

อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการดูดกลืนพลังงานในช่วงคลื่นอินฟราเรดโดยโมเลกุลของสาร แล้วทำให้พันธะภายในโมเลกุลเกิดการสั่น (vibration) หรือเกิดการหมุน (rotation) รังสีในช่วงคลื่นอินฟราเรดมีความยาวคลื่น (wave length) ประมาณ 0.78–1000  $\mu\text{m}$  หรือเลขคลื่น (wave number) ประมาณ 12800–10  $\text{cm}^{-1}$  และสามารถแบ่งช่วงคลื่นอินฟราเรดออกเป็น 3 ช่วงดังตารางที่ 2.2 ช่วงคลื่นอินฟราเรดที่นำมาใช้ประโยชน์มากในการวิเคราะห์โครงสร้างของโมเลกุลนั้นเป็นช่วงคลื่นอินฟราเรดย่านกลางเป็นส่วนใหญ่ คืออยู่ในช่วงความยาวคลื่น 2.5–25  $\mu\text{m}$  หรือช่วงเลขคลื่น 4000–400  $\text{cm}^{-1}$

ตารางที่ 2.2 ช่วงคลื่นอินฟราเรดย่านต่างๆ

ช่วงคลื่น	ความยาวคลื่น ( $\mu\text{m}$ )	เลขคลื่น ( $\text{cm}^{-1}$ )
อินฟราเรดย่านใกล้ (near IR, NIR)	0.78-2.5	12800-4000
อินฟราเรดย่านกลาง (middle IR)	2.5-50	4000-200
อินฟราเรดย่านไกล (far IR)	50-1000	200-10

ที่มา: นิพนธ์ ตั้งคณานุรักษ์ และคณิตา ตั้งคณานุรักษ์, 2547; เย็นหทัย แน่นหนา, 2549

โดยทั่วไปเทคนิคอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจะบันทึกผลค่าดูดกลืนแสงอินฟราเรดออกมาในรูปของค่าความเข้มของแสงต่อความถี่ หรือต่อความยาวคลื่น หรือต่อเลขคลื่น (wavenumber) แสดงผลในรูป frequency-domain spectrum ซึ่งได้จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความถี่ต่างๆ ที่ละครั้งในช่วงระยะเวลาหนึ่ง แต่ถ้าวัดความเข้มของแสง หรือกำลังของแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ กันอย่างต่อเนื่องเทียบกับเวลาจะเรียกว่า time-domain spectroscopy จากนั้น time-domain spectrum จะถูกเปลี่ยนเป็น frequency-domain spectrum โดยการ fourier transform ด้วยคอมพิวเตอร์ ดังนั้น fourier transform spectrum ซึ่งได้จากเทคนิค FTIR spectroscopy จึงได้จากการวัดการดูดกลืนแสงที่ความถี่ต่างๆ กัน พร้อมกันทั้งหมด ช่วยให้การวิเคราะห์หรือวัดเร็วขึ้น มีการแยก (resolution) ดีขึ้น หรือทำให้ signal-to-noise ratio เพิ่มขึ้น

### 2.7.2 การประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR spectroscopy ในทางจุลชีววิทยา

เนื่องจากเทคนิค FTIR spectroscopy เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ ไม่ทำลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ ใช้ได้กับสารได้ทุกสถานะ และใช้สารในการวิเคราะห์ปริมาณน้อย (Galichet และคณะ, 2001) ประกอบกับมีการศึกษาสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงอินฟราเรด และหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงกับโครงสร้างของสารอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้เทคนิคนี้ยิ่งได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในทางจุลชีววิทยาได้นำเทคนิคนี้มาใช้วิเคราะห์เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อประโยชน์ต่างๆ เช่น บ่งชี้และจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียและยีสต์ (Sokalingum และคณะ, 1997; Maquelin และคณะ, 2002; Sokalingum และคณะ, 2002; Essendoubi และคณะ, 2005; Garip Gozen และ Severcan, 2009) ศึกษาโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ เช่น

โปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิก และคาร์โบไฮเดรตในเซลล์ยีสต์และแบคทีเรีย (Galichet และคณะ, 2001; Marcotte และคณะ, 2007) ติดตามการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์จุลินทรีย์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เช่น การเปลี่ยนแปลงรูปร่างระหว่างการเจริญเติบโตยีสต์และรา (Adt และคณะ, 2006; Jilkine และคณะ, 2007) และการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ของยีสต์ (Burattini และคณะ, 2008)

### 2.7.3 การประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR spectroscopy ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างของเซลล์ยีสต์ ผนังเซลล์ยีสต์ และสารสกัดจากยีสต์

โดยทั่วไปแล้วค่าการดูดกลืนแสงใน FTIR สเปกตรัมในช่วงเลขคลื่นต่างๆ สามารถบ่งบอกการมีอยู่ขององค์ประกอบทางเคมีบางชนิดที่อยู่ภายในเซลล์ยีสต์ ผนังเซลล์ยีสต์ และสารสกัดจากยีสต์ได้ Adt และคณะ (2006) และ Burattini และคณะ (2008) รายงานว่า FTIR สเปกตรัมในช่วงเลขคลื่นประมาณ  $944-1185\text{ cm}^{-1}$   $1479-1744\text{ cm}^{-1}$  และ  $2830-3000\text{ cm}^{-1}$  บ่งบอกการมีอยู่ของสารประกอบประเภทของพอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีน และไขมัน ในเซลล์ยีสต์ตามลำดับ และค่าการดูดกลืนแสงใน FTIR สเปกตรัมที่เลขคลื่นต่างๆ ยังให้ข้อมูลโดยละเอียดขององค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ในเซลล์ยีสต์ ผนังเซลล์ยีสต์ และสารสกัดจากยีสต์ได้ (Adt และคณะ 2006; Bahmed และคณะ, 2003; Burattini และคณะ, 2008; Galichet และคณะ, 2001; Hromádková และคณะ, 2003; Karreman และคณะ, 2007; Šandula และคณะ, 1999) ซึ่งองค์ประกอบที่สอดคล้องกับสเปกตรัมที่ตำแหน่งต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.3

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบที่สอดคล้องกับสเปกตรัมที่ตำแหน่งต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ ผนังเซลล์ยีสต์ และ สารสกัดจากยีสต์

ตำแหน่งของสเปกตรัมที่พบ ใน FTIR สเปกตรัมของตัวอย่าง เซลล์ยีสต์โดยระบุเป็นค่าเลขคลื่น ( $\text{cm}^{-1}$ )	องค์ประกอบที่สอดคล้องกับสเปกตรัมที่ตำแหน่งต่างๆ
~2960	$\nu_{\text{asym}}$ $\text{CH}_3$ lipids
~2925	$\nu_{\text{asym}}$ $\text{CH}_2$ lipids
~2890	CH deformation of $\text{CH}_3$ in lipids, proteins and peptides
~2875	$\nu_{\text{sym}}$ $\text{CH}_3$ lipids
~2855	$\nu_{\text{sym}}$ $\text{CH}_2$ lipids
~1740	C=O stretching in lipid esters
~1670	Amide I: C=O vibrations of different protein structures
~1622	$\beta$ form C=O stretching in polypeptides, amide I band
~1550	Amide II: N-H and C-N vibrations of the peptide bond in different protein conformations
~1470	$\text{CH}_2$ scissoring in lipids
~1455	Various $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ bending vibrations in lipids and proteins
~1440	$\text{CH}_2$ deformation mainly in proteins and peptides
~1415	C-O-H in plane bending in proteins
~1405	$\text{C}(\text{CH}_3)_2$ stretching mainly in proteins
~1390	C=O of $\text{COO}^-$ symmetric stretching in proteins
~1370	$\text{CH}_2$ wagging vibrations in lipids and $\beta$ -1,3 glucans
~1350	$\text{CH}_2$ wagging vibrations in lipids
~1340	$\text{CH}_2$ wagging vibrations in lipids

ที่มา: Adt และคณะ 2006; Bahmed และคณะ, 2003; Burattini และคณะ, 2008; Galichet และคณะ, 2001; Hromádková และคณะ, 2003; Karreman และคณะ, 2007; Šandula และคณะ, 1999

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบที่สอดคล้องกับสเปกตรัมที่ตำแหน่งต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ ผนังเซลล์ยีสต์ และ สารสกัดจากยีสต์ (ต่อ)

ตำแหน่งของสเปกตรัมที่พบใน FTIR สเปกตรัมของตัวอย่าง เซลล์ยีสต์โดยระบุเป็นค่าเลขคลื่น ( $\text{cm}^{-1}$ )	องค์ประกอบที่สอดคล้องกับสเปกตรัมที่ตำแหน่งต่างๆ
~1300	Amide III: C-N and C-O stretching, N-H and O=C-N bending
~1240	$\nu_{\text{asym}} \text{PO}_2^-$ in DNA, RNA and phospholipids
~1215	C-O stretching free nucleotides
~1200	C-O-C carbohydrates
~1156	C-O, C-OH carbohydrates, various contributions
~1135	Mannans and $\beta$ -1,3 glucans
~1108	$\beta$ -1,3 glucans
~1080	$\nu_{\text{asym}} \text{PO}_2^-$ mainly from RNA
~1050	Mannans
~1042	$\beta$ -1,3 glucans
~1025	$\beta$ -1,4 glucans
~998	$\beta$ -1,6 glucans
~972	Mannans
~915	Pyranose ring asymmetric vibrations
~905	Mannans
~880	$\beta$ -Glycosidic linkage vibrations
~860	$\alpha$ -Glycosidic linkage vibrations
~822	Mannans
~808	Mannans
~780	Pyranose ring symmetric vibrations, GMP ring stretching

ที่มา: Adt และคณะ 2006; Bahmed และคณะ, 2003; Burattini และคณะ, 2008; Galichet และคณะ, 2001; Hromádková และคณะ, 2003; Karreman และคณะ, 2007; Šandula และคณะ, 1999

นอกจากนี้ FTIR สเปกตรัมยังให้ข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์เนื่องจากกระบวนการชีวภาพต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์ เช่น งานวิจัยของ Burattini และคณะ (2008) ใช้เทคนิค FTIR spectroscopy ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ที่ใช้หมักไวน์ ภายหลังจากการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของเซลล์ โดยพบว่า FTIR สเปกตรัมของเซลล์ที่ผ่านการย่อยสลายตัวเองมีพื้นที่ได้กราฟของสเปกตรัมส่วนที่เป็นตัวแทนของไขมันและแมนแนนเพิ่มขึ้น แต่มีพื้นที่ได้กราฟของสเปกตรัมส่วนที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,4 และ  $\beta$ -1,6 กลูแคนลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายตัวเองของเซลล์มีการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ สารประกอบกลุ่มแมนโนโปรตีน และบีตาไกลูแคนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ นอกจากนี้ยังพบว่าพื้นที่ได้กราฟของสเปกตรัมส่วนที่เป็นตัวแทนของโปรตีนลดลงและเปปไทด์เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากการย่อยสลายโปรตีนและแมนโนโปรตีนเป็นเปปไทด์ระหว่างการย่อยสลายตัวเองของเซลล์

หากพิจารณาความแตกต่างของ FTIR สเปกตรัมของยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการบ่งชี้และจัดจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเซลล์ยีสต์ได้อีกด้วย Essendoubi และคณะ (2005) ได้ศึกษาการบ่งชี้สายพันธุ์ของยีสต์ *Candida* โดยใช้เทคนิค FTIR microspectroscopy พบว่ายีสต์ *Candida* สายพันธุ์ต่างๆ มี FTIR สเปกตรัมในช่วง fingerprint ( $750-1800\text{ cm}^{-1}$ ) ที่แตกต่างกันและมีความจำเพาะเจาะจงกับสายพันธุ์ของยีสต์ ดังนั้นจึงสามารถใช้ข้อมูล FTIR สเปกตรัมในช่วงเลขคลื่นดังกล่าวในการระบุสายพันธุ์ของยีสต์ *Candida* ซึ่งการบ่งชี้สายพันธุ์ของยีสต์ *Candida* ด้วยเทคนิคนี้มีข้อดีคือรวดเร็วกว่าเทคนิคดั้งเดิม (conventional technique) และเทคนิคระดับโมเลกุล (molecular technique) นอกจากนี้ยังเป็นเทคนิคที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานประจำ (routine analysis) ได้อีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ขอบเขตงานวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถแบ่งขั้นตอนการดำเนินงานได้เป็น 2 ส่วน

##### 3.1.1 การผลิตสารสกัดปีตากุลูแคน

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตสารสกัดปีตากุลูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces* ที่มีการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารจำนวน 5 สายพันธุ์ โดยควบคุมภาวะในการเลี้ยงเซลล์และวิธีการสกัดปีตากุลูแคนจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์ให้เหมือนกัน และพิจารณาผลผลิตสารสกัดที่ได้จากยีสต์แต่ละสายพันธุ์

##### 3.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โครงสร้าง และสมบัติต่างๆ ของสารสกัดปีตากุลูแคน

งานวิจัยในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชนิดและสายพันธุ์ยีสต์ต่อองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด โครงสร้างปีตากุลูแคนในสารสกัด สมบัติเชิงหน้าที่ และพฤติกรรมการไหลของสารสกัดปีตากุลูแคนที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.1.1 และเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากสารสกัดปีตากุลูแคนทางการค้า

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 ขั้นตอน มาพิจารณาเพื่อใช้เป็นแนวทางในการหายีสต์สายพันธุ์ที่เหมาะสมมาใช้ในการสกัดปีตากุลูแคนที่ให้ผลผลิตสูงและมีสมบัติที่เทียบเท่าหรือดีกว่าปีตากุลูแคนจากยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae* ที่มีจำหน่ายทางการค้าในปัจจุบันได้

#### 3.2 สายพันธุ์ยีสต์

ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ *Saccharomyces* ต่างชนิดและสายพันธุ์ ดังแสดงใน



ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์และแหล่งที่มาของยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัย

สายพันธุ์ยีสต์	แหล่งที่มา
<i>Saccharomyces bayanus</i> EC1118 (ยีสต์หมักไวน์)	บริษัท Lavin ประเทศออสเตรเลีย
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FT1 (เทียบเท่ายีสต์ขนมปัง)	ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Fermipan® (ยีสต์ขนมปัง)	บริษัท Fermipan ประเทศอังกฤษ
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Sc90 (ยีสต์หมักแอลกอฮอล์)	โครงการส่วนพระองค์ สวนจิตรลดา
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> TISTR 5051 (ยีสต์หมักเบียร์)	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งประเทศไทย

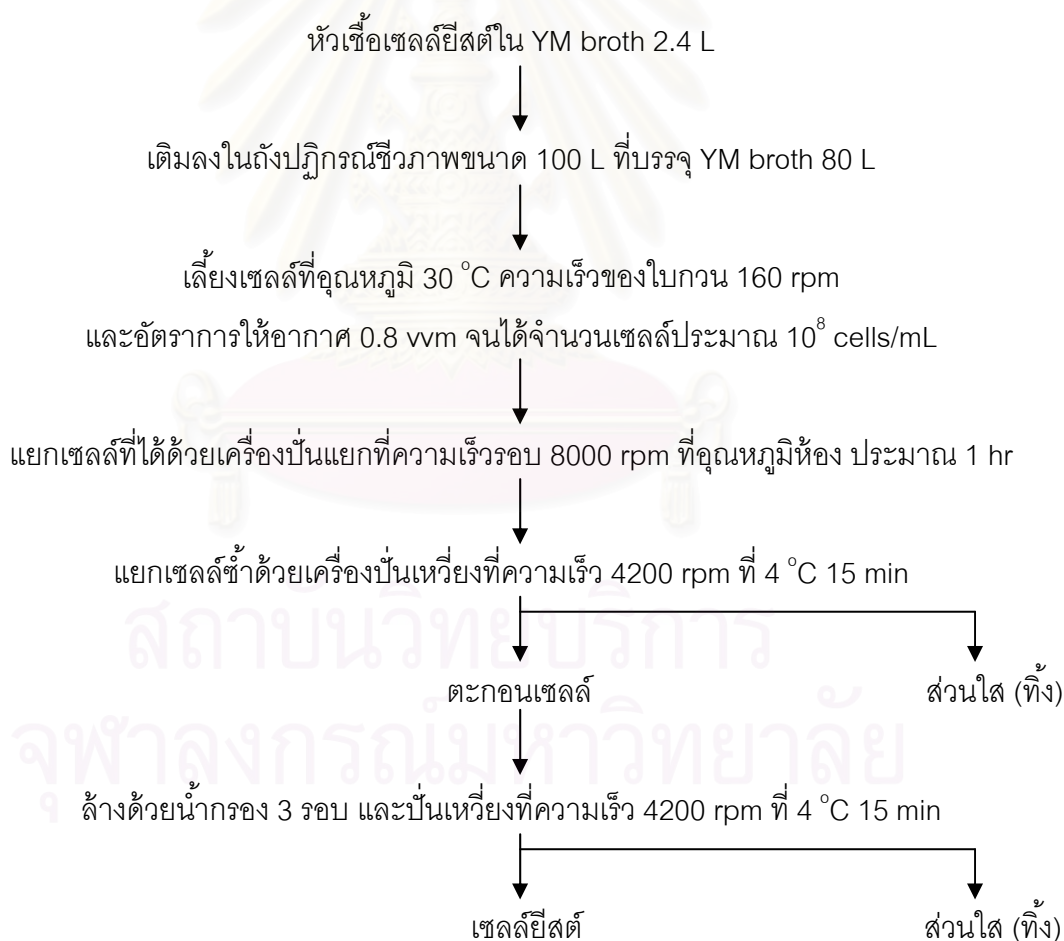
หมายเหตุ: ยีสต์ *S. cerevisiae* FT1 ตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) วิเคราะห์ลำดับเบสบนพื้นที่ D1/D2 ของ 25S rDNA (identity 98% EU556339.1) และ ITS ของ rDNA (identity 89% AF005710)

### 3.3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

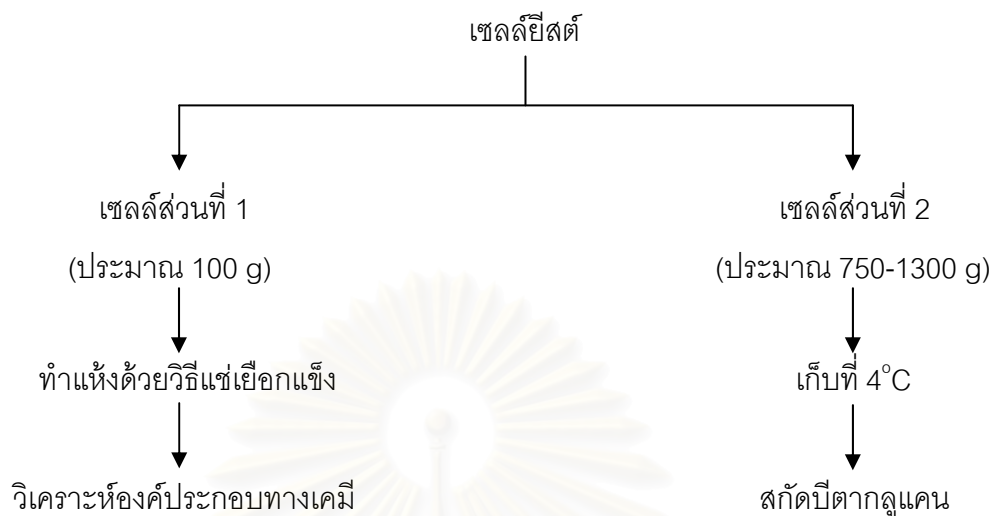
#### 3.3.1 การเลี้ยงเซลล์ยีสต์

เตรียมหัวเชื้อใน YM broth จำนวน 2.4 L ตามวิธีที่แสดงในภาคผนวก ก.1 เติมหหัวเชื้อที่ได้ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor, LSL BIOLAFITTE SA, model 12790-200, France) ขนาด 100 L ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ไว้แล้ว 80 L เลี้ยงเซลล์ยีสต์ภายใต้ภาวะดังนี้คือ อุณหภูมิ 30 °C ความเร็วของใบกวน 160 rpm และอัตราการให้อากาศ 0.8 vvm จนได้จำนวนเซลล์ประมาณ 10<sup>8</sup> cells/mL (นับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี direct cell count โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ ดังแสดงในภาคผนวก ก.2) และตรวจดูความบริสุทธิ์ของเซลล์ว่าไม่มีเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดอื่นปะปนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, model BX 51 TF, USA) นำยีสต์คัลเจอร์ (yeast culture) ที่เลี้ยงได้มาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกบางส่วนด้วยเครื่องปั่นแยก (Separator with Double Centripetal pump, Westfalia Separator AG, model SA1-01-175,

Germany) ด้วยความเร็วรอบ 8000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1 hr แล้วจึงนำสารแขวนลอยของเซลล์ยีสต์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงซ้ำด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (KUBOTA, model KR-20000T, Japan) ที่ความเร็วรอบ 4200 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ได้ด้วยน้ำกรองจำนวน 3 รอบ โดยแต่ละรอบของการล้างจะปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4200 rpm ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งนำหน้าเซลล์ยีสต์ที่ได้ แล้วจึงแบ่งเซลล์ยีสต์เป็นสองส่วน ส่วนแรก (ประมาณ 100 g) นำไปทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze drying) ด้วยเครื่องแช่เยือกแข็ง (Heto PowerDry, model LL3000, UK) ที่ -55 °C เป็นเวลา 48 hr แล้วนำไปวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ เก็บเซลล์ส่วนที่เหลือไว้ที่ 4 °C เพื่อนำไปสกัดปีตาไกลแคนขึ้นตอนการเลี้ยงเซลล์ยีสต์โดยย่อแสดงดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ยีสต์



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ (ต่อ)

คำนวณหาผลผลิตของเซลล์ยีสต์โดยรายงานผลเป็นน้ำหนักเซลล์ (แห้งหรือเปียก) ต่อหน่วยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อดังสมการที่ 1 และ 2

$$Y_{\text{wet cell}} = \frac{W_{\text{wet cell}}}{80} \times 100 \quad (1)$$

$$Y_{\text{dry cell}} = Y_{\text{wet cell}} \times \left( \frac{100}{100 - MC} \right) \quad (2)$$

โดยที่  $Y_{\text{wet cell}}$  คือเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเซลล์ยีสต์เปียก (g/L)

$Y_{\text{dry cell}}$  คือเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเซลล์ยีสต์แห้ง (g/L)

$W_{\text{wet cell}}$  คือน้ำหนักเปียกของเซลล์ยีสต์ (g)

MC คือความชื้นของเซลล์ยีสต์ (%)

### 3.3.2 การสกัดปีตากุลูแคนจากเซลล์ยีสต์

#### 3.3.2.1 การย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์ (autolysis of yeast cells) ดัดแปลงจาก Thammakiti และคณะ (2004)

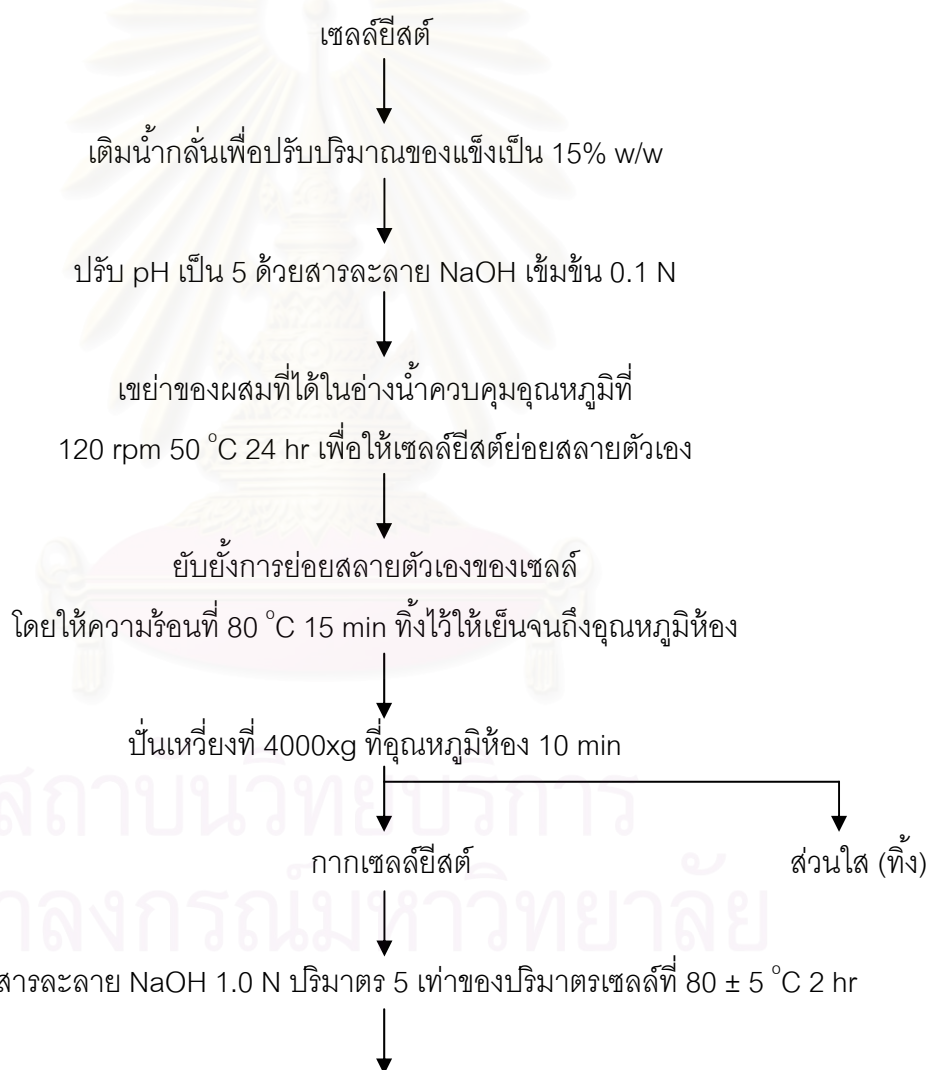
นำเซลล์ยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.3.1 มาเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับให้มีปริมาณของแข็ง 15% w/w ปรับ pH ให้เป็น 5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Carlo Erba, France) ความเข้มข้น 0.1 N แบ่งของผสมที่ได้เป็นส่วนๆ ส่วนละ 250 mL บรรจุแต่ละส่วนลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 mL นำไปเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Gesellschaft für Laborte, model 1083, Germany) ด้วยความเร็วรอบ 120 rpm ที่ 50 °C เป็นเวลา 24 hr เพื่อให้เซลล์ยีสต์เกิดการย่อยสลายตัวเอง จากนั้นจึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพื่อยุติการย่อยสลายตัวเองของเซลล์โดยการให้ความร้อนที่ 80 °C เป็นเวลา 15 min ทิ้งไว้ให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettichi, model ROTANTA 460R, Germany) ที่ 4000xg นาน 10 min ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนใสออก เก็บกากเซลล์ยีสต์ไว้ที่ 4 °C เพื่อนำไปสกัดปีตากุลูแคนต่อไป

#### 3.5.2.2 การสกัดปีตากุลูแคนด้วยต่างและกรด ดัดแปลงจาก Thammakiti และคณะ (2004)

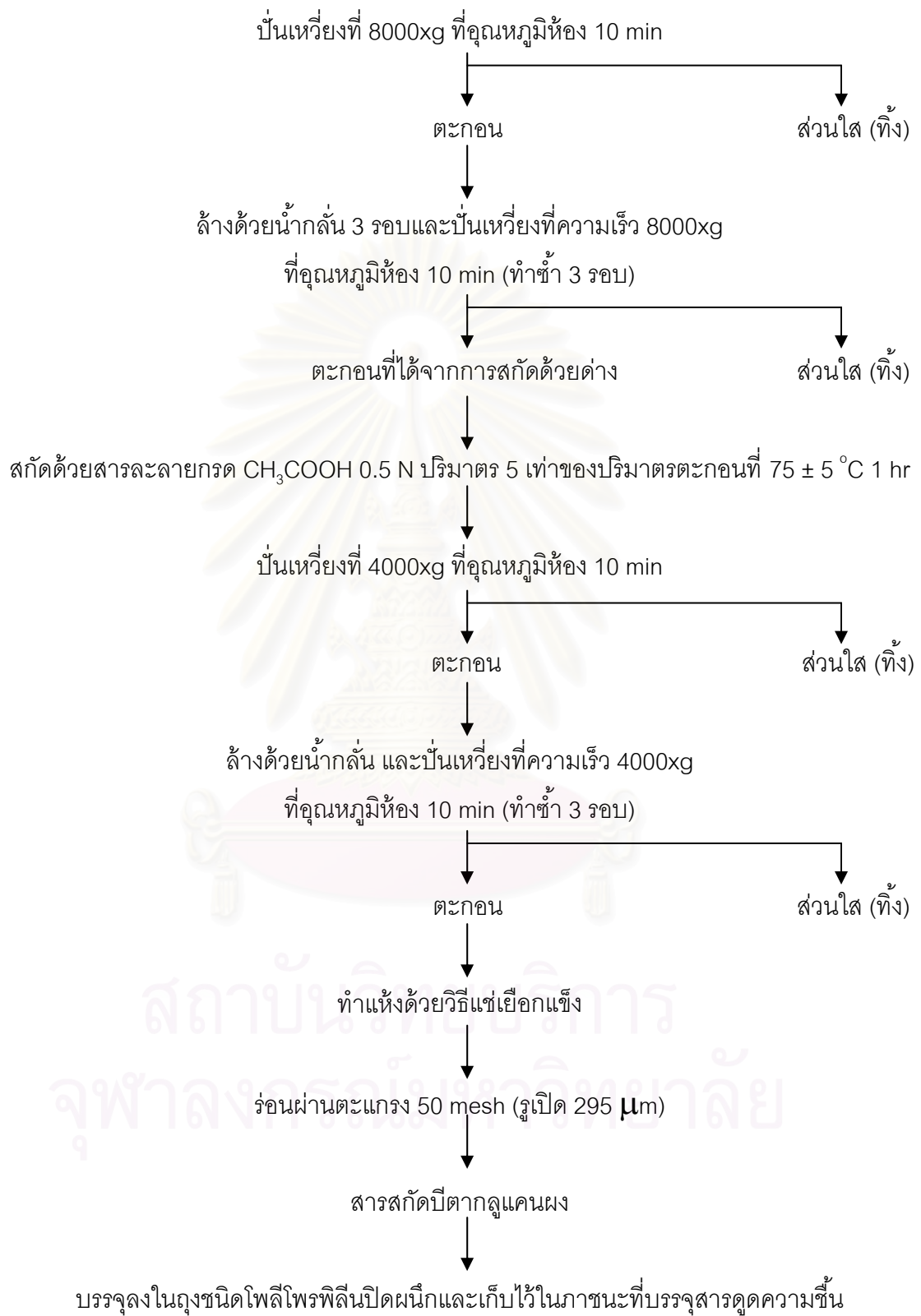
เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.0 N ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรเซลล์ยีสต์ ลงในกากเซลล์ยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 แบ่งของผสมที่ได้เป็นส่วนๆ ส่วนละ 300 mL บรรจุแต่ละส่วนลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 L จากนั้นนำไปสกัดในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Scientific Promotion, model Digital heat, Thailand) ที่  $80 \pm 5$  °C เป็นเวลา 2 hr และปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettichi, model ROTANTA 460R, Germany) ที่ความเร็ว 8000xg เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 รอบ โดยแต่ละรอบของการล้างจะปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกน้ำล้างทิ้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000xg เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนตะกอนที่ได้นำไปสกัดต่อด้วยกรดโดยเติมสารละลายกรดแอสติก (J.T. Baker, USA) ความเข้มข้น 0.5 N ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรตะกอน แบ่งของผสมที่ได้เป็นส่วนๆ ส่วนละ 300 mL บรรจุแต่ละส่วนลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 L และนำไปสกัดในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่  $75 \pm 5$  °C เป็นเวลา 1 hr จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000xg เป็นเวลา 10 min ที่อุณหภูมิห้อง แยกส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่นจำนวน 3 รอบ โดยแต่ละรอบของการล้างจะแยกน้ำล้างทิ้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000xg เป็นเวลา

10 min ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำส่วนตะกอนไปทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งด้วยเครื่องแช่เยือกแข็ง (Heto PowerDry, model LL3000, UK) ที่  $-55^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 48 hr จากนั้นจึงนำมาร่อนผ่าน ตะแกรงขนาด 50 mesh (รูเปิด  $295\ \mu\text{m}$ ) ได้เป็นสารสกัดบีตากลูแคนผง บรรจุสารสกัดลงในถุง ชนิดโพลีโพรพิลีนปิดผนึกและเก็บไว้ในภาชนะที่บรรจุสารดูดความชื้น เพื่อนำไปวิเคราะห์ใน ขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนการสกัดบีตากลูแคนโดยย่อแสดงดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดบีตากลูแคน



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดปีตากลูแคน (ต่อ)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตแต่ละขั้นตอนของการสกัดจะรายงานผลเป็นน้ำหนักแห้งของสารสกัดต่อน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ โดยคำนวณจากสมการที่ 3

$$Y = \frac{W_{\text{extract}} \times 100}{W_{\text{cell}}} \quad (3)$$

โดยที่	Y	คือเปอร์เซ็นต์ผลผลิต (% w/w)
	$W_{\text{extract}}$	คือน้ำหนักแห้งของสารสกัด (g)
	$W_{\text{cell}}$	คือน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์เริ่มต้น (g)

### 3.3.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์และสารสกัดบีตากลูแคน

นำเซลล์ยีสต์ สารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ทุกสายพันธุ์ และสารสกัดบีตากลูแคนทางการค้า (Innovacan<sup>®</sup> บริษัท สเปเซียลตี้ไบโอเทค ประเทศไทย) มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามวิธี AOAC (2005) ทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต ในรูปของผลต่าง และวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (Yeast Beta-Glucan Assay Kit; K-YBGL Megazyme, Ireland) ทดลอง 3 ซ้ำ รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข

### 3.3.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างของบีตากลูแคนโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

เตรียมตัวอย่างที่จะใช้วิเคราะห์โดยผสมผงเซลล์ยีสต์หรือผงสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์ประมาณ 1-2 mg เข้ากับผงโพแทสเซียมโบรไมด์ที่ปราศจากน้ำประมาณ 100 mg บดให้เข้ากัน แล้วนำมาอัดเป็นแผ่น (pellet) ด้วยความดัน 10 tons/in<sup>2</sup> จากนั้นนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเครื่อง FTIR spectrometer (Perkin-Elmer Spectrum One, USA) บันทึกข้อมูลสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงในช่วงเลขคลื่น 450-4000 cm<sup>-1</sup> ที่ความละเอียด (resolution) 4.0 cm<sup>-1</sup> จำนวนครั้งของการสแกน 16 ครั้งต่อสเปกตรัม ทดลอง 2 ซ้ำ หาค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่สอดคล้องกับเลขคลื่นแต่ละค่า และนำสเปกตรัมในช่วงเลขคลื่น 925-1190 cm<sup>-1</sup> มาผ่านกระบวนการทางคณิตศาสตร์ เพื่อแยกส่วนของสเปกตรัมที่ซ้อนทับกัน (mathematical deconvolution) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ระบุองค์ประกอบในตัวอย่างที่สอดคล้องกับแต่ละส่วน

ของสเปกตรัมย่อยที่แยกได้ คำนวณค่าสัดส่วนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ต่อ  $\beta$ -1,6 กลูแคน จากสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน และ  $\beta$ -1,6 กลูแคน

### 3.3.5 การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดบีตากลูแคน

นำสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ทุกสายพันธุ์และสารสกัดบีตากลูแคนทางการค้า (Innovacan<sup>®</sup>) มาวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ ดังนี้ (รายละเอียดการวิเคราะห์แต่ละวิธีแสดงในภาคผนวก ง)

- 3.3.5.1 วิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water-holding capacity) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Hromádková และคณะ (2003) ทดลอง 3 ซ้ำ
- 3.3.5.2 วิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (Oil-holding capacity) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Thammakiti และคณะ (2004) ทดลอง 3 ซ้ำ
- 3.3.5.3 วิเคราะห์ความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsion-stabilizing capacity) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Thammakiti และคณะ (2004) โดยใช้ระบบอิมัลชันซึ่งประกอบด้วยน้ำ 20 mL น้ำมัน 30 mL ผงเวย์โปรตีนไอโซเลต (whey protein isolate) 0.5 g และสารสกัดบีตากลูแคน 0.5 g ทดลอง 2 ซ้ำ

### 3.3.6 การวิเคราะห์พฤติกรรมการไหล (flow behavior)

วิเคราะห์พฤติกรรมการไหลของสารแขวนลอยบีตากลูแคนความเข้มข้น 10% w/w ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Hromádková และคณะ (2003) ด้วยเครื่อง rheometer (Bohlin Instruments Ltd., model C-VOR, UK) ที่อุณหภูมิ 25 °C โดยใช้หัววัดแบบ parallel plate ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 mm ช่องว่างระหว่างหัววัดกับจานใส่ตัวอย่างสำหรับวัดเท่ากับ 2000  $\mu$ m แปรอัตราเฉือน (shear rate) ระหว่าง 2-138  $s^{-1}$  ใช้เวลาในการวัดทั้งหมด (shearing time) 16 min สำหรับแต่ละรอบของการเพิ่มและลดอัตราเฉือน (shear cycle) รายละเอียดการทดลองแสดงในภาคผนวก จ.1



### 3.4 การวางแผนการทดลองทางสถิติ

สำหรับการทดลองในข้อ 3.3.3 3.3.5 และ 3.3.6 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลผลิตของเซลล์ยีสต์

จากผลการเลี้ยงยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 100 L พบว่าได้ผลผลิตของเซลล์ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.1) ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์ที่ใช้ในการทดลองนี้มาจากจีนัสเดียวกันคือ จีนัส *Saccharomyces* ซึ่งจะมีลักษณะด้านสัณฐานวิทยา เซลล์วิทยา สรีรวิทยา และกลไกการสืบพันธุ์ที่คล้ายคลึงกัน (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2004; สมจิต ศิริโกศ, 2537) ดังนั้นเมื่อนำยีสต์กลุ่มนี้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ควบคุมภาวะในการเลี้ยงเซลล์ และเก็บเซลล์ให้เหมือนกัน จึงทำให้เซลล์ยีสต์มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน และให้ผลผลิตของเซลล์ใกล้เคียงกันด้วย

ตารางที่ 4.1 ความชื้นของเซลล์เปียกและผลผลิตของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์

สายพันธุ์ของเซลล์ยีสต์	ความชื้น (%)	ผลผลิต เซลล์ยีสต์เปียก (g/L)	ผลผลิต เซลล์ยีสต์แห้ง (g/L)
<i>S. bayanus</i> EC1118	74.02 <sup>c</sup> ± 0.15	12.03	3.13
<i>S. cerevisiae</i> FT1	73.37 <sup>d</sup> ± 0.08	11.34	3.02
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	75.04 <sup>b</sup> ± 0.05	11.37	2.84
<i>S. cerevisiae</i> Sc90	79.83 <sup>a</sup> ± 0.03	16.25	3.28
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	74.14 <sup>c</sup> ± 0.23	13.33	3.45

หมายเหตุ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงมาตรฐาน

a, b, ... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

#### 4.2 ผลผลิตของสารสกัดบีตาไกลูแคนจากเซลล์ยีสต์

เมื่อพิจารณาขั้นตอนการสารสกัดบีตาไกลูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2) พบว่าในแต่ละขั้นตอนของการสกัดมีการกำจัดสารต่างๆ ออกจากเซลล์ในปริมาณที่แตกต่างกัน

ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ โดยพบว่าในช่วงการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์สามารถกำจัดสารองค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ เช่น โปรตีน กรดอะมิโนอิสระ และกรดนิวคลีอิก (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2549; Saksinchai Suphantharika และ Verduyn, 2001) ออกจากเซลล์ยีสต์ประมาณ 24-46% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งเริ่มต้น ขั้นตอนการสกัดด้วยต่างสามารถกำจัดองค์ประกอบส่วนใหญ่ ได้แก่ โปรตีน กรดนิวคลีอิก แมนแนน กลูแคนที่ละลายในต่าง และลิพิดที่มีขั้วออกจากกากเซลล์ยีสต์ (Fleet, 1991; Thammakiti และคณะ, 2004) คิดเป็น 37-62% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งเริ่มต้น และขั้นตอนการสกัดด้วยกรดสามารถกำจัดองค์ประกอบส่วนน้อย ได้แก่ โปรตีนที่เหลือ โกลโคเจน ไคติน และไคโตซาน ออกจากสารสกัด (Thammakiti และคณะ, 2004) คิดเป็น 0.2-1.5% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งเริ่มต้น จากข้อมูลดังกล่าวมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่าขั้นตอนการสกัดด้วยต่างสามารถกำจัดสิ่งเจือปนออกได้มากที่สุด

ในการพิจารณาระดับการย่อยสลายตัวเอง (degree of autolysis) ของเซลล์ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ อาจพิจารณาจากระดับการกำจัดองค์ประกอบต่างๆ ออกจากเซลล์ภายหลังการย่อยสลายตัวเอง นั่นคือยีสต์ที่มีระดับการย่อยสลายตัวเองสูงก็จะช่วยกำจัดองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์มากขึ้นด้วย ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตตายลง เกิดการย่อยผนังเซลล์และองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ โดยเอนไซม์จะทำลายผนังเซลล์ไปบางส่วนทำให้ผนังเซลล์อ่อนแอลง และไม่สามารถทนความแตกต่างของแรงดันออสโมติกระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อมได้ ส่งผลให้น้ำแพร่เข้าไปภายในเซลล์และดันให้เยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์แตกออกทำให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ที่ถูกละลายจนเป็นโมเลกุลขนาดเล็กแล้วสามารถไหลออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ (โสภา กลิ่นจันทร์, 2548; Burattini และคณะ, 2008) จากข้อมูลในตารางที่ 4.2 พบว่าระดับการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของยีสต์ และยังพบว่าเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 มีระดับการย่อยสลายตัวเองมากที่สุดนั่นคือสามารถกำจัดสารได้มากที่สุด ส่วนเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup> มีระดับการย่อยสลายตัวเองน้อยที่สุด การที่ยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีระดับการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากเซลล์ยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีองค์ประกอบและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน (Nakajima และคณะ, 1988; Nguyen และคณะ, 1998; Bahmed, 2003; Kim และ Yun, 2006) จึงทำให้ระดับการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์ที่สภาวะเดียวกันเกิดขึ้นได้ไม่เท่ากัน นอกจากนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างแอกทิวิตีของเอนไซม์แต่ละชนิดคือ โปรติเอส (protease)  $\beta$ -(1,3)-glucanase  $\beta$ -(1,6)-glucanase แมนแนนเนส (mannanase) และนิวคลีเอส (nuclease) ที่ใช้ในการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์ต่างสายพันธุ์ ซึ่งโดยทั่วไปการทำงาน

ร่วมกันของเอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ย่อมต้องการภาวะที่จำเพาะเพื่อให้ได้แอกทิวิตีสูง ดังนั้นเมื่อทำให้ยีสต์ทุกสายพันธุ์ย่อยสลายตัวเองที่ภาวะเดียวกัน จึงทำให้อัตราส่วนการย่อยสลายตัวเองของเซลล์มีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของยีสต์

ตารางที่ 4.2 ผลผลิตของสารสกัดในแต่ละขั้นตอนของการสกัดปีตากูแคนจากเซลล์ยีสต์

สายพันธุ์ของเซลล์ยีสต์	สารสกัด	ผลผลิตของสารสกัด (% w/w dry basis)	ผลต่างของผลผลิตหลัง การสกัดแต่ละขั้นตอน
<i>S. bayanus</i> EC1118 (ยีสต์หมักไวน์)	เซลล์ยีสต์	100.00	-
	กากเซลล์ยีสต์	69.29	30.71
	สารสกัดจากต่าง	14.29	55.00
	สารสกัดปีตากูแคน	14.05	0.24
<i>S. cerevisiae</i> FT1 (เทียบเท่ายีสต์ขนมปัง)	เซลล์ยีสต์	100.00	-
	กากเซลล์ยีสต์	58.85	41.15
	สารสกัดจากต่าง	13.71	45.14
	สารสกัดปีตากูแคน	13.50	0.21
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan® (ยีสต์ขนมปัง)	เซลล์ยีสต์	100.00	-
	กากเซลล์ยีสต์	76.30	23.70
	สารสกัดจากต่าง	14.01	62.29
	สารสกัดปีตากูแคน	12.94	1.07
<i>S. cerevisiae</i> Sc90 (ยีสต์หมักแอลกอฮอล์)	เซลล์ยีสต์	100.00	-
	กากเซลล์ยีสต์	54.43	45.57
	สารสกัดจากต่าง	16.49	37.94
	สารสกัดปีตากูแคน	14.98	1.51
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051 (ยีสต์หมักเบียร์)	เซลล์ยีสต์	100.00	-
	กากเซลล์ยีสต์	63.17	36.83
	สารสกัดจากต่าง	26.33	36.85
	สารสกัดปีตากูแคน	25.41	0.92

หมายเหตุ ผลผลิตของสารสกัดคำนวณเปรียบเทียบกับน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้งเริ่มต้น

กากเซลล์ยีสต์คือ เซลล์ยีสต์ที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายตัวเอง

เมื่อพิจารณาผลผลิตของสารสกัดปีตากัญแคนจากเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.2) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันคือ 13-15% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง ยกเว้นยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 เพียงสายพันธุ์เดียวที่ให้ปริมาณสารสกัดปีตากัญแคนสูงถึง 25% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของสารสกัดปีตากัญแคนจากยีสต์ที่ได้จากงานวิจัยนี้กับสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งใช้ยีสต์คัลเจอร์ (yeast culture) เป็นวัตถุดิบเช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ (ตารางที่ 4.3) พบว่าผลผลิตของสารสกัดปีตากัญแคนจากยีสต์ที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่าใกล้เคียงกับผลผลิตของสารสกัดจากงานวิจัยที่ผ่านมา นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของสารสกัดปีตากัญแคนจากยีสต์ที่ได้จากงานวิจัยนี้กับสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ จากงานวิจัยอื่นที่ใช้กากบรีวเวอร์ยีสต์ (spent brewer's yeast) หรือกากยีสต์หมักแอลกอฮอล์เป็นวัตถุดิบ (ตารางที่ 4.3) พบว่าผลผลิตของสารสกัดปีตากัญแคนจากยีสต์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่มีค่ามากกว่า ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของเซลล์ยีสต์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ เนื่องจากกากเซลล์ยีสต์ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเบียร์และการหมักแอลกอฮอล์ ดังนั้นเซลล์ยีสต์ที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ที่อยู่ในช่วง stationary phase ไปจนถึงช่วง death phase ซึ่งมีทั้งเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้วปะปนกันอยู่ และเนื่องจากเซลล์ที่ตายแล้วเป็นเซลล์ที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายตัวเองเกิดการย่อยผนังเซลล์และองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นปีตากัญแคนที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ก็จะถูกทำลายไปบางส่วนด้วยเช่นกัน จากเหตุผลดังกล่าวจึงน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งส่งผลให้สารสกัดจากงานวิจัยที่ใช้กากเซลล์ยีสต์ เป็นวัตถุดิบมีผลผลิตของสารสกัดปีตากัญแคนต่ำกว่าผลผลิตที่ได้จากงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากผลของสิ่งปนเปื้อน เช่น กากน้ำตาล (wort) ที่ตกค้างในกากบรีวเวอร์ยีสต์ภายหลังการล้างเซลล์เบื้องต้น ซึ่งสิ่งปนเปื้อนเหล่านี้อาจทำปฏิกิริยากับต่างและกรดที่ใช้สกัด จึงทำให้ประสิทธิภาพของการสกัดต่ำลง ซึ่งจะส่งผลทำให้ได้ผลผลิตของสารสกัดที่ต้องการในปริมาณที่ลดลงด้วย

ตารางที่ 4.3 ผลผลิตของสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ จากงานวิจัยที่ผ่านมา

แหล่งที่มาของ เซลล์ยีสต์	สายพันธุ์ของยีสต์	ผลผลิตของสารสกัด (%)		วิธีที่ใช้สกัดบีตากลูแคน	เอกสารอ้างอิง
		เทียบกับน้ำหนัก เซลล์ยีสต์แห้ง	เทียบกับน้ำหนัก ผนังเซลล์ยีสต์ แห้ง		
กากบรีวเวอร์สยีสต์ (spent brewer's yeast)	<i>S. uvarum</i>	8.4	13	การสกัดด้วยต่าง-กรด	Thammakiti และคณะ (2004)
	<i>S. uvarum</i>	8.4	13	การสกัดโดยใช้การไฮโมจีนไนส์ ร่วมกับต่างและกรด	Thammakiti และคณะ (2004)
	<i>S. cerevisiae</i>	11.2	21	การสกัดด้วยภาวะไม่รุนแรงวิธีใหม่	Liu และคณะ (2008)
กากยีสต์หมักแอลกอฮอล์	<i>S. cerevisiae</i> Sc90	13.2	26.8	การสกัดด้วยภาวะไม่รุนแรงวิธีใหม่	วรัญญา พรเจริญ (2549)
ยีสต์คัลเจอร์ (yeast culture)	<i>S. cerevisiae</i>	-	22.9	การสกัดโดยใช้การออกโตไลซิส ร่วมกับการใช้ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการออกซิไดส์	Wang และคณะ (2003)
	<i>S. cerevisiae</i>	-	25-26	การสกัดด้วยต่าง-กรด	Freimund และคณะ (2003)
	<i>S. bayanus</i> EC1118	14.1	20.3	การสกัดด้วยต่าง-กรด	งานวิจัยนี้
	<i>S. cerevisiae</i> FT1	13.5	22.9	การสกัดด้วยต่าง-กรด	งานวิจัยนี้
	<i>S. cerevisiae</i> Fermipan®	12.9	17.0	การสกัดด้วยต่าง-กรด	งานวิจัยนี้
	<i>S. cerevisiae</i> Sc90	15.0	27.5	การสกัดด้วยต่าง-กรด	งานวิจัยนี้
	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	25.4	40.2	การสกัดด้วยต่าง-กรด	งานวิจัยนี้

หมายเหตุ น้ำหนักผนังเซลล์ยีสต์แห้ง หมายถึงน้ำหนักแห้งของกากยีสต์ที่ผ่านการย่อยสลายตัวเอง (autolysis)

#### 4.3 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์และสารสกัดปีตากลูแคน

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ทุกสายพันธุ์ (ตารางที่ 4.4) พบว่าเซลล์ยีสต์มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกันคือ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต ปีตากลูแคน โปรตีน ไขมัน และไขมันประมาณ 39-52% 12-21% 42-55% 5-7% และ 0.4-1.5% ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดปีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.5) พบว่าสารสกัดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต ปีตากลูแคน โปรตีน ไขมัน และไขมันใกล้เคียงกัน คือประมาณ 90-96% 40-46% 2-9% 0.1-1.5% 0.04-3.4% ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ยกเว้นสารสกัดจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 ที่มีปริมาณปีตากลูแคนและโปรตีน (ประมาณ 28% และ 2% ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) ต่ำกว่าสารสกัดจากยีสต์ชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 จากงานวิจัยของ วรัญญา พรเจริญ (2549) กับค่าที่รายงานไว้ในงานวิจัยนี้ พบว่ามีค่าแตกต่างกัน กล่าวคือ กากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 หลังกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต ปีตากลูแคน โปรตีน ไขมัน และไขมัน ประมาณ 54% 21% 40% 7% และ 5% ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังนั้นกากเซลล์ยีสต์ดังกล่าวจึงมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต ปีตากลูแคน และไขมันสูงกว่า แต่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่าเซลล์ยีสต์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ (ตารางที่ 4.4) การที่องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์สายพันธุ์เดียวกันจากทั้งสองงานวิจัยมีค่าแตกต่างกันนั้น นอกจากจะเป็นผลของที่มาที่ต่างกัน (กากเซลล์ยีสต์และยีสต์คัลเจอร์) แล้ว ยังอาจเกิดจากการเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่มีองค์ประกอบของอาหาร (น้ำ แหล่งพลังงาน แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน วิตามิน แร่ธาตุ) และสภาวะที่ใช้เลี้ยง (อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ ความเป็นกรดต่าง อัตราเร็วในการกวน) ที่แตกต่างกันด้วย (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2004; สมจิต ศิริโชค, 2537; Aguilar-Uscanga และ François, 2003)

จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดปีตากลูแคนจากยีสต์กับเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.4 และ 4.5) พบว่าคาร์โบไฮเดรตและปีตากลูแคนในสารสกัดปีตากลูแคนมีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณโปรตีนและไขมันลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณขององค์ประกอบดังกล่าวในเซลล์ยีสต์ ส่วนไขมันในสารสกัดยังคงมีค่าใกล้เคียงกับที่พบในเซลล์ยีสต์ ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการสกัดปีตากลูแคนที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถกำจัดโปรตีนและไขมันออกจากเซลล์ยีสต์เริ่มต้นได้เกือบทั้งหมด แต่พบว่าไม่สามารถกำจัดคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่ปีตากลูแคน (เช่น แมน

แนน) และไขมันออกได้หมด จึงทำให้ได้สารสกัดที่มีปีตากุลูแคนเพียง 28-46% ของน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามหากต้องการผลิตสารสกัดปีตากุลูแคนที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นควรเพิ่มหรือดัดแปลงขั้นตอนการสกัดที่ช่วยกำจัดคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่ปีตากุลูแคนและไขมันออกจากเซลล์ยีสต์ได้มากขึ้น เช่น เพิ่มขั้นตอนการโฮโมจีไนซ์เซลล์และการออกซิไดส์เซลล์ยีสต์ก่อนการสกัด ใช้เอนไซม์ช่วยในการสกัด หรือเพิ่มขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์หลังการสกัด ซึ่งนอกจากจะช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์แล้วยังช่วยเพิ่มผลผลิตสารสกัดปีตากุลูแคนได้อีกด้วย (Wheatcroft และคณะ, 2002; Freimund และคณะ, 2003; Wang และคณะ, 2003)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์

สายพันธุ์ยีสต์	คาร์โบไฮเดรต (% dry basis)	บีตากลูแคน (% dry basis)	โปรตีน (% dry basis)	เถ้า (% dry basis)	ไขมัน (% dry basis)
<i>S. bayanus</i> EC1118	48.32	20.83 <sup>a</sup> ± 0.30	45.83 <sup>c</sup> ± 0.26	5.28 <sup>c</sup> ± 0.03	0.57 <sup>c</sup> ± 0.03
<i>S. cerevisiae</i> FT1	49.90	17.25 <sup>b</sup> ± 0.51	43.90 <sup>d</sup> ± 0.30	5.28 <sup>c</sup> ± 0.00	0.92 <sup>b</sup> ± 0.05
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	39.06	15.59 <sup>c</sup> ± 1.04	54.68 <sup>a</sup> ± 0.94	5.86 <sup>b</sup> ± 0.10	0.40 <sup>d</sup> ± 0.02
<i>S. cerevisiae</i> Sc90	43.36	11.93 <sup>d</sup> ± 0.23	48.90 <sup>b</sup> ± 0.33	7.14 <sup>a</sup> ± 0.03	0.60 <sup>c</sup> ± 0.03
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	51.62	12.47 <sup>d</sup> ± 0.21	41.57 <sup>e</sup> ± 0.36	5.35 <sup>c</sup> ± 0.01	1.46 <sup>a</sup> ± 0.08

หมายเหตุ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงมาตรฐาน

a, b, ... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

คำนวณคาร์โบไฮเดรตในรูปผลต่างโดยใช้สูตร ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (%) = 100 - (% โปรตีน + % เถ้า + % ไขมัน)

ตารางที่ 4.5 องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดปีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า

สายพันธุ์ยีสต์	คาร์โบไฮเดรต (% dry basis)	ปีตากลูแคน (% dry basis)	โปรตีน (% dry basis)	เถ้า (% dry basis)	ไขมัน (% dry basis)
<i>S. bayanus</i> EC1118	96.30	45.98 <sup>a</sup> ± 1.07	2.32 <sup>e</sup> ± 0.03	0.07 <sup>de</sup> ± 0.01	1.31 <sup>c</sup> ± 0.08
<i>S. cerevisiae</i> FT1	95.13	44.30 <sup>a</sup> ± 0.72	3.74 <sup>b</sup> ± 0.01	0.42 <sup>b</sup> ± 0.01	0.71 <sup>d</sup> ± 0.07
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	89.68	41.43 <sup>b</sup> ± 0.38	8.54 <sup>a</sup> ± 0.07	0.16 <sup>c</sup> ± 0.01	1.62 <sup>b</sup> ± 0.08
<i>S. cerevisiae</i> Sc90	95.69	40.02 <sup>bc</sup> ± 1.80	3.45 <sup>c</sup> ± 0.01	0.05 <sup>e</sup> ± 0.00	0.81 <sup>d</sup> ± 0.02
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	94.88	28.29 <sup>d</sup> ± 1.32	1.66 <sup>f</sup> ± 0.00	0.10 <sup>d</sup> ± 0.01	3.36 <sup>a</sup> ± 0.01
Innovacan <sup>®</sup>	95.57	39.18 <sup>c</sup> ± 1.62	2.93 <sup>d</sup> ± 0.01	1.46 <sup>a</sup> ± 0.04	0.04 <sup>e</sup> ± 0.00

หมายเหตุ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงมาตรฐาน

a, b, ... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

คำนวณคาร์โบไฮเดรตโดยใช้สูตร ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (%) = 100 - (% โปรตีน + % เถ้า + % ไขมัน)

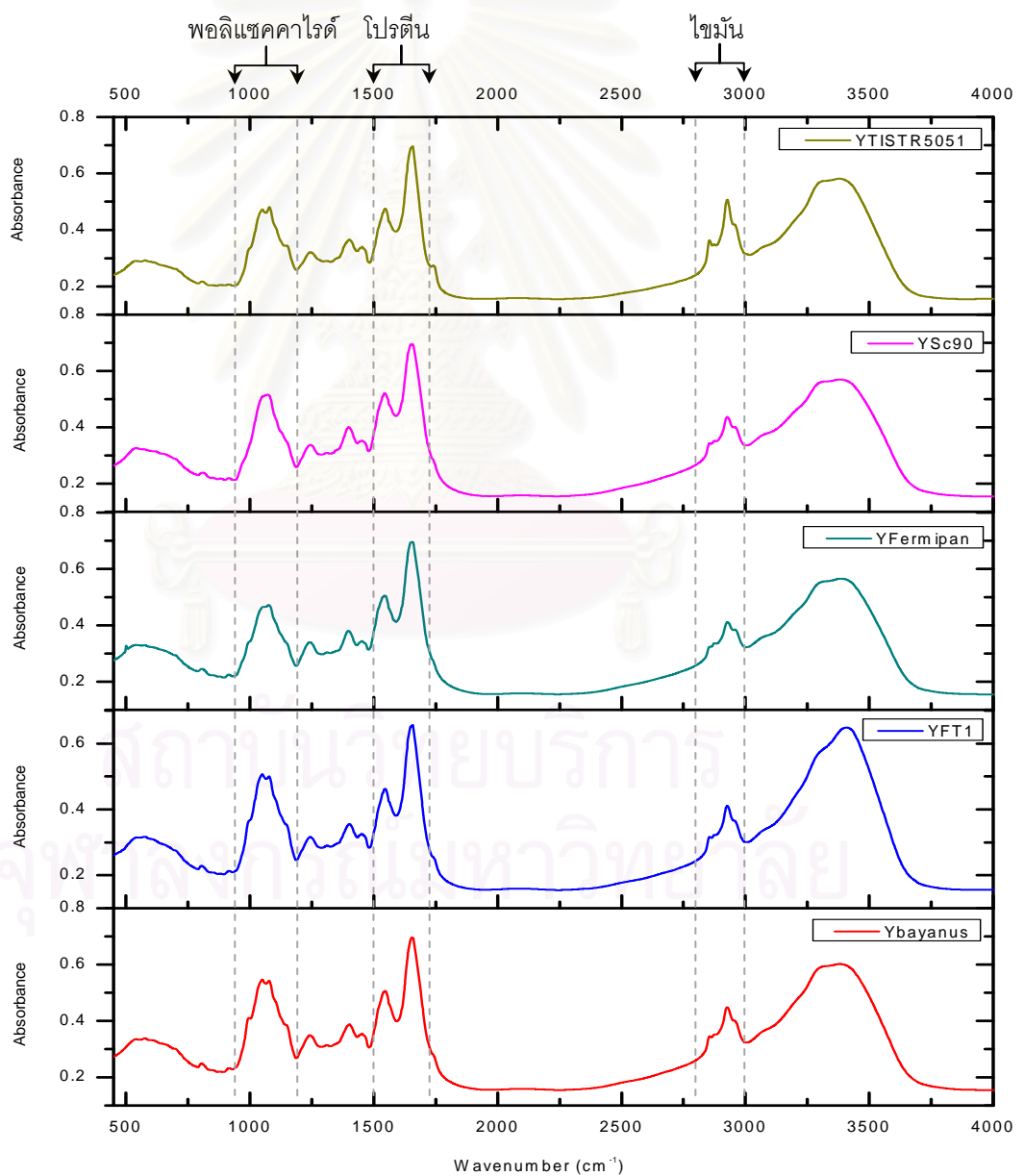
เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณผลผลิตกับความบริสุทธิ์ของสารสกัดปีตากลูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 ถึงแม้จะให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดสูงถึง 25% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง แต่สารสกัดกลับมีความบริสุทธิ์ต่ำที่สุดคือมีปริมาณปีตากลูแคนเพียง 28% ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์อื่นให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดเพียง 13-15% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง แต่สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงถึง 40-46% ของน้ำหนักแห้ง จากความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าวิธีการสกัดปีตากลูแคนที่ใช้ในงานวิจัยนี้อาจจะไม่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดปีตากลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 จึงทำให้สารสกัดที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผนังเซลล์ที่แตกต่างจากยีสต์สายพันธุ์อื่น

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารสกัดปีตากลูแคนจากกากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 ซึ่งสกัดด้วยภาวะไม่รุนแรงวิธีใหม่ที่รายงานไว้ในงานวิจัยของ วรัญญาพรเจริญ (2549) กับผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดปีตากลูแคนจากงานวิจัยของ วรัญญาพรเจริญ (2549) ได้ผลผลิตประมาณ 13% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง และสารสกัดมีความบริสุทธิ์สูงถึง 86% ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สารสกัดจากยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 ที่ได้จากงานวิจัยนี้ได้ผลผลิตของสารสกัดประมาณ 15% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง แต่สารสกัดมีความบริสุทธิ์เพียง 40% ของน้ำหนักแห้ง จะเห็นได้ว่าผลผลิตของสารสกัดที่ได้จากทั้งสองงานวิจัยมีค่าใกล้เคียงกันแต่มีความบริสุทธิ์ของสารสกัดที่ต่างกัน ดังนั้นวิธีการสกัดปีตากลูแคนที่ต่างกันจึงส่งผลให้ความบริสุทธิ์ของสารสกัดแตกต่างกันด้วย ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Wheatcroft และคณะ, 2002; Freimund และคณะ, 2003; Wang และคณะ, 2003)

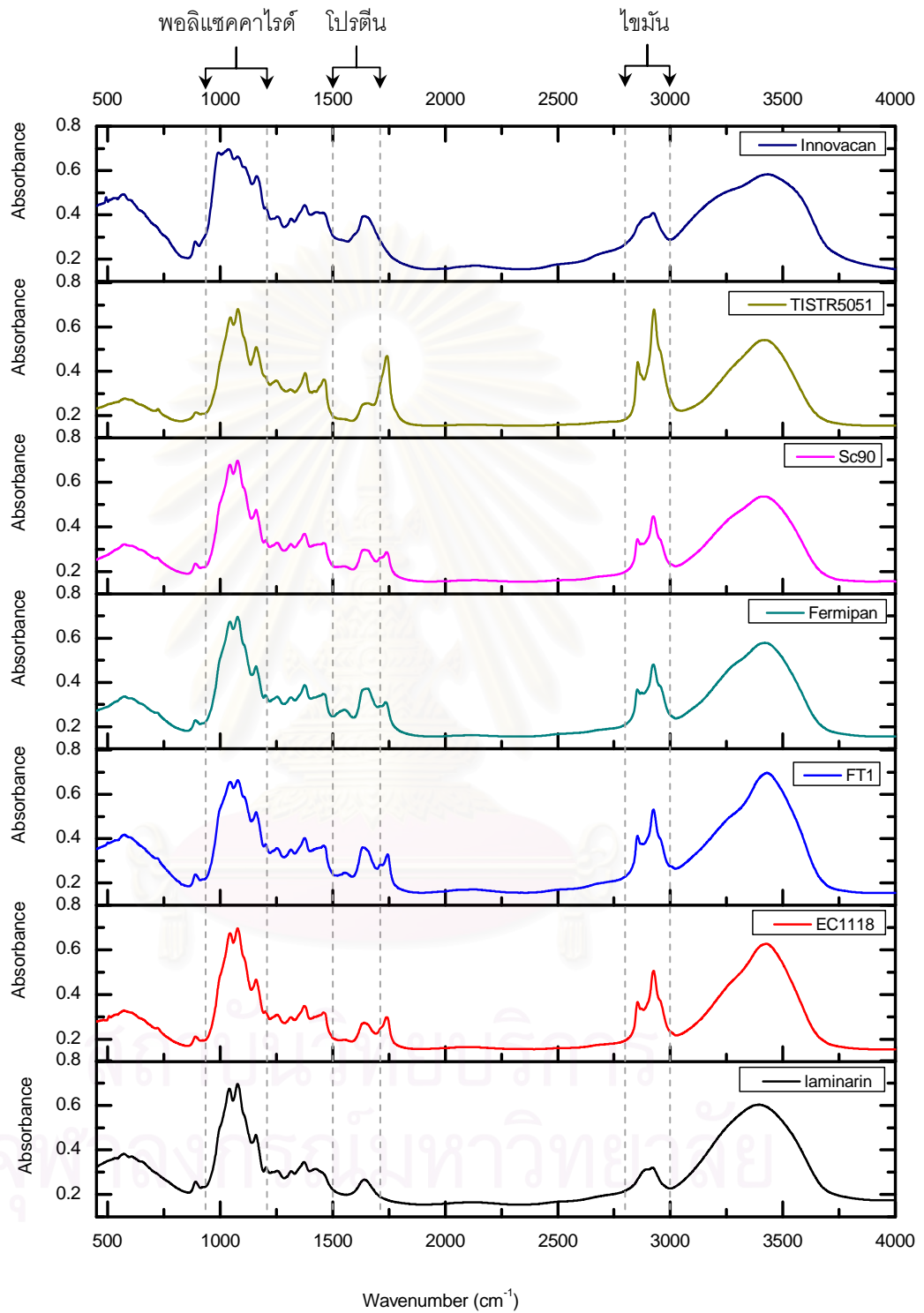
เมื่อเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของสารสกัดปีตากลูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์กับสารสกัดทางการค้า (ตารางที่ 4.5) พบว่าปริมาณปีตากลูแคนของสารสกัดจากยีสต์เกือบทุกสายพันธุ์ มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณปีตากลูแคนของสารสกัดทางการค้า ยกเว้นสารสกัดจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 เพียงชนิดเดียวที่มีปริมาณปีตากลูแคนต่ำกว่าสารสกัดทางการค้า นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดทางการค้ามีปริมาณเถ้าสูงกว่า แต่มีปริมาณไขมันต่ำกว่าสารสกัดจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ส่วนปริมาณโปรตีนนั้นมีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดจากยีสต์ทุกสายพันธุ์

#### 4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและโครงสร้างของปีตากลูแคนโดยใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy

จากการพิจารณา FTIR สเปกตรัมในช่วงเลขคลื่น 450-4000  $\text{cm}^{-1}$  ของเซลลิวีสต์และสารสกัดปีตากลูแคนจากยีสต์ทุกสายพันธุ์ (รูปที่ 4.1 และ 4.2) พบว่ามีรูปแบบที่คล้ายคลึงกันแต่มีค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลลิวีสต์และสารสกัดปีตากลูแคนจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์ประกอบด้วยชนิดขององค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกันแต่มีปริมาณแตกต่างกัน



รูปที่ 4.1 FTIR สเปกตรัมของเซลลิวีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์



รูปที่ 4.2 FTIR สเปกตรัมของสารสกัดปีตากูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ สารสกัดปีตากูแคนทางการค้า (Innovacan<sup>®</sup>) และสารมาตรฐาน Laminarin

โดยทั่วไปแล้วค่าการดูดกลืนแสงใน FTIR สเปกตรัมในช่วงเลขคลื่นต่างๆ สามารถบ่งบอกการมีอยู่ขององค์ประกอบทางเคมีบางชนิดได้ กล่าวคือ สเปกตรัมในช่วงเลขคลื่น  $925-1190\text{ cm}^{-1}$   $1500-1700\text{ cm}^{-1}$  และ  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  บ่งบอกการมีอยู่ของสารประกอบประเภทพอลิแซคคาไรด์ โปรตีน และไขมัน ตามลำดับ (Li-Chan และคณะ, 2002; Adt และคณะ, 2006; Burattini และคณะ, 2008)

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟของ FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ในช่วงเลขคลื่นต่างๆ (รูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.6) พบว่าพื้นที่ใต้กราฟในแต่ละช่วงเลขคลื่นของเซลล์ยีสต์ทุกสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าเซลล์ยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีพอลิแซคคาไรด์ โปรตีน และไขมันใกล้เคียงกัน และสเปกตรัมในช่วงเลขคลื่น  $925-1190\text{ cm}^{-1}$  และ  $1500-1700\text{ cm}^{-1}$  มีพื้นที่ใต้กราฟมากกว่าช่วง  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  แสดงว่าเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนมากกว่าไขมัน จากข้อมูล FTIR สเปกตรัมที่ได้พบว่าสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.6 พื้นที่ใต้กราฟในช่วงเลขคลื่นต่างๆ ของเซลล์ยีสต์

ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ	พื้นที่ใต้กราฟในช่วงเลขคลื่นต่างๆ (%)			อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของช่วงที่ 1:2:3
	ช่วงที่ 1	ช่วงที่ 2	ช่วงที่ 3	
	925-1190 $\text{cm}^{-1}$	1500-1700 $\text{cm}^{-1}$	2800-3000 $\text{cm}^{-1}$	
<i>S. bayanus</i> EC1118	9.87	9.41	6.60	1.5:1.4:1
<i>S. cerevisiae</i> FT1	9.46	9.16	6.34	1.5:1.4:1
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	8.96	9.86	6.51	1.4:1.5:1
<i>S. cerevisiae</i> Sc90	9.20	9.95	6.70	1.4:1.5:1
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	9.14	9.61	7.17	1.3:1.3:1

หมายเหตุ พื้นที่ใต้กราฟในช่วงเลขคลื่นต่างๆ คำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟในแต่ละช่วงเลขคลื่นเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมทั้งหมด

เมื่อเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของ FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบีตาไกลูแคนจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์ในช่วงเลขคลื่นต่างๆ (รูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.7) พบว่าสเปกตรัมของสารสกัดบีตาไกลูแคนมีพื้นที่ใต้กราฟในช่วง  $925-1190\text{ cm}^{-1}$  เพิ่มขึ้น ในขณะที่พื้นที่ใต้กราฟในช่วง  $1500-1700$

$\text{cm}^{-1}$  ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับค่าดังกล่าวจากตัวอย่างเซลล์ยีสต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ตารางที่ 4.4 และ 4.5) กล่าวคือสารสกัดบีตากลูแคนมีคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้น แต่มีโปรตีนลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณขององค์ประกอบดังกล่าวในเซลล์ยีสต์ และยังพบว่าสเปกตรัมในช่วง  $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  ของสารสกัดบีตากลูแคนและเซลล์ยีสต์มีพื้นที่ใต้กราฟใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าไขมันในสารสกัดและเซลล์ยีสต์มีค่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังพบว่าสเปกตรัมในช่วง  $925\text{-}1190\text{ cm}^{-1}$  ของสารสกัดบีตากลูแคนมีพื้นที่ใต้กราฟมากกว่าช่วงอื่นๆ จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดบีตากลูแคนมีองค์ประกอบหลักคือ พอลิแซคคาไรด์

ตารางที่ 4.7 พื้นที่ใต้กราฟในช่วงเลขคลื่นต่างๆ ของสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์

สารสกัด บีตากลูแคน จากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ	พื้นที่ใต้กราฟในช่วงเลขคลื่นต่างๆ (%)			อัตราส่วนพื้นที่ใต้ กราฟของช่วงที่ 1:2:3
	ช่วงที่ 1 925-1190 $\text{cm}^{-1}$	ช่วงที่ 2 1500-1700 $\text{cm}^{-1}$	ช่วงที่ 3 2800-3000 $\text{cm}^{-1}$	
<i>S. bayanus</i> EC1118	12.98	4.61	6.84	2.8:1:1.5
<i>S. cerevisiae</i> FT1	12.29	5.10	6.79	2.4:1:1.3
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	12.86	5.89	6.80	2.2:1:1.2
<i>S. cerevisiae</i> Sc90	13.41	5.10	6.53	2.6:1:1.3
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	13.07	4.51	8.35	2.9:1:1.9
Innovacan <sup>®</sup>	13.22	5.60	5.91	2.4:1:1.1

หมายเหตุ พื้นที่ใต้กราฟในช่วงเลขคลื่นต่างๆ คำนวณได้จากเปอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟในแต่ละช่วงเลขคลื่นเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมทั้งหมด

จากผลการวิเคราะห์ FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์และสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์ในช่วงเลขคลื่น  $925\text{-}1190\text{ cm}^{-1}$  โดยอาศัยการแยกส่วนของสเปกตรัมที่ซ้อนทับกันระบุงค์ประกอบของพอลิแซคคาไรด์ในตัวอย่างที่สอดคล้องกับสเปกตรัมย่อยที่แยกได้โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้ (ตารางที่ 4.8 4.9 และภาคผนวก ค) พบว่าสเปกตรัมในช่วงเลขคลื่น  $925\text{-}1190\text{ cm}^{-1}$  ของเซลล์ยีสต์และสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีสเปกตรัมย่อยที่บ่งบอกการมีอยู่ของสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ประเภทต่างๆ ได้แก่ แมนแนน

ปีตากุลแคน ( $\beta$ -1,3 กุลแคน  $\beta$ -1,4 กุลแคน และ  $\beta$ -1,6 กุลแคน) และแอลฟากุลแคน อย่างไรก็ตามก็ดี สำหรับยีสต์สายพันธุ์เดียวกัน ตำแหน่งของสเปกตรัมย่อยที่สอดคล้องกับองค์ประกอบชนิดเดียวกันของตัวอย่างเซลล์ยีสต์และสารสกัดจะแตกต่างกันประมาณ  $2-6 \text{ cm}^{-1}$  ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบดังกล่าวของตัวอย่างเซลล์และสารสกัดอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เช่น พอลิแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ ในเซลล์ยีสต์ มักปะปนอยู่กับสารอื่น เช่น ไขมัน โปรตีน และฟอสเฟต ซึ่งมีอยู่ปริมาณมากในเซลล์ยีสต์ ในขณะที่พอลิแซคคาไรด์ในสารสกัด มีการปนเปื้อนจากสารประกอบกลุ่มอื่นๆ น้อยกว่า จากหลักการการดูดกลืนคลื่นอินฟราเรดของสารอินทรีย์ กล่าวไว้ว่าสารอินทรีย์ชนิดเดียวกันที่มีความบริสุทธิ์ต่างกันจะให้ตำแหน่งของสเปกตรัมที่แตกต่างกันเล็กน้อย (เย็นหทัย แนนหนา, 2549) ดังนั้นความแตกต่างของตำแหน่งสเปกตรัมย่อยของพอลิแซคคาไรด์แต่ละชนิดที่พบในเซลล์ยีสต์และสารสกัด อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของสิ่งที่ปนเปื้อนในตัวอย่าง

เมื่อพิจารณาสเปกตรัมในช่วงเลขคลื่น  $925-1190 \text{ cm}^{-1}$  ของสารสกัดปีตากุลแคนจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์ พบว่ามีพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่บ่งบอกการมีอยู่ของปีตากุลแคนที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่บ่งบอกการมีอยู่ของปีตากุลแคนของเซลล์ยีสต์ (ตารางที่ 4.10) ซึ่งผลการวิเคราะห์ FTIR สเปกตรัมที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ยีสต์และสารสกัดปีตากุลแคน (ตารางที่ 4.4 และ 4.5) กล่าวคือสารสกัดมีปริมาณปีตากุลแคนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับค่าดังกล่าวในเซลล์ยีสต์

เมื่อพิจารณาพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนปีตากุลแคนในสารสกัดจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่ 4.10) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์หาปริมาณปีตากุลแคนโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (ตารางที่ 4.5) ยกเว้นกรณีของสารสกัดจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 กล่าวคือพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของปีตากุลแคนของสารสกัดจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 มีค่าใกล้เคียงกับสารสกัดจากยีสต์สายพันธุ์อื่น ในขณะที่ผลการวิเคราะห์หาปริมาณปีตากุลแคนโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูปให้ค่าต่ำกว่าสารสกัดจากยีสต์สายพันธุ์อื่น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการหาพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของปีตากุลแคนของสารสกัดจะรวมพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เลขคลื่นประมาณ  $1043 \text{ cm}^{-1}$  ซึ่งอาจเป็นตัวแทนของทั้งแมนแนนและปีตากุลแคน (ตารางที่ 4.9) จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดที่ได้จากยีสต์สายพันธุ์นี้มีแมนแนนปนเปื้อนอยู่มากกว่าสารสกัดจากยีสต์สายพันธุ์อื่น และส่งผลให้ค่าพื้นที่ใต้กราฟรวมที่เป็นตัวแทนของปีตากุลแคนมีค่าสูงกว่าความเป็นจริงด้วย



ตารางที่ 4.8 ตำแหน่งของสเปกตรัมย่อยที่พบใน FTIR สเปกตรัมของตัวอย่างเซลล์ยีสต์ในช่วงเลขคลื่น 925 – 1190 cm<sup>-1</sup>

ตำแหน่งของสเปกตรัมย่อยที่พบใน FTIR สเปกตรัมของตัวอย่างเซลล์ยีสต์โดยระบุเป็นค่าเลขคลื่น (cm <sup>-1</sup> )					องค์ประกอบที่สอดคล้องกับสเปกตรัมย่อยที่ตำแหน่งต่างๆ
ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ					
<i>S. bayanus</i> EC1118	<i>S. cerevisiae</i> FT1	<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	<i>S. cerevisiae</i> Sc90	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	
975	970	967	968	969	Nucleic acid [1], mannans [1,2,3,4]
992	992	992	995	994	$\beta(1\rightarrow6)$ glucans [1,2,3]
1011	1013	1013	1018	1015	ไม่สามารถระบุได้
1029	1029	1027	1028	1029	Glycogen [1], $\beta(1\rightarrow4)$ glucans [3], $\alpha$ -glucans [5]
1048	1048	1051	1046	1049	Glycogen [1], mannans [1,3,4], $\alpha$ -glucans [5]
1083	1083	1084	1084	1083	Nucleic acid [1,2], glycogen [1], $\beta(1\rightarrow3)$ glucans [3,4,5]
1105	1103	1104	1107	1103	$\beta(1\rightarrow3)$ glucans [1,3,4]
1123	1122	1122	1125	1121	Mannans [2,4], $\beta(1\rightarrow3)$ glucans [2]
1150	1152	1152	1157	1150	Esters [1], C-O, C-OH carbohydrates [2], $\alpha$ -glucans [5]

หมายเหตุ อ้างอิงจาก [1] Adt และคณะ, 2006; [2] Burattini และคณะ, 2008; [3] Galichet และคณะ, 2001; [4] Karreman และคณะ, 2007;

[5] Sandula และคณะ, 1999

ตารางที่ 4.9 ตำแหน่งของสเปกตรัมย่อยที่พบใน FTIR สเปกตรัมของตัวอย่างสารสกัดบีตาจากแควนและสารมาตรฐานในช่วงเลขคลื่น 925 – 1190 cm<sup>-1</sup>

ตำแหน่งของสเปกตรัมย่อยที่พบใน FTIR สเปกตรัมของตัวอย่างสารสกัดและสารมาตรฐานโดยระบุเป็นค่าเลขคลื่น (cm <sup>-1</sup> )							องค์ประกอบที่สอดคล้องกับสเปกตรัมย่อยที่ตำแหน่งต่างๆ
Laminarin (สารมาตรฐาน)	สารสกัดบีตาจากแควนจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ					Innovacan® (สารสกัดทางการค้า)	
	S. <i>bayanus</i> EC1118	S. <i>cerevisiae</i> FT1	S. <i>cerevisiae</i> Fermipan®	S. <i>cerevisiae</i> Sc90	S. <i>cerevisiae</i> TISTR 5051		
973	-	-	-	-	973	974	Nucleic acid [1], mannans [1,2,3,4]
-	984	987	-	985	-	-	ไม่สามารถระบุได้
998	994	994	994,998	994	998	990	β(1→6) glucans [1,2,3]
1015	1009	1009	1010	1012	1014	1013	ไม่สามารถระบุได้
1025	1023	1022	1023	1025	1024	-	Glycogen [1], β(1→4) glucans [3], α-glucans [5]
1038	1042	1041	1041	1040	1043	1037	Glycogen, mannans [1], β(1→3) glucans [3], β-glucans [5]
-	-	-	-	-	-	1051	Glycogen [1], mannans [1,3,4], α-glucans [5]
1078	1078	1079	1078	1078	1080	1080	Nucleic acid [1,2], glycogen [1], β(1→3) glucans [3,4,5]
1111	1112	1114	1110	1111	1109	1110	β(1→3) glucans [1,3,4]
1129	1139	-	1128	1133	-	-	Mannans [2,4], β(1→3) glucans [2]
-	-	1147	-	-	1151	-	Esters [1], C-O, C-OH carbohydrates [2], α-glucans [5]
1162	1163	1166	1161	1162	1166	1163	β-glucans [5]
-	-	-	-	-	-	1177	ไม่สามารถระบุได้

หมายเหตุ อ้างอิงจาก [1] Adt และคณะ, 2006; [2] Burattini และคณะ, 2008; [3] Galichet และคณะ, 2001; [4] Karreman และคณะ, 2007; [5] Sandula และคณะ, 1999

ตารางที่ 4.10 พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่บ่งบอกการมีอยู่ของบีตาไกลูแคนในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ของเซลล์ยีสต์และสารสกัดบีตาไกลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์ของยีสต์	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของบีตาไกลูแคน (%)	
	เซลล์ยีสต์	สารสกัด
<i>S. bayanus</i> EC1118	34.08	85.22
<i>S. cerevisiae</i> FT1	33.84	74.91
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	31.24	96.43
<i>S. cerevisiae</i> Sc90	49.55	81.72
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	39.27	87.37

หมายเหตุ พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของบีตาไกลูแคน คำนวณได้จาก เปรอร์เซ็นต์เทียบกับพื้นที่ใต้กราฟทั้งหมดในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  โดยพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของบีตาไกลูแคน ของเซลล์ยีสต์จะคำนวณที่ตำแหน่งของสเปกตรัมย่อยที่เลขคลื่นประมาณ 993 1027 1083 และ 1104 1123  $\text{cm}^{-1}$  ส่วนของสารสกัดจะคำนวณที่ตำแหน่งของสเปกตรัมย่อยที่เลขคลื่นประมาณ 996 1023 1041 1079 1111 1132 และ 1164  $\text{cm}^{-1}$

เมื่อเปรียบเทียบ FTIR สเปกตรัมของสารสกัดบีตาไกลูแคนจากยีสต์ทุกสายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า พบว่าให้รูปแบบสเปกตรัมย่อยที่บ่งบอกการมีอยู่ของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน และ  $\beta$ -1,6 กลูแคน เช่นเดียวกับที่พบในสารมาตรฐาน และเมื่อพิจารณาสัดส่วนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ต่อ  $\beta$ -1,6 กลูแคน ( $\beta$ -(1,3:1,6)) ในสารสกัดโดยคำนวณจากสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยทั้งหมดที่สอดคล้องกับ  $\beta$ -1,3 และ  $\beta$ -1,6 กลูแคน (ตารางที่ 4.11 และ 4.12) พบว่าสามารถแบ่งสารสกัดออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) สูง ได้แก่ สารสกัดจาก *S. bayanus* EC1118 *S. cerevisiae* FT1 และ *S. cerevisiae* Sc90 และกลุ่มที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ต่ำ ได้แก่ สารสกัดจาก *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup> *S. cerevisiae* TISTR 5051 และ สารสกัดทางการค้า และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ของเซลล์ยีสต์และสารสกัดบีตาไกลูแคนจากยีสต์ (ตารางที่ 4.11 และ 4.12) พบว่าสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ของสารสกัดบีตาไกลูแคนจากยีสต์เกือบทุกสายพันธุ์มีค่ามากกว่าสัดส่วนดังกล่าวของเซลล์ยีสต์ (ยกเว้นสาร

สกัดจาก *S. cerevisiae* Fermipan®) และยังพบว่าพื้นที่ได้กราฟที่สอดคล้องกับ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ในสารสกัดจากยีสต์ทุกสายพันธุ์มีค่ามากขึ้น แต่พื้นที่ได้กราฟที่สอดคล้องกับ  $\beta$ -1,6 กลูแคน ในสารสกัดจากยีสต์บางสายพันธุ์มีค่าน้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับค่าดังกล่าวในเซลล์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดปีตากลูแคนจากยีสต์ด้วยต่างและกรดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นวิธีที่สามารถสกัดปีตากลูแคนชนิด  $\beta$ -1,3 กลูแคน ออกจากเซลล์ยีสต์ได้ดี เนื่องจากปีตากลูแคนชนิดนี้มีสมบัติไม่ละลายทั้งในต่างและกรด (Fleet, 1991) แต่เนื่องจากเป็นวิธีที่รุนแรงจึงสามารถทำลายพันธะ  $\beta$ -1,6-D-ไกลโคซิดิก หรือทำให้ปีตากลูแคนที่มีพันธะ  $\beta$ -1,6 ไกลโคซิดิก อยู่ในสายหลักสามารถละลายในกรดได้บางส่วน จึงทำให้ปีตากลูแคนชนิดนี้ถูกกำจัดออกไปพร้อมกรดได้บ้างระหว่างการสกัด (Jamás และคณะ 1989 1991 และ 1992)

นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจที่พบว่าชุดข้อมูลของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ที่นำมาใช้คำนวณหาพื้นที่ได้กราฟของตัวอย่างเซลล์ยีสต์และสารสกัดปีตากลูแคนมีความแตกต่างกัน กล่าวคือสเปกตรัมย่อยที่เลขคลื่นประมาณ  $1041\text{ cm}^{-1}$  ที่พบในสารสกัดสามารถใช้คำนวณพื้นที่ได้กราฟที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งเลขคลื่นของสเปกตรัมย่อยดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับตำแหน่งเลขคลื่นของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ( $1042\text{ cm}^{-1}$ ) ดังที่ระบุไว้ในงานวิจัยของ Galichet และคณะ (2001) ในขณะที่ไม่สามารถระบุสเปกตรัมย่อยที่เลขคลื่นประมาณ  $1048\text{ cm}^{-1}$  ในเซลล์ยีสต์เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ได้ ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งเลขคลื่นของสเปกตรัมย่อยดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับตำแหน่งเลขคลื่นของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของแมนแนน ( $1045\text{-}1054\text{ cm}^{-1}$ ) ดังที่ระบุไว้ในงานวิจัยของ Adt และคณะ (2006) Galichet และคณะ (2001) และ Karreman และคณะ (2007) ซึ่งเป็นผลให้พื้นที่ได้กราฟที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ในสารสกัดมีค่ามากกว่าค่าดังกล่าวที่ได้จากเซลล์ยีสต์ และอาจส่งผลให้สัดส่วน  $\beta$ -(1,3:1,6) ในสารสกัดมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย (ยกเว้นกรณีของยีสต์ *S. cerevisiae* Fermipan®) ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าสเปกตรัมที่เป็นตัวแทนของแมนแนน จะมีผลต่อการระบุตำแหน่งของสเปกตรัมที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของสเปกตรัมย่อยช่วง  $1037\text{-}1051\text{ cm}^{-1}$  ที่เป็นตัวแทนของสารสองชนิดนี้อยู่ในช่วงเลขคลื่นใกล้เคียงกัน (ตำแหน่งเลขคลื่นแตกต่างกันน้อยกว่า  $10\text{ cm}^{-1}$ ) จึงยากแก่การระบุสเปกตรัมในช่วงดังกล่าวจะเป็นตัวแทนสารชนิดใด ดังนั้นหากจะประยุกต์ใช้เทคนิค FTIR spectroscopy ในการประเมินสัดส่วนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ในตัวอย่างเซลล์ยีสต์และสารสกัดปีตากลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ ต่อไป จึงควรที่จะคำนึงถึงปริมาณแมนแนนที่มีอยู่ในตัวอย่าง

ด้วย หากพบว่าในตัวอย่างมีแมนแนนปริมาณมาก (ดังเช่นที่พบในกรณีของตัวอย่างเซลล์ยีสต์) ก็ควรจะกำจัดแมนแนนออกจากตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

มีงานวิจัยที่ผ่านมารายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและสมบัติของปีตากุลแคนจากยีสต์ เช่น งานวิจัยของ Chen และ Seviour (2007) พบว่าปีตากุลแคนที่มีโครงสร้างของโมเลกุลที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3;1,6) ที่แตกต่างกัน จะให้สรรพคุณทางยา เช่น ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันและความสามารถในการต้านมะเร็งที่แตกต่างกัน และยังให้สมบัติการละลายของปีตากุลแคนที่แตกต่างกันอีกด้วย นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Jamas และคณะ (1991 และ 1992) ยังพบว่าปีตากุลแคนที่สกัดได้จากยีสต์ต่างชนิดจะมีสัดส่วนของพันธะ  $\beta$ -1,3-D-ไกลโคซิดิก และพันธะ  $\beta$ -1,6-D-ไกลโคซิดิก ในโมเลกุลปีตากุลแคนที่แตกต่างกันซึ่งจะส่งผลให้มีสมบัติด้านความหนืดที่แตกต่างกันด้วย จากข้อมูลทางด้านโครงสร้างทางเคมีของปีตากุลแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ ดังตารางที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดปีตากุลแคนที่มาจากยีสต์ต่างสายพันธุ์ก็จะมีสัดส่วน  $\beta$ -(1,3;1,6) ที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งคาดว่าความแตกต่างทางด้านสัดส่วน  $\beta$ -(1,3;1,6) ในสารสกัดนี้ น่าจะมีผลทำให้สมบัติในด้านต่างๆ ของสารสกัด เช่น สมบัติด้านการไหล สมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติที่เกี่ยวข้องกับสรรพคุณทางยามีความแตกต่างกันด้วย

ตารางที่ 4.11 สัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ในเซลล์ยีสต์

สายพันธุ์ยีสต์	พื้นที่ได้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็น	พื้นที่ได้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็น	สัดส่วนของ $\beta$ -(1,3:1,6)
	ตัวแทนของ $\beta$ -1,3 กลูแคน (%)	ตัวแทนของ $\beta$ -1,6 กลูแคน (%)	
<i>S. bayanus</i> EC1118	28.13	5.35	5.26
<i>S. cerevisiae</i> FT1	26.81	6.47	4.14
<i>S. cerevisiae</i> Sc90	40.63	8.68	4.68
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	24.12	6.36	3.79
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	29.25	8.75	3.34

หมายเหตุ เปรอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ได้แก่ สเปกตรัมย่อยที่เลขคลื่นประมาณ 1083 1104 และ 1123  $\text{cm}^{-1}$

เปรอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,6 กลูแคน ได้แก่ สเปกตรัมย่อยที่เลขคลื่นประมาณ 993  $\text{cm}^{-1}$

สัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) คำนวณได้จากสัดส่วนของเปรอร์เซ็นต์พื้นที่ได้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน และ  $\beta$ -1,6 กลูแคน

ตารางที่ 4.12 สัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ในสารสกัด

สารสกัดบีตาไกลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ $\beta$ -1,3 กลูแคน (%)	พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ $\beta$ -1,6 กลูแคน (%)	สัดส่วนของ $\beta$ -(1,3:1,6)
<i>S. bayanus</i> EC1118	67.85	3.44	19.70
<i>S. cerevisiae</i> FT1	62.79	3.41	18.40
<i>S. cerevisiae</i> Sc90	69.30	3.63	19.10
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	65.48	21.11	3.10
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	71.25	9.89	7.20
Innovacan <sup>®</sup>	32.75	8.10	4.04

หมายเหตุ เฟอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน ได้แก่ สเปกตรัมย่อยที่เลขคลื่นประมาณ 1041 1079 1111 และ 1132  $\text{cm}^{-1}$

เฟอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,6 กลูแคน ได้แก่ สเปกตรัมย่อยที่เลขคลื่นประมาณ 995  $\text{cm}^{-1}$

สัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) คำนวณได้จากสัดส่วนของเฟอร์เซ็นต์พื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมย่อยที่เป็นตัวแทนของ  $\beta$ -1,3 กลูแคน และ  $\beta$ -1,6 กลูแคน

#### 4.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดปีตากูแคน

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ทั้ง 3 ประการ ได้แก่ ความสามารถในการอุ้มน้ำ ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน และความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันของสารสกัดปีตากูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4.13) พบว่าสารสกัดปีตากูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 มีสมบัติเชิงหน้าที่ทั้ง 3 ประการด้อยที่สุด คือมีความสามารถในการอุ้มน้ำ น้ำมัน และการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันเท่ากับ 5.76 g น้ำ/g ตัวอย่างแห้ง 3.12 g น้ำมัน/g ตัวอย่างแห้ง และ 62.50% ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากยีสต์สายพันธุ์อื่นมีสมบัติเชิงหน้าที่ทั้ง 3 ประการที่ใกล้เคียงกัน คือ มีความสามารถในการอุ้มน้ำ น้ำมัน และเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันอยู่ในช่วง 10-11 g น้ำ/g ตัวอย่างแห้ง 4-6 g น้ำมัน/g ตัวอย่างแห้ง และ 67-68% ตามลำดับ การที่สมบัติเชิงหน้าที่ทั้ง 3 ประการของสารสกัดจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 ด้อยกว่าสารสกัดจากยีสต์สายพันธุ์อื่นนั้น อาจเนื่องมาจากสารสกัดจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 มีปริมาณปีตากูแคน และโปรตีนในปริมาณที่น้อยกว่าสารสกัดจากยีสต์สายพันธุ์อื่น การที่ปริมาณของปีตากูแคนและโปรตีนมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของสารต่าง ๆ นั้น อาจเนื่องมาจากสาร 2 ชนิดนี้มีโมเลกุลขนาดใหญ่ โครงสร้างของโมเลกุลมีกิ่งก้านมาก รวมทั้งมีหมู่มีซัลฟ์และไม่มีซัลฟ์อยู่ภายในโมเลกุลจำนวนมาก ซึ่งจะส่งผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำ น้ำมัน และเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน (นิธิยา รัตนานพนธ์, 2549; Fennema, 1996)



ตารางที่ 4.13 ความสามารถในการอุ้มน้ำ อุ้มน้ำมัน และเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันที่ได้จากสารสกัดปีตากลูดแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า

สารสกัดปีตากลูดแคนจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ	ความสามารถในการอุ้มน้ำ (g น้ำ/g ตัวอย่างแห้ง)	ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (g น้ำมัน/g ตัวอย่างแห้ง)	ความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน (%)
<i>S. bayanus</i> EC1118	10.00 <sup>b</sup> ± 0.23	4.12 <sup>c</sup> ± 0.17	68.23 <sup>a</sup> ± 0.74
<i>S. cerevisiae</i> FT1	9.55 <sup>bc</sup> ± 0.16	4.50 <sup>b</sup> ± 0.15	67.19 <sup>ab</sup> ± 0.74
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	9.60 <sup>bc</sup> ± 0.33	4.16 <sup>c</sup> ± 0.11	68.23 <sup>a</sup> ± 0.74
<i>S. cerevisiae</i> Sc90	11.18 <sup>a</sup> ± 0.43	5.76 <sup>a</sup> ± 0.09	66.67 <sup>b</sup> ± 0.00
<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5051	5.76 <sup>d</sup> ± 0.17	3.12 <sup>d</sup> ± 0.05	62.50 <sup>c</sup> ± 0.00
Innovacan <sup>®</sup>	9.34 <sup>c</sup> ± 0.16	1.83 <sup>e</sup> ± 0.13	66.67 <sup>b</sup> ± 0.00

หมายเหตุ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงมาตรฐาน

a, b, ... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของปีตากลูดแคนมีอิทธิพลต่อสมบัติเชิงหน้าที่มากกว่าโครงสร้างของปีตากลูดแคน ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดปีตากลูดแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์มีปริมาณปีตากลูดแคนเพียง 28-46% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง ประกอบกับมีปริมาณองค์ประกอบอื่นๆ โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรต (ที่ไม่ใช่ปีตากลูดแคน) และโปรตีนเจือปนอยู่ค่อนข้างมาก ซึ่งสิ่งเจือปนต่างๆ เหล่านี้อาจบดบังผลเนื่องจากความแตกต่างทางโครงสร้างของปีตากลูดแคนต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัด ดังนั้นถ้าสารสกัดปีตากลูดแคนมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นก็น่าจะทำให้ความแตกต่างทางโครงสร้างของปีตากลูดแคนมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่เด่นชัดขึ้นด้วย

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติเชิงหน้าที่ทั้ง 3 ประการของสารสกัดปีตากลูดแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์กับสารสกัดทางการค้า (ตารางที่ 4.13) พบว่าสารสกัดจากยีสต์ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการอุ้มน้ำและการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันใกล้เคียงกับสารสกัดทางการค้า (ยกเว้นสารสกัดจาก *S. cerevisiae* TISTR 5051) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารสกัดจากยีสต์ทุกสายพันธุ์มีปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกับสารสกัดทางการค้า แต่พบว่าสารสกัดจากยีสต์ทุกสายพันธุ์มีความสามารถในการอุ้มน้ำมันดีกว่าสารสกัดทางการค้า แม้ว่าปริมาณองค์ประกอบทางเคมีมีค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างทางด้านขนาดอนุภาคของสารสกัด เนื่องจากความสามารถในการการอุ้มน้ำมันของสารคือความสามารถที่สารจะดูดซับน้ำมันเข้าไปแทรกตัวเป็นฟิล์มบางๆ อยู่ที่ช่องว่างระหว่างอนุภาคของสาร ซึ่งโดยทั่วไปสารที่มีอนุภาคขนาดเล็กจะมีช่องว่างระหว่างอนุภาคน้อยเนื่องจากอนุภาคจะอัดตัวกันแน่น ทำให้น้ำมันเข้าไปแทรกอยู่ที่ช่องว่างระหว่างอนุภาคได้น้อย จึงทำให้มีความสามารถในการอุ้มน้ำมันได้ต่ำกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ ดังนั้นการที่สารสกัดทางการค้ามีขนาดเล็กกว่าขนาดอนุภาคของสารสกัดจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ (เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า) จึงน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สารสกัดทางการค้ามีความสามารถในการอุ้มน้ำมันดีกว่าสารสกัดจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์

จากงานวิจัยของ Thammakiti และคณะ (2004) ซึ่งศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดปีตากลูดแคนจากบรีวเวอร์ยีสต์ (spent brewer's yeast) *S. uvarum* ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเบียร์ที่ใช้สภาวะในการสกัดเช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดปีตากลูดแคนที่ได้มีความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันดีกว่า แต่มีความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันใกล้เคียงกับสารสกัดจากงานวิจัยนี้ ทั้งนี้การที่ความสามารถในการอุ้มน้ำและน้ำมันของสารสกัดแตกต่างกันนั้น ไม่น่าจะเกิดจากความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากงานวิจัยของ Thammakiti และคณะ (2004) (ปีตากลูดแคน 55.21% โปรตีน 6.54% เกล็ด 0.55% และไขมัน 0.20% ของน้ำหนักแห้ง) มีค่า

ใกล้เคียงกับค่าดังกล่าวของสารสกัดที่ได้จากงานวิจัยนี้ (ตารางที่ 4.5) แต่อาจเกิดจากผลของความแตกต่างทางด้านขนาดและลักษณะอนุภาคของสารสกัดเนื่องจากวิธีทำแห้งที่ต่างกัน กล่าวคือสารสกัดจากงานวิจัยของ Thammakiti และคณะ (2004) ทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย (spray dry) ส่วนสารสกัดจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์จากงานวิจัยนี้ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze dry) จากงานวิจัยของ Hromádková และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของวิธีทำแห้งต่อสมบัติทางกายภาพของสารสกัดบีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าสารสกัดบีตากลูแคนที่ทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอยมีสมบัติการอุ้มน้ำต่ำกว่าสารสกัดที่ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง ทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคของสารสกัดที่ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งจะมีขนาดใหญ่และมีโครงสร้างที่มีรูพรุนมากกว่า สารสกัดที่ทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอยจึงทำให้สามารถเก็บกักน้ำไว้ในอนุภาคได้มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบข้อมูลที่กล่าวไปข้างต้น

ในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากสารสกัดบีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ในอาหารสัตว์และเครื่องสำอางกันอย่างแพร่หลาย และยังพบว่าเริ่มมีการศึกษาเกี่ยวกับการนำสารสกัดบีตากลูแคนมาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับมนุษย์ เช่น การใช้บีตากลูแคนเป็นสารทดแทนไขมันในมายองเนสสูตรลดไขมัน (Worrasinchai และคณะ, 2006) หรือช่วยชะลอการเกิดริ้วรอยเรขาค้นในเจลแบ่งขาว (Satrapai และ Suphantharika, 2007) ซึ่งสมบัติเชิงหน้าที่ของบีตากลูแคนมีบทบาทสำคัญมากต่อการใช้ประโยชน์ดังกล่าว เช่น การที่มายองเนสสูตรลดไขมันที่ทดแทนไขมันด้วยบีตากลูแคนในสัดส่วนการแทนที่สูงถึง 50% ยังคงมีลักษณะเนื้อสัมผัสและความคงตัวใกล้เคียงกับสูตรควบคุมและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค น่าจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเพิ่มความหนืดและเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันของบีตากลูแคน ในกรณีของการชะลอการเกิดริ้วรอยเรขาค้น น่าจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความความสามารถในการอุ้มน้ำและเพิ่มความแน่นเนื้อให้กับเจลแบ่งขาว จึงช่วยชะลอการเคลื่อนที่และการรวมกลุ่มของโมเลกุลสตาร์ชโดยเฉพาะแอมิโลส และช่วยชะลอการแยกตัวของน้ำ จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ไปใช้ปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของอาหาร อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการนำสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์มาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับมนุษย์ยังมีน้อย ทั้งนี้เนื่องจากการผลิตสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ต้องใช้ต้นทุนผลิตสูง แต่การศึกษาการนำสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์ไปใช้ปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของอาหารก็ยังคงควรศึกษาเพิ่มเติมไว้เพื่อใช้เป็นทางเลือกใหม่สำหรับการนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารที่มีสมบัติที่หลากหลายในตัวเดียว

#### 4.6 พฤติกรรมการไหลของสารสกัดบีตาไกลูแคน

จากการวิเคราะห์พฤติกรรมการไหลของสารแขวนลอยบีตาไกลูแคนจากยีสต์ทุกสายพันธุ์ และบีตาไกลูแคนทางการค้า (Innovacan<sup>®</sup>) ที่ความเข้มข้น 10% w/w พบว่าสารแขวนลอยบีตาไกลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 ความเข้มข้น 10% w/w ไม่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์พฤติกรรมการไหลได้ เนื่องจากอนุภาคบีตาไกลูแคนตกตะกอนอย่างรวดเร็วขณะทดลอง ดังนั้นผลการวิเคราะห์พฤติกรรมการไหลจึงเป็นผลการวิเคราะห์ของสารแขวนลอยบีตาไกลูแคนจากยีสต์เพียง 4 สายพันธุ์และบีตาไกลูแคนทางการค้าเท่านั้น

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์พฤติกรรมการไหลของสารแขวนลอยบีตาไกลูแคนจากยีสต์ 4 สายพันธุ์และบีตาไกลูแคนทางการค้า โดยอธิบายพฤติกรรมการไหลของสารตัวอย่างด้วย Herschel-Bulkley model (ตารางที่ 4.14) พบว่าสารแขวนลอยบีตาไกลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup> และสารสกัดทางการค้ามีพฤติกรรมการไหลแบบ pseudoplastic (shear-thinning) กล่าวคือเป็นของไหลที่มีความหนืดลดลงเมื่ออัตราเฉือนเพิ่มขึ้น (Fennema, 1996; Dinger, 2002) และไม่มี yield stress ส่วนสารแขวนลอยบีตาไกลูแคนจากยีสต์ *S. cerevisiae* EC1118 มีพฤติกรรมการไหลเป็นแบบ yield-pseudoplastic กล่าวคือเป็นของไหลที่ต้องการความเค้นเฉือนค่าหนึ่ง (yield stress) มาช่วยทำให้เกิดการไหลและเมื่อเกิดการไหลแล้วของไหลก็จะแสดงการไหลแบบ pseudoplastic (Dinger, 2002) ส่วนสารแขวนลอยบีตาไกลูแคนจากยีสต์ *S. bayanus* FT1 และ *S. cerevisiae* Sc90 มีพฤติกรรมการไหลแบบ Bingham plastic กล่าวคือเป็นของไหลที่ต้องการความเค้นเฉือนค่าหนึ่งมาทำให้เกิดการไหล และเมื่อเกิดการไหลแล้วความเค้นเฉือนจะมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผันตรงกับอัตราเฉือนหรือกล่าวได้ว่าความหนืดของของไหลจะคงที่ไม่ขึ้นอยู่กับอัตราเฉือน (Dinger, 2002) (กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเฉือนและความเค้นเฉือนของสารแขวนลอยบีตาไกลูแคนจากยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้าแสดงในภาคผนวก จ)

ตารางที่ 4.14 ข้อมูลการอธิบายพฤติกรรมการไหลของสารสกัดบีตากลูแคนจากยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ Herschel-Bulkley model

บีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ	ค่าพารามิเตอร์ใน Herschel-Bulkley model			
	$\tau_0$ (Pa)	K (Pa·s <sup>n</sup> )	n	R <sup>2</sup>
<i>S. bayanus</i> EC1118	6.37 ± 5.07	1.17 ± 0.80	0.67 ± 0.23	0.95-0.99
	$\tau_0 > 0, n < 1 \rightarrow$ Yield-pseudoplastic fluid			
<i>S. cerevisiae</i> FT1	9.61 ± 6.98	0.23 ± 0.08	1	0.97-0.99
	$\tau_0 > 0, n = 1 \rightarrow$ Bingham plastic fluid			
<i>S. cerevisiae</i> Fermipan <sup>®</sup>	0	1.14 ± 0.25	0.70 ± 0.04	1.00
	$\tau_0 = 0, n < 1 \rightarrow$ Pseudoplastic fluid			
<i>S. cerevisiae</i> Sc90	75.84 ± 16.86	0.53 ± 0.07	1	0.95-1.00
	$\tau_0 > 0, n = 1 \rightarrow$ Bingham plastic fluid			
Innovacan <sup>®</sup>	0	1.33 ± 0.29	0.78 ± 0.02	1.00
	$\tau_0 = 0, n < 1 \rightarrow$ Pseudoplastic fluid			

หมายเหตุ รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงมาตรฐาน

อธิบายพฤติกรรมการไหลของสารตัวอย่างในช่วงอัตราเฉือน 2-138 s<sup>-1</sup> ยกเว้นสารตัวอย่างจากยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 จะใช้ข้อมูลในช่วงอัตราเฉือน 51-138 s<sup>-1</sup>

Herschel-Bulkley model:  $\tau = \tau_0 + K \dot{\gamma}^n$  โดยที่  $\tau_0$  คือ yield stress (Pa);  $\tau$  คือความเค้นเฉือน (shear stress) (Pa);  $\dot{\gamma}$  คืออัตราเฉือน (shear rate) (s<sup>-1</sup>); n คือ flow behavior index; K คือ consistency index (Pa·s<sup>n</sup>)

จากการพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) (ตารางที่ 4.12) กับ พฤติกรรมการไหลของสารสกัดปีตากูแคนจากยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า (ตารางที่ 4.14) พบว่าระบบสารแขวนลอยปีตากูแคนจากยีสต์ที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) สูง (มี กิ่งก้านน้อย) มีแนวโน้มที่จะเป็นของไหลที่มีพฤติกรรมแบบ yield-pseudoplastic หรือ Bingham plastic ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากภายในระบบมีปีตากูแคนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และเป็นสายยาวอยู่ เป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปโมเลกุลเหล่านี้จะคูดน้ำได้ดีและพองตัวได้มากซึ่งจะทำให้โมเลกุลมี ขนาดใหญ่และเกิดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างโมเลกุลปีตากูแคนด้วยกันจึงทำให้เกิดการ รวมตัวกันเป็นกลุ่มด้วยแรงอ่อนๆ เช่น แรงแวนเดอวาลส์ (van der Waals force) ซึ่งกลุ่มของ โมเลกุลปีตากูแคนนี้จะเรียกว่า ฟลอคส์ (flocs) ดังนั้นการที่ระบบจะเกิดการไหลขึ้นจึงต้องมีแรงที่ ใช้ทำลายแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของปีตากูแคนที่รวมกลุ่มกัน นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของ โมเลกุล ปีตากูแคนเนื่องจากแรงเฉือนยังทำให้เกิดแรงเสียดทานระหว่างโมเลกุลของปีตากู แคนด้วยกันอีก ซึ่งแรงที่ใช้ในทำลายแรงยึดเหนี่ยวและเอาชนะแรงเสียดทานระหว่างโมเลกุลนี้ก็คือ ค่า yield stress นั่นเอง เมื่อระบบเกิดการไหลแล้วยังมีการเพิ่มอัตราเฉือนให้กับสารแขวนลอย อย่างต่อเนื่องก็จะทำให้โมเลกุลส่วนหนึ่งเกิดการเรียงตัวใหม่ให้อยู่ในทิศทางของการไหล (deformation) ในขณะที่โมเลกุลของปีตากูแคนทั้งหมดมีการเคลื่อนที่แบบบราวน์เนียน (brownian movement) อยู่ ดังนั้นอาจมีปีตากูแคนบางโมเลกุลที่จัดเรียงตัวกลับสู่สภาพเดิม (reformation) เพื่อรักษาสมดุลของระบบและทำให้ระบบเกิดการไหลแบบ Bingham plastic แต่ถ้าโมเลกุลของปีตากูแคนในระบบไม่สามารถรักษาสมดุลไว้ได้เมื่อมีการเพิ่มอัตราเฉือน กล่าวคือ จำนวนโมเลกุลของปีตากูแคนเกิดการเรียงตัวใหม่ให้อยู่ในทิศทางของการไหลมีมากกว่าจำนวน โมเลกุลที่พยายามจัดเรียงตัวกลับสู่สภาพเดิม จึงทำให้ระบบเกิดการไหลแบบ pseudoplastic (อรวรรณ ทิตยวัชรณ, 2527; Fennema, 1996; Dinger, 2002)

ส่วนระบบสารแขวนลอยปีตากูแคนจากยีสต์ที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ต่ำ มีแนวโน้มที่ จะเป็นของไหลที่มีพฤติกรรมแบบ pseudoplastic โดยปราศจาก yield stress ทั้งนี้อาจ เนื่องมาจากภายในระบบมีปีตากูแคนที่มีโมเลกุลเป็นสายยาวและโมเลกุลที่มีกิ่งก้านปะปนกันอยู่ เป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปโมเลกุลที่มีกิ่งก้านจะมีโครงสร้างที่เกะกะและไม่เป็นระเบียบสูง และ รวมตัวกับโมเลกุลอื่นๆ ที่อยู่ได้ใกล้เคียงได้ไม่เต็มที่เท่าที่ควร จึงทำให้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุล ของปีตากูแคนประเภทนี้ไม่เพียงพอที่จะขัดขวางการไหล ดังนั้นเมื่อเริ่มให้แรงเฉือนแก่ระบบก็จะ เกิดการไหลขึ้นทันที และเมื่อเพิ่มอัตราเฉือนอาจทำให้โมเลกุลของปีตากูแคนในกลุ่มนี้จัดเรียงตัว

เป็นระเบียบมากขึ้นในทิศทางของแนวแรงทำให้มีแรงต้านการไหลลดลง (อรุวรรณ ทิตยวรรณ, 2527; Dinger, 2002)

จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดบีตากลูแคนที่มีสัดส่วน  $\beta$ -(1,3:1,6) หรือมีโครงสร้างของบีตากลูแคนที่แตกต่างกันจะส่งผลให้มีพฤติกรรมไหลแตกต่างกันด้วย ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวได้มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้เช่น Jamas และคณะ (1991 และ 1992) พบว่าสารสกัดบีตากลูแคนที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) สูงขึ้น จะให้สารแขวนลอยบีตากลูแคนที่มีความหนืดเพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์ที่อัตราเฉือนเท่ากัน นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่อาจส่งผลต่อพฤติกรรมไหล เช่น ขนาดอนุภาคของสารสกัด เนื่องจากสารสกัดที่ได้จากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ไม่สามารถละลายในน้ำได้และมีขนาดอนุภาคค่อนข้างใหญ่ ดังนั้นเมื่อนำสารสกัดมาผสมกับน้ำจะได้สารแขวนลอยที่มีอนุภาคของสารสกัดตกตะกอนอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่งผลให้สารแขวนลอยดังกล่าวไม่สามารถนำไปวิเคราะห์พฤติกรรมไหลได้ ดังนั้นจึงต้องมีการลดขนาดอนุภาคของสารสกัดด้วยวิธีโซนิเคชัน (sonication) เพื่อชะลอการตกตะกอนของอนุภาคสารสกัดระหว่างวิเคราะห์พฤติกรรมไหล แต่เนื่องจากการลดขนาดอนุภาคด้วยวิธีดังกล่าวไม่สามารถป้องกันการตกตะกอนของสารสกัดได้อย่างสมบูรณ์จึงทำให้ผลการวิเคราะห์พฤติกรรมไหลมีความแปรปรวนสูง ดังนั้นจึงต้องนำข้อมูลการวิเคราะห์ทั้งหมดที่ได้มาผ่านกระบวนการทางคณิตศาสตร์เพื่อลดความแปรปรวนของข้อมูล ซึ่งเมื่อนำข้อมูลที่ปรับค่าแล้วมาใช้วิเคราะห์ต่อเพื่ออธิบายพฤติกรรมไหลของสารตัวอย่างโดยใช้ Herschel-Bulkley model พบว่าสามารถนำมาใช้อธิบายพฤติกรรมไหลของสารตัวอย่างได้เป็นอย่างดีเนื่องจากข้อมูลที่ได้มีค่า  $R^2$  สูงถึง 0.95-1.00

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เมื่อวิเคราะห์ผลผลิตสารสกัดปีตากูแคนจากยีสต์ *Saccharomyces* ทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยควบคุมภาวะในการเลี้ยงและสกัดปีตากูแคนให้เหมือนกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตของสารสกัดปีตากูแคนจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน (13-15% โดยน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง) ยกเว้น *S. cerevisiae* TISTR 5051 ที่ให้ผลผลิตของสารสกัดสูงถึง 25% ของน้ำหนักเซลล์ยีสต์แห้ง แต่เมื่อพิจารณาปริมาณปีตากูแคนของสารสกัดกลับพบว่าสารสกัดจาก *S. cerevisiae* TISTR 5051 มีความบริสุทธิ์ต่ำที่สุด (28% โดยน้ำหนักแห้ง) ในขณะที่สารสกัดจากยีสต์ชนิดอื่นและสารสกัดทางการค้ามีปริมาณปีตากูแคนใกล้เคียงกัน (40-46% โดยน้ำหนักแห้ง)

จากผลการวิเคราะห์โครงสร้างปีตากูแคนในสารสกัดโดยใช้ FTIR spectroscopy พบว่าสามารถแบ่งสารสกัดออกได้เป็น 2 กลุ่มตามสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) คือ กลุ่มที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) สูง ได้แก่ สารสกัดจาก *S. bayanus* EC1118 *S. cerevisiae* FT1 และ *S. cerevisiae* Sc90 และกลุ่มที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ต่ำ ได้แก่ สารสกัดจาก *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup> *S. cerevisiae* TISTR 5051 และสารสกัดทางการค้า และยังพบว่าโครงสร้างของปีตากูแคนในสารสกัดสัมพันธ์กับพฤติกรรมการไหล กล่าวคือสารแขวนลอยของสารสกัดปีตากูแคนที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) สูง จะมีพฤติกรรมการไหลแบบ yield-pseudoplastic หรือ Bingham plastic ส่วนสารแขวนลอยของสารสกัดที่มีสัดส่วนของ  $\beta$ -(1,3:1,6) ต่ำ จะมีพฤติกรรมการไหลแบบ pseudoplastic

จากผลทดสอบสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัด พบว่าสารสกัดจาก *S. cerevisiae* TISTR 5051 มีสมบัติเชิงหน้าที่ทั้ง 3 ประการดีกว่าสารสกัดจากยีสต์สายพันธุ์อื่น ส่วนสารสกัดจากยีสต์อีก 4 สายพันธุ์มีสมบัติเชิงหน้าที่ทั้ง 3 ประการที่ใกล้เคียงกัน และยังพบว่าสารสกัดทางการค้ามีความสามารถในการอุ้มน้ำมันดีกว่า แต่มีความสามารถในการอุ้มน้ำและความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันใกล้เคียงกับสารสกัดจากยีสต์เกือบทุกสายพันธุ์ (ยกเว้น *S. cerevisiae* TISTR 5051) ซึ่งจะเห็นได้ว่าความแตกต่างของสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดไม่มีความสัมพันธ์อย่างชัดเจนกับความแตกต่างด้านโครงสร้างของปีตากูแคน แต่อาจเกี่ยวข้องกับ ความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีโดยเฉพาะปริมาณปีตากูแคนและโปรตีนที่มีอยู่ในสารสกัด



## ข้อเสนอแนะ

จากผลงานวิจัยจะเห็นได้ว่าการสกัดปีตากูแคนด้วยต่างและกรดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จะได้สารสกัดที่มีปีตากูแคนเพียง 28-46% ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงควรศึกษาการสกัดปีตากูแคนด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เช่น การสกัดปีตากูแคนโดยใช้ภาวะในการสกัดที่ไม่รุนแรง เพื่อช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตและความบริสุทธิ์ของสารสกัดปีตากูแคน ซึ่งจะส่งผลให้การศึกษาโครงสร้างของปีตากูแคนในสารสกัดด้วยเทคนิค FTIR spectroscopy มีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น และอาจพบความสัมพันธ์ที่ชัดเจนขึ้นระหว่างโครงสร้างของปีตากูแคนในสารสกัดและสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัด

นอกจากนี้ จากผลการทดลองที่ได้ยังพบว่าสายพันธุ์ของยีสต์ไม่มีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดที่มีปริมาณของปีตากูแคนไม่เกิน 50% แต่เกี่ยวข้องกับความแตกต่างด้านโครงสร้างของปีตากูแคนที่มีอยู่ในสารสกัด ดังนั้นหากพิจารณาถึงการนำสารสกัดจากยีสต์ *Saccharomyces* สายพันธุ์ต่างๆ ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม จึงสามารถเลือกใช้ยีสต์สายพันธุ์ใดก็ได้มาสกัดปีตากูแคนที่มีความบริสุทธิ์ไม่สูงมากนักเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร แต่หากจะนำสารสกัดไปใช้ประโยชน์ทางยา ควรพิจารณาเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ให้สารสกัดที่มีโครงสร้างของปีตากูแคนที่เหมาะสม ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของปีตากูแคนมีความสัมพันธ์กับสรรพคุณทางยาของสารสกัด ดังนั้นสารสกัดที่ประกอบด้วยปีตากูแคนที่มีโครงสร้างจำเพาะอาจมีสรรพคุณทางยาตามที่คุณต้องการด้วย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- ชื่นจิตต์ บุญเจิด, จีรพันธุ์ วรพงษ์, คอร์เนล เวอร์เดิน และสรวง อุดมวรภัณฑ. 2546. คู่มือปฏิบัติการวิชา SCBT 302 : สรีรวิทยาจุลินทรีย์. กรุงเทพมหานคร: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- นางลักษณ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นิธิยา รัตนานพนธ์. 2549. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: โอ.เอส. พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- นิพนธ์ ตังคณานุรักษ์ และคณิตา ตังคณานุรักษ์. 2547. สเปกโทรสโกปีด้านการวิเคราะห์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เย็นหทัย แน่นหนา. 2549. สเปกโทรสโกปีสำหรับเคมีอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรัญญา พรเจริญ. 2549. การผลิตกลูแคนจากกากยีสต์หมักแอลกอฮอล์และสมบัติเชิงหน้าที่ของกลูแคน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมจิต ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก (Fermentation Technology). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพ.
- สาวิตวี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. 2549. ยีสต์คุณสมบัติพิเศษในอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: งานส่งเสริมภาพลักษณ์องค์กร.
- โสภา กลิ่นจันทร์. 2548. กระบวนการแยกสำหรับเทคโนโลยีชีวภาพ 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์ผลิตตำราเรียน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ.
- อรวรรณ ทิตยวรรณ. 2527. วิทยาศาสตร์การไหลทางเภสัชกรรม. เชียงใหม่: ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

## ภาษาอังกฤษ

- Adt, I., Toubas, D., Pinon, J.-M., Manfait, M. G., and Sockalingum, G. D. 2006. FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*. Archives Microbiology 185: 277-285.
- Aguilar-Uscanga, B., and François, J. M. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. Letters in Applied Microbiology 37: 268–274.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 16<sup>th</sup> ed. Washington D.C.: The Association of the Official Analytical Chemists.
- Bahmed, K., Quilès, F., Bonaly, R., and Coulon, J. 2003. Fluorescence and infrared spectrometric study of cell walls from *Candida*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula*, and *Schizosaccharomyces* yeasts in relation with their chemical composition. Biomacromolecules 4: 1763-1772.
- Bohn, J. A., and BeMiller, J. N. 1995. (1→3)- $\beta$ -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. Carbohydrate Polymers 28: 3-14.
- Burattini, E., Cavagna, M., Dell'Anna, R., Campeggi, F. M., Monti, F., Rossi, F., and Torriani, S. 2008. A FTIR microspectroscopy study of autolysis in cells of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Vibrational Spectroscopy 47: 139-147.
- Chen, J., and Seviour, R. 2007. Medicinal importance of fungal  $\beta$ -(1→3), (1→6)-glucans. Microbiological Research 3: 635-652.
- Dinger, D. R. 2002. Rheology for Ceramists. 1<sup>st</sup> ed. United States: Morris Publishing.
- Essendoubi, M., Toubas, D., Bouzaggou, M., Pinon, J.-M., Manfait, M., and Sockalingum, G. D. 2005. Rapid identification of *Candida* species by FT-IR microspectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1724: 239 - 247.

- Fennema, O. R. 1996. Food Chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Marcel Dekker.
- Fleet, G. H. 1991. Cell Walls. In A. H. Rose, and J. S. Harrison (eds.), The Yeasts: Yeast organelles, pp. 199-277. London: Academic Press.
- Freimund, S., Sauter, M., Kappeli, O., and Dutler, H. 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3- $\beta$ -D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydrate Polymers 54: 159-171.
- Galichet, A., Sockalingum, G. D., Belarbi, A., and Manfait, M. 2001. FTIR spectroscopic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: study of an anomalous strain exhibiting a pink-colored cell phenotype. FEMS Microbiology Letter 197: 179-186.
- Garip, S., Gozen, A. C., and Severcan, F. 2009. Use of Fourier transform infrared spectroscopy for rapid comparative analysis of *Bacillus* and *Micrococcus* isolates. Food Chemistry 113: 1301-1307.
- Ha, C. H., Lim, K. H., Kim, Y. T., Kim, C. W., and Chang, H. I. 2002. Analysis of alkali-soluble glucan produced by *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutants. Applied Microbiology and Biotechnology 58: 370-377.
- Hromádková, Z., Ebringerová, A., Sasinková, V., Šandula, J., Hříbalová, V., and Omelková, J. 2003. Influence of the drying method on the physical properties and immunomodulatory activity of the particulate (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydrate Polymers 51: 9-15.
- Iorio, E., Torosantucci, A., Bromuro, C., Chiani, P., Ferretti, A., Giannini, M., Cassone, A., and Podo, F. 2008. *Candida albicans* cell wall comprises a branched  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 6)-glucan with  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-side chains. Carbohydrate Research 343: 1050-1061.
- Jamas, S., Rha, C., and Sinskey, A. J. 1989. Glucan Composition and Process for Preparation thereof. U.S. Patent 4,810,646.
- Jamas, S., Rha, C., and Sinskey, A. J. 1991. Glucan Composition and Process for Preparation thereof. U.S. Patent 5,028,703.

- Jamas, S., Rha, C., and Sinskey, A. J. 1992. Glucan Composition and Process for Preparation thereof. U.S. Patent 5,082,936.
- Jilkine, K., Gough, K. M., Julian, R., and Kaminskyj, S. G. W. 2007. A sensitive method for examining whole-cell biochemical composition in single cells of filamentous fungi using synchrotron FTIR spectromicroscopy. Journal of Inorganic Biochemistry. [Article in press]
- Kapteyn, J. C., Ende, H. V. D., and Klis, F. M. 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics 1426: 373-383.
- Karreman, R. J., Dague, E., Gaboriaud, F., Quilès, F., Duval, J. F. L., and Lindsey, G. G. 2007. The stress response protein Hsp 12p increases the flexibility of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics 1774: 131-137.
- Kim, K. S., and Yun, H.S. 2006. Production of soluble  $\beta$ -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology 39: 496-500.
- Kim, K. S., Chang, J. E., and Yun, H. S. 2004. Estimation of soluble  $\beta$ -glucan content of yeast cell wall by the sensitivity to Glucanex<sup>®</sup> 200 treatment. Enzyme and Microbial Technology 35: 672-677.
- Klis, F., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. 2002. Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology 26: 239-256.
- Li-Chan, E. C. Y., Ismail, A. A., Sedman, J., and Voort, F. R. 2002. Vibrational spectroscopy: application in life, pharmaceutical and natural sciences. In J. M. Chalmers, and P. R. Griffiths (eds.), Vibrational Spectroscopy of Food and Food Products, pp. 3629-3640. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Liu, X. Y., Wang, Q., Cui, S. W., and Liu, H. Z. 2008. A new isolation method of  $\beta$ -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Food Hydrocolloids 22: 239-247.
- Manners, D. J., Masson, A. J., and Patterson, A. J. 1973. The structure of a  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan from yeast cell walls. Biochemistry 135: 19-30.

- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.-P., Braak, N. V. D., Endtz, H. P., Naumann, D., and Puppels, G. J. 2002. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. Journal of Microbiological Methods 51: 255- 271.
- Marcotte, L., Kegelaer, G., Sandt, C., Barbeau, J., and LaXeur, M. 2007. An alternative infrared spectroscopy assay for the quantification of polysaccharides in bacterial samples. Analytical Biochemistry 361: 7-14.
- Matile, P., Moor, H., and Robinow., C. F. 1969. Yeast cytology. In A. H. Rose, and J. S. Harrison (eds.), The Yeasts: Biology of Yeasts, pp. 219-302. London: Academic Press.
- Morgan, K. 2000. Cereal  $\beta$ -glucans. In G. O. Phillips, and P. A. Williams (eds.), Handbook of Hydrocolloids, pp. 287-307. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Nakajima, T., Nishihara, H., Chiba, Y., and Matsuda, K. 1988. Structural alteration of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* mutants. Journal of Fermentation Technology 66: 251-255.
- Nguyen, T. H., Fleet, G. H., and Rogers, P. L. 1998. Composition of the cell walls of several yeast species. Applied Microbiology and Biotechnology 50: 206-212.
- Palomero, F., Morata, A., Benito, S., Calder, F., and Suárez-Lepe, J. A. 2009. New genera of yeasts for over-lees aging of red wine. Food Chemistry 112: 432-441.
- Ray, B., and Bhunia, A. 2008. Fundamental Food Microbiology. 4<sup>th</sup> ed. New York: CRC Press.
- Reed, G., and Nagodawithana, T. W. 1991. Yeast derived products. In G. Reed, and T. W. Nagodawithana (eds.), Yeast Technology, pp. 369-412. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Saksinchai, S., Supphantharika, M., and Verduyn, C. 2001. Application of simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki: a physiological study. World Journal of Microbiology and Biotechnology 17: 307-316.

- Šandula, J., Kogan, G., Kacurakova, M., and Machova, E. 1999. Microbial (1→3)- $\beta$ -D-glucans, their preparation, physico - chemical characterization and immunomodulatory activity. Carbohydrate Polymers 38: 247-253.
- Satrapai, S., and Supphantharika, M. 2007. Influence of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucan on gelatinization and retrogradation of rice starch. Carbohydrate Polymers 67: 500-510.
- Schreuder, M. P., Mooren, A. T. A., Toschka, H. U., Verrps, C. T., and Klis, F. M. 1996. Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. Trends in Biotechnology 14: 115-120.
- Sockalingum, G. D., Bouhedja, W., Pina, P., P. Allouch, Mandray, C., Labia, R., Millot, J. M., and Manfait, M. 1997. ATR-FTIR spectroscopic investigation of imipenem-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa* isogenic strains. Biochemical and Biophysical Research Communications 232: 240-246.
- Sockalingum, G. D., Sandt, C., Toubas, D., Gomez, J., Pina, P., Beguinot, I., Witthuhn, F., Aubert, D., Allouch, P., Pinon, J.M., and Manfait, M. 2002. FTIR characterization of *Candida* species: a study on some reference strains and pathogenic *C. albicans* isolates from HIV<sup>+</sup> patients. Vibrational Spectroscopy 28: 137-146.
- Temelli, F. 1997. Extraction and functional properties of barley  $\beta$ -glucan as affected by temperature and pH. Journal of Food Science 62: 1194-1197, 1201.
- Temelli, F., and Burkus, Z. 2000. Stabilization of emulsions and foams using barley  $\beta$ -glucan. Food Research International 33: 27-33.
- Thammakiti, S., Supphantharika, M., Phaesuwan, T., and Verduyn, C. 2004. Preparation of spent brewer's yeast  $\beta$ -glucans for potential applications in the food industry. International Journal of Food Science and Technology 39: 21-29.
- Volman, J. J., Ramakers, J. D., and Plat, J. 2008. Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans. Physiology and Behavior 94: 276-284.
- Walker, G. M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. 1<sup>st</sup> ed. Chichester: John Wiley & Sons.

- Wang, C., and Damodaran, S. 1990. Thermal gelation of globular protein: weight-average molecular weight dependence of gel strength. Journal of Agricultural and Food Chemistry 38: 1157-1164.
- Wang, Y., Yao, S., and Wu, T. 2003. Combination of induced autolysis and sodium hypochlorite oxidation for the production of *Saccharomyces cerevisiae* (1→3)- $\beta$ -D-glucan. World Journal of Microbiology and Biotechnology 19: 947-952.
- Wheatcroft, R., Kulandai, J., Gilbert, R. W., Sime, K. J., Smith, C. G., and Langeris, W. H. 2002. Production of Beta - Glucan-Mannan Preparations by Autolysis of Cells under Certain pH, Temperature and Time Conditions. U.S. Patent 6,444,448.
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., and Jamnong, P. 2006.  $\beta$ -glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. Food Hydrocolloids 20: 68-78.



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมหัวเชื้อยีสต์และวิธีการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

#### ภาคผนวก ก.1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

##### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. หลอดทดลองขนาด 15x160 mL
3. Vortex mixer (Labnet รุ่น VX100, USA)
4. ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่ อุณหภูมิ 30 °C (Memmert, Germany)
5. Loop เขี่ยเชื้อ
6. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C

##### อาหารเลี้ยงเชื้อ

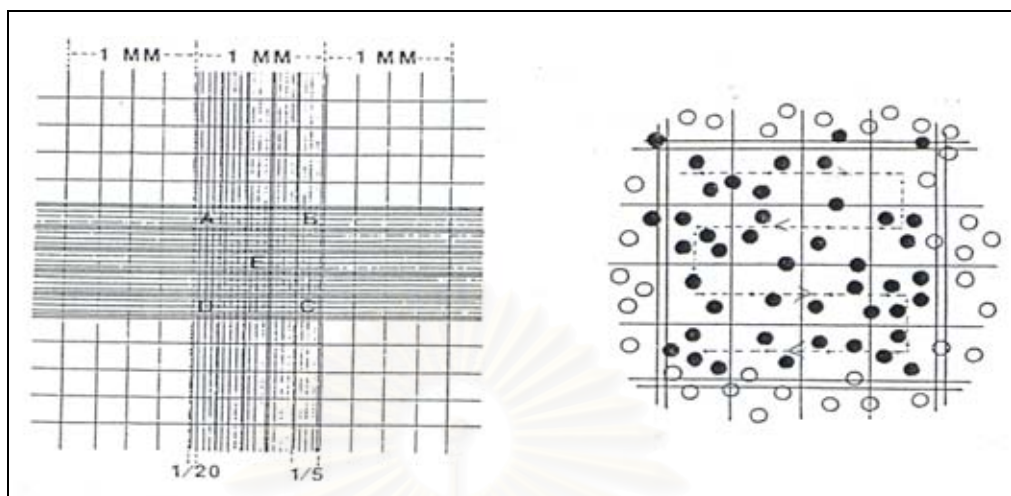
1. YM broth
  - Meat peptone (Britania, Argentina)
  - Dextrose (glucose) (Britania, Argentina)
  - Malt extract powder (Himedia, India)
  - Yeast extract powder (Himedia, India)
2. YM agar
  - Meat peptone (Britania, Argentina)
  - Dextrose (glucose)(Britania, Argentina)
  - Malt extract powder (Himedia, India)
  - Yeast extract powder (Himedia, India)
  - Agar (ตรานางเงือก, ประเทศไทย)

### วิธีวิเคราะห์

1. เชื้อเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (master culture หรือ stock culture) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar (Malt extract 0.3%, Yeast extract 0.3%, Peptone 0.5%, Glucose 1%, Agar 2%) ในจานเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน แล้วเลือกโคโลนีเดียวมาเลี้ยงต่อบนอาหารร่วนผิวเฉียง YM agar slant ที่ภาวะเดียวกับที่เลี้ยงบนอาหารในจานเพาะเชื้อ เชื้อที่เลี้ยงได้จะถูกนำไปใช้เป็น sub-master culture
2. เชื้อเชื้อจาก sub-master culture จำนวน 5 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth จำนวน 120 mL ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 mL บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 hr
3. นำเชื้อที่เลี้ยงได้มา 6 mL ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth จำนวน 600 mL ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 L จำนวน 4 ขวด บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 200 rpm อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 hr จนได้เชื้อประมาณ 10<sup>8</sup> เซลล์ (นับเชื้อด้วย direct cell count โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์) และนำเชื้อที่เลี้ยงได้มาตรวจดูความบริสุทธิ์ของเชื้อว่าไม่มีเชื้ออื่นปะปนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ก่อนนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (bioreactor) ขนาดใหญ่ในขั้นตอนต่อไป

### ภาคผนวก ก.2 การนับเชื้อด้วยวิธี direct cell count โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

1. นำตัวอย่างเซลล์ยีสต์ที่ต้องการนับจำนวนเซลล์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และหยดตัวอย่างเซลล์ยีสต์เจือจางลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)
2. นำฮีมาไซโตมิเตอร์จากข้อ 1 มาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า และนับจำนวนเซลล์ในช่อง A, B, C, D, E ในตารางของ counting chamber (รูป 1 (ก)) และนับเซลล์ในแต่ละช่องด้วยตามรูปที่ 1 (ข)



(ก)

(ข)

รูปที่ ก1. (ก) ตารางของ counting chamber แสดงช่อง A, B, C, D, E สำหรับนับเซลล์

(ข) วิธีนับเซลล์ในแต่ละช่อง A, B, C, D, E โดยที่

- คือ เซลล์ที่ต้องนับ
- คือ เซลล์ที่ไม่ต้องนับ

ที่มา: ชื่นจิตต์ บุญเจิด และคณะ (2546)

3. คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่นับได้ โดยใช้วิธีคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาตร 1 ช่อง (A/B/C/D/E)} = 1/5 \times 1/5 \times 1/10 = 1/250 \text{ mm}^3$$

$$\text{ปริมาตรรวม (A+B+C+D+E)} = 5 \times 1/250 = 1/50 \text{ mm}^3$$

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ในปริมาตร } 1/50 \text{ mm}^3 = X \text{ cells}$$

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้ในปริมาตร 1 mL (10}^3 \text{ mm}^3) = 5X \times 10^3 \text{ cells}$$

$$\therefore \text{จำนวนเซลล์ที่นับได้} = 50X \times 10^3 \times \text{dilution factor cells/mL}$$

$$= 5X \times 10^4 \times \text{dilution factor cells/mL}$$

## ภาคผนวก ข

### การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

#### ภาคผนวก ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ตามวิธี AOAC (2005)

##### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert รุ่น W350, Germany)
2. ถ้วยอะลูมิเนียม
3. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น AB204, Switzerland)
4. โถดูดความชื้น (desiccator) บรรจุ silica gel

##### วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างเซลล์ยีสต์หรือสารสกัดปีตากูแคนที่บดละเอียดประมาณ 2 g ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมซึ่งอบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. นำตัวอย่างเข้าอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่  $105 \pm 2^{\circ}\text{C}$  โดยเปิดฝาไว้เป็นเวลา 16–18 hr หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่
3. ปิดฝาภาชนะในขณะที่ยังอยู่ในตู้อบ แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก
4. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสมการที่ ข.1

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \left( \frac{W_1 - W_2}{W_1} \right) \times 100 \quad (\text{ข.1})$$

โดยที่  $W_1$  คือน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (g)

$W_2$  คือน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (g)

#### ภาคผนวก ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันทั้งหมด (Crude Fat) ด้วยเครื่องสกัดไขมัน

Soxtech Avanti รุ่น 2050

##### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องสกัดไขมัน Soxtech Avanti รุ่น 2050 (Foss Tecator, Sweden)
2. ชุดอุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ไขมันประกอบด้วย

- Thimble
  - Thimble stand
  - Thimble handler
  - Thimble adapter
  - Cup stand á
  - Extraction cup
  - Extraction cup holder
  - คีมจับ Extraction cup
  - Solvent addition kit และ dispenser
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert รุ่น W350, Germany)
  4. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
  5. โถดูดความชื้น (desiccator) ที่มี silica gel สำหรับดูดความชื้น

### สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) (Fisher Scientific, UK)

### วิธีวิเคราะห์

#### การเตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เปิดน้ำหล่อเย็นไว้ก่อนการวิเคราะห์ ให้มีอุณหภูมิไม่เกิน 20 °C
2. ตั้งโปรแกรมสำหรับการสกัดดังนี้
  - Boiling time 15 min
  - Rinsing time 30 min
  - Recovery time 10 min
  - Drying time 10 min
3. ตั้งค่าอุณหภูมิในการสกัดเท่ากับ 135 °C และ preheat เครื่องก่อนการวิเคราะห์
4. ล้าง extraction cup ให้สะอาดแล้วอบที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนัก extraction cup เปล่าที่แน่นอน
5. ใส่ extraction cup ในโถดูดความชื้นสำหรับการสกัดไขมัน

### การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักประมาณ 2.5 g ลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1
2. นำตัวอย่างใส่ thimble แล้วใส่สำลีปราศจากไขมันลงบนตัวอย่างให้ครบ และใส่ Adapter ที่ขอบ thimble
3. ย้าย thimble ลงใน thimble support ที่ติดอยู่กับ holder ใส่ thimble ที่ extraction unit
4. ใส่ extraction cup ลงใน cup holder แล้วนำเข้าเครื่อง (extraction unit)
5. ใส่ปิโตรเลียมอีเทอร์ประมาณ 70-80 mL ลงใน extraction cup ทางด้านบนของเครื่อง โดยใช้ solvent addition kit ที่ต่อกับ dispenser
6. เริ่มสกัดโดยกดปุ่ม start ที่ control unit
7. นำ extraction cup ที่ได้หลังการสกัดไขมัน ไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 30 min แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นจากนั้นชั่งน้ำหนัก extraction cup ที่แน่นอน
8. คำนวณปริมาณไขมันในตัวอย่างจากสมการ ข.2

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = \left( \frac{W_2 - W_1}{W} \right) \times 100 \quad (\text{ข.2})$$

โดยที่  $W_1$  คือน้ำหนัก extraction cup เปล่า (g)

$W_2$  คือน้ำหนัก extraction cup หลังสกัดไขมัน (g)

$W$  คือน้ำหนักตัวอย่างแห้ง (g)

### ภาคผนวก ข.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl's Method ตามวิธีของ AOAC (2005)

#### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องย่อยโปรตีน ยี่ห้อ Buchi รุ่น K-424, Switzerland
2. เครื่องกลั่นไนโตรเจน ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-324, Switzerland

#### สารเคมี

1. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 N (Ajax Finechem, Austraria)
2. สารละลายกรดบอริก (Ajax Finechem, Austraria) ความเข้มข้น 4%
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Carlo Erba, France) ความเข้มข้น 35%

4. สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (J.T. Baker, USA)
5. สารผสมซีลีเนียมมิกเซอร์ (Merck, Germany)
6. อินดิเคเตอร์ [เตรียมโดยละลายเมทิลเรด (Merck KGaA, Germany) จำนวน 0.125 g และเมทิลลีนบลู (Riedel-de Haën, Germany) จำนวน 0.0825 g ในเอทานอล 90 % ปริมาตร 100 mL]

### วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างเซลล์ยีสต์หรือสารสกัดบีตากลูแคนมา 0.5-1.0 g ใส่ลงในกระดาษกรองเบอร์ 1 และห่อกระดาษกรองใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน (ในกรณีการเตรียม blank ใช้กระดาษกรองเพียงอย่างเดียว)
2. ชั่งสารผสมซีลีเนียมมิกเซอร์มา 5 g ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีนที่มีสารตัวอย่าง เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย
3. เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 25 mL ลงในหลอดย่อย แล้วเขย่าเบาๆ
4. ต่อหลอดย่อยโปรตีนเข้ากับเครื่องย่อยโปรตีน เปิดเครื่องย่อย และทำการย่อยประมาณ 30-40 min จนได้สารละลายใส
5. ยกหลอดย่อยโปรตีนออกจากเครื่องย่อยและตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. นำหลอดย่อยโปรตีนที่เย็นแล้วและขวดรูปชมพู่ที่มีอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ต่อเข้ากับเครื่องกลั่น กลั่นตัวอย่างที่ภาวะดังนี้
  - สารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 35% ปริมาตร 70 mL
  - สารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 4% ปริมาตร 50 mL
  - น้ำกลั่น ปริมาตร 50 mL
  - ระยะเวลาในการกลั่น 4 min
7. ไทเทรตสารละลายที่ได้จากการกลั่นกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานความเข้มข้น 0.1 mol/L จนได้สารละลายสีม่วงอมเทา บันทึกปริมาตรของกรดที่ใช้ในการไทเทรต คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนดังสมการ ข.3 และ ข.4



$$\text{ร้อยละปริมาณไนโตรเจน} = \frac{1.4007 \times (V - V_0) \times \text{ความเข้มข้นของ HCl (N)}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (g)}} \quad (\text{ข.3})$$

โดยที่  $V$  คือปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง (mL)

$V_0$  คือปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานที่ใช้ไทเทรต blank (mL)

$$\text{ร้อยละปริมาณโปรตีน} = \text{ร้อยละปริมาณไนโตรเจน} \times 6.25 \quad (\text{ข.4})$$

#### ภาคผนวก ข.4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Ash) ตามวิธีของ AOAC (2005)

##### อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เตาเผา (Muffle furnace, Carbolite รุ่น CWF 1200, England)
- ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible)
- เครื่องให้ความร้อน (Hot plate, Framo® - Gerätetechnik รุ่น M 21/1, Germany)
- โถดูดความชื้น (desiccator) บรรจุ silica gel

##### วิธีวิเคราะห์

- เผาถ้วยกระเบื้องพร้อมฝาปิดในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 °C นาน 30 min ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก
- ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างเซลล์ยีสต์หรือสารสกัดบีตากลูแคนประมาณ 3-5 g ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ บันทึกน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องพร้อมฝาปิดและตัวอย่าง ( $W_1$ )
- เผาตัวอย่างที่อยู่ในถ้วยกระเบื้องด้วย hot plate จนตัวอย่างกลายเป็นสีดำ แล้วนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 °C โดยเปิดฝาถ้วยกระเบื้องไว้จนตัวอย่างกลายเป็นเถ้าสีขาวเทาหรือจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำออกมาทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องพร้อมฝาปิด และเถ้า ( $W_2$ )
- คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสมการที่ ข.5

$$\text{ร้อยละปริมาณเถ้า} = \left( \frac{W_2 - W}{W_1 - W} \right) \times 100 \quad (\text{ข.5})$$

โดยที่  $W$  คือน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมฝาปิด (g)

$W_1$  คือน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบพร้อมฝาปิดและตัวอย่างก่อนเผา (g)

$W_2$  คือน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องพร้อมฝาปิดและเถ้าของตัวอย่างหลังเผา (g)

### ภาคผนวก ข.5 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตคำนวณได้ตามสูตรดังนี้

$$\text{ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (\% dry basis)} = 100 - (\% \text{ โปรตีน} + \% \text{ เถ้า} + \% \text{ ไขมัน})$$

### ภาคผนวก ข.6 การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคน

การวิเคราะห์ปริมาณบีตากลูแคนในตัวอย่างเซลล์ยีสต์และสารสกัดบีตากลูแคนจะใช้ชุด Mushroom and Yeast Beta-Glucan Assay Kit (K-YBGL) ของบริษัท Megazyme ประเทศไอร์แลนด์ โดยมีรายการสารเคมีและขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

#### สารเคมีที่มาพร้อมกับชุดทดสอบสำเร็จรูป

ขวดที่ 1: สารแขวนลอยของเอนไซม์ผสมระหว่าง exo-1,3- $\beta$ -Glucanase (100 U/mL) และ

$\beta$ -Glucosidase (20 U/mL) จำนวน 2 mL

(เก็บได้นานกว่า 4 ปี ที่อุณหภูมิ 4 °C)

ขวดที่ 2: สารละลายของเอนไซม์ผสมระหว่าง Amyloglucosidase (1630 U/mL) และ Invertase

(500 U/mL) ในกลีเซอรอล 50 % v/v จำนวน 20 mL

(เก็บได้นานประมาณ 2 ปี ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือนานกว่า 4 ปี ที่อุณหภูมิ -20 °C)

ขวดที่ 3: Glucose reagent buffer (concentrate; 50 mL)

(เก็บได้นานประมาณ 2 ปี ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือนานกว่า 4 ปี ที่อุณหภูมิ -20 °C)

ขวดที่ 4: Glucose determination reagent

ความเข้มข้นของสารหลังจากละลายในบัฟเฟอร์ คือ

Glucose oxidase > 12,000 U/L

Peroxidase > 650 U/L

4-Aminoantipyrine 0.4 mM

(เก็บได้นานกว่า 4 ปี ที่อุณหภูมิ -20 °C)

ขวดที่ 5: สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (5 mL ความเข้มข้น 1 mg/mL) ในกรดเบนโซอิก 0.2 % w/v

(เก็บได้นานกว่า 4 ปี ที่อุณหภูมิห้อง)

ขวดที่ 6: Control yeast  $\beta$ -glucan (ประมาณ 2 g ระบุปริมาณ  $\beta$ -glucan ที่แน่นอนไว้ข้างขวด)

(เก็บได้นานกว่า 5 ปี ที่อุณหภูมิห้อง)

**การเตรียมสารที่มาพร้อมกับชุดทดสอบสำเร็จรูปก่อนใช้ทดสอบ**

1. เติมน้ำโซเดียมแอสซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 mM (pH 5.0) ปริมาตร 8 mL ลงในขวดที่ 1 เพื่อเจือจางสารละลาย แล้วแบ่งสารให้ได้ปริมาณที่เหมาะสมกับการใช้งานโดยบรรจุลงใน Eppendorf tube ปริมาตร 2 mL แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C (ระหว่างการใช้งานควรแช่ในน้ำแข็ง) เอนไซม์ผสมที่เจือจางแล้วจะสามารถเก็บได้นานกว่า 2 ปี ที่อุณหภูมิ -20 °C
2. สารละลายที่บรรจุอยู่ในขวดที่ 2 เป็นสารที่พร้อมที่จะใช้ทดสอบ
3. เจือจางสารในขวดที่ 3 ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำ deionised ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 L สามารถเก็บสารละลายได้นานกว่า 2 ปี ที่อุณหภูมิ 4 °C
4. ละลายสารที่บรรจุในขวดที่ 4 ลงในสารละลายที่ได้จากข้อ 3 แบ่งสารที่ได้เป็นส่วนๆ ในปริมาณที่เหมาะสมแก่การใช้งาน (สารผสมนี้จะเรียกว่า GOPOD reagent) บรรจุในขวดสีชา โดยจะเก็บได้นาน 2-3 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือนานกว่า 12 เดือน ที่อุณหภูมิ -20 °C
5. สารละลายที่บรรจุอยู่ในขวดที่ 5 และ 6 เป็นสารที่พร้อมที่จะใช้ทดสอบ

**สารที่ต้องเตรียมไว้ใช้กับชุดทดสอบสำเร็จรูป**

1. โซเดียมแอสซิเตตบัฟเฟอร์ (200 mM, pH 5.0)

เติมกรดแอสซิติค ชนิด glacial (J.T. Baker, USA) (1.05 g/ mL) 11.6 mL ลงในน้ำกลั่น 900 mL ปรับ pH ให้เป็น 5.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Carlo

Erba, France) ความเข้มข้น 4 M (16 g/100 mL) และปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น (เก็บบัฟเฟอร์ได้นานประมาณ 1 ปี ที่อุณหภูมิ 4 °C)

2. โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ (1.2 M, pH 3.8)

เติมกรดอะซิติก ชนิด glacial (1.05 g/mL) 69.6 mL ลงในน้ำกลั่น 800 mL ปรับ pH ให้เป็น 3.8 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 M (16 g/100 mL) และปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น (เก็บบัฟเฟอร์ได้นานกว่า 2 ปี ที่อุณหภูมิห้อง)

3. โฟแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (2 M)

เติมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Fisher scientific, UK) 112 g ลงในน้ำกลั่น 800 mL คนจนละลายหมด และปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น (เก็บสารละลายได้นานกว่า 2 ปี ที่อุณหภูมิห้อง)

4. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (J.T. Baker, USA) (37 % v/v; ~ 10 M) (conc. HCl) (เก็บสารได้นานกว่า 10 ปี ที่อุณหภูมิห้อง)

### อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดสอบ

1. หลอดทดลองฝาเกลียว พร้อมฝา
  - หลอดแก้วขนาด 20 x 125 mm
  - หลอดแก้วขนาด 16 x 125 mm
2. อ่างบรรจุน้ำเดือด (อาจใช้เครื่องทอดแบบน้ำมันท่วมบรรจุน้ำแทนได้)
3. Micropipettor ขนาด 100 - 1000  $\mu$ L
4. ปิเปตขนาด 5 - 10 mL
5. Magnetic stirrer (Sterogass รุ่น steromag, Italy) ก้าน stirrer bar (6 x 15 mm)
6. เครื่องชั่ง (Sartorius รุ่น BP 310, Germany)
7. เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ (spectrophotometer) (Spectronic รุ่น 20 Genrsys, USA) ตั้งค่าความยาวคลื่นที่ 510 nm
8. เครื่อง vortex mixer (Labnet รุ่น VX100, USA)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ตั้งค่าอุณหภูมิที่ 30 และ 40 °C
10. เครื่องปั่นเหวี่ยง (ความเร็วรอบที่ต้องการ คือ 6000 rpm และ 1500xg) พร้อมหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงขนาด 80 และ 250 mL (Hettichi รุ่น ROTANTA 460R, Germany)

## การวิเคราะห์หาปริมาณปีตากุลแคนในตัวอย่างเซลล์ยีสต์และสารสกัดปีตากุลแคน

### 1. การหาปริมาณกลูแคนทั้งหมด ( $\alpha$ -glucan + $\beta$ -glucan + D-glucose ใน oligosaccharides, sucrose และ free D-glucose)

#### 1.1 การทำละลายกลูแคนทั้งหมดและทำให้เกิดการไฮโดรไลซ์บางส่วนในโมเลกุลของ กลูแคน ( $\alpha$ -glucan + $\beta$ -glucan + D-glucose ใน oligosaccharides, sucrose และ free D-glucose)

1.1.1 นำตัวอย่างที่บดแล้วมาประมาณ 0.1 g และชั่งน้ำหนักที่แน่นอนใส่ลงใน หลอดทดลองขนาด 20 x 125 mm และเขย่าให้ตัวอย่างทั้งหมดตกลงไปที่ ก้นหลอด

1.1.2 เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (37 % v/v) 1.5 mL ลงในหลอดที่ บรรจุตัวอย่างปิดฝาหลอด และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นนำไปอุ่นในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C เป็นเวลา 45 min และนำหลอดที่อุ่นนั้นออกมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer ทุกๆ 15 min (เพื่อให้แน่ใจว่าปีตากุลแคนละลายได้อย่างสมบูรณ์)

1.1.3 เติมน้ำ 10 mL ลงในหลอดแต่ละหลอด ปิดฝาหลอด และเขย่าให้เข้ากัน ด้วยเครื่อง vortex mixer

1.1.4 คลายเกลียวที่ฝาหลอดและนำหลอดไปต้มในน้ำเดือด หลังจากเวลาผ่านไป 5 min ให้ปิดฝาหลอดให้แน่น และต้มต่อไปอีก 2 hr

1.1.5 นำหลอดบรรจุตัวอย่างมาทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง จากนั้นคลาย เกลียวที่ฝาหลอดอย่างระมัดระวัง และเติมสารละลายโพแทสเซียม ไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 N จำนวน 10 mL

1.1.6 ถ่ายสารละลายในแต่ละหลอดลงขวดวัดปริมาตรขนาด 100 mL และใช้ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 mM (pH 5.0) ล้างหลอดและ ปรับปริมาตร จากนั้นจึงผสมสารในขวดวัดปริมาตรให้เข้ากัน

1.1.7 กรองสารแขวนลอยด้วยกระดาษกรอง Whatman GF/A glass fiber หรือ ปั่นเหวี่ยงที่ 6000 rpm นาน 10 min

1.2 การหาปริมาณกลูแคนทั้งหมด ( $\alpha$ -glucan +  $\beta$ -glucan + D-glucose ใน oligosaccharides, sucrose และ free D-glucose)

1.2.1 นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการกรองหรือปั่นเหวี่ยงมา 0.1 mL ถ้ายใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 100 mm

1.2.2 เติมสารผสมของเอนไซม์  $\text{exo-1,3-}\beta\text{-glucanase}$  (20 U/mL) และ  $\beta\text{-glucosidase}$  (4 U/mL) ในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 mM (pH 5.0) จำนวน 0.1 mL ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  นาน 60 min

1.2.3 เติมสารผสมของเอนไซม์ glucose oxidase/peroxidase (GOPOD) จำนวน 3.0 mL ลงในหลอดที่มีสารละลายตัวอย่างแต่ละหลอด และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  นาน 20 min

1.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายทั้งหมดที่ความยาวคลื่น 510 nm (เทียบกับ reagent blank)

**หมายเหตุ**

1. ในแต่ละชุดของการวิเคราะห์ควรประกอบด้วยตัวอย่างยีสต์ควบคุม (control yeast  $\beta$ -glucan) อย่างน้อย 1 ตัวอย่าง reagent blank 1 ตัวอย่าง และ glucose standard  $100\ \mu\text{g}$  จำนวน 4 ซ้ำ
2. Reagent blank ประกอบด้วยโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 mM (pH 5.0) จำนวน 0.2 mL ผสมกับ glucose oxidase/peroxidase reagent จำนวน 3.0 mL
3. D-glucose standard ประกอบด้วย D-glucose standard (1mg/mL) จำนวน 0.1 mL ผสมกับโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 200 mM (pH 5.0) จำนวน 0.1 mL และ glucose oxidase/peroxidase reagent จำนวน 3.0 mL

## 2. การหาปริมาณ $\alpha$ -glucan (phytoglycogen+starch) + D-glucose ใน oligosaccharides, sucrose และ free D-glucose

### 2.1 การทำละลาย ไฮโดรไลซ์ และการหาปริมาณ $\alpha$ -glucan (phytoglycogen และ starch) และ D-glucose ใน oligosaccharides, sucrose และ free D-glucose

2.1.1 นำตัวอย่างยีสต์หรือสารสกัดบีตาไกลูแคนที่บดแล้วมา 0.1 g ซึ่งน้ำหนักที่แน่นอนใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 20 x 125 mm และเขย่าให้ตัวอย่างตกลงไปที่ก้นหลอด

2.1.2 ใส่ magnetic stirrer bar ขนาด 6 x 15 mm ลงในหลอดทดลองที่บรรจุตัวอย่าง และเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นปริมาตร 2 mL ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด กวนผสมสาร โดยวางหลอดทดลองในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งที่วางอยู่บน magnetic stirrer ประมาณ 20 min

2.1.3 เติมโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 1.2 M (pH 3.8) ปริมาตร 8 mL ลงในหลอดทดลอง คนให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารผสมระหว่างเอนไซม์ amyloglucosidase (1630 U/mL) และ invertase (500 U/mL) จำนวน 0.2 mL และผสมให้เข้ากัน

2.1.4 บ่มหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 30 min และนำหลอดมาเขย่าด้วยเครื่อง vortex stirrer เป็นระยะๆ

2.1.5 การแยกสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการทำละลายและไฮโดรไลซ์แล้ว แบ่งออกเป็น 2 กรณี คือ

2.1.5.1 สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณ  $\alpha$ -glucan มากกว่า 10 %: ถ่ายสารจากหลอดทดลองลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 mL ใช้น้ำชะล้างหลอดทดลองและปรับปริมาตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นแยกที่ 1,500xg นาน 10 min หรือกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 cm)

2.1.5.2 สำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณ  $\alpha$ -glucan น้อยกว่า 10%: นำหลอดทดลองไปปั่นแยกที่ 1,500xg นาน 10 min (โดยไม่ต้องเจือจาง) สำหรับแต่ละตัวอย่างจะมีปริมาตรสุดท้าย ประมาณ 10.3 mL (อย่างไรก็ตามปริมาตรอาจจะแตกต่างกันเล็กน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์)

2.1.6 ถ้วยของเหลวที่ได้จากขั้นตอนในข้อ 5 มา 0.1 mL ใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 100 mm (ทำ 3 ซ้ำ) จากนั้นเติม GOPOD reagent จำนวน 3.0 mL และบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 20 min

2.1.7 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายทั้งหมดที่ความยาวคลื่น 510 nm (เทียบกับ reagent blank)

#### หมายเหตุ

1. โดยทั่วไปตัวอย่างยีสต์และเห็ดจะมีปริมาณ  $\alpha$ -glucan น้อยกว่า 10% อย่างไรก็ตามในกรณีของเห็ดราที่เป็นเส้นใยที่มีขายในเชิงการค้าบางชนิดซึ่งถูกเลี้ยงบนเมล็ดธัญพืชนั้น พบว่าอาจมีสตาร์ชสูงถึง 75 %
2. การทดสอบด้วยวิธีนี้ไม่สามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณ  $\beta$ -glucan ในยีสต์ เมื่อมี cellulose (1,4- $\beta$ -D-glucan) ผสมอยู่ด้วยได้

#### การคำนวณหาปริมาณบิตากลูแคน

$$\begin{aligned} \text{กลูแคนทั้งหมด (\% w/w)} &= \frac{\Delta E}{0.1} \times F \times \frac{100}{1000} \times \frac{1}{W} \times \frac{100}{180} \times \frac{162}{180} \\ &= \Delta E \times F/W \times 90 \end{aligned}$$



$$\begin{aligned} \text{แอลฟาไกลูแคน (\% w/w)} &= \Delta E \times F \times 1000 \times \frac{1}{(\text{หรือ } 103)} \times \frac{100}{1000} \times \frac{162}{W} \times \frac{1}{180} \\ &= \Delta E \times F/W \times 90 \text{ (ปริมาตรสุดท้าย 100 mL)} \\ &= \Delta E \times F/W \times 9.27 \text{ (ปริมาตรสุดท้าย 10.3 mL)} \end{aligned}$$

$$\text{บีตาไกลูแคน (\% w/w)} = \text{กลูแคนทั้งหมด} - \text{แอลฟาไกลูแคน}$$

โดยที่  $\Delta E$  = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง - ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

$F$  = ค่าที่ใช้ในการเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงไปเป็นค่าน้ำหนักในหน่วย  $\mu\text{g}$  ของ D-glucose

$$= \frac{100}{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากกลูโคสมาตรฐานจำนวน 100 } \mu\text{g)}}$$

$100/0.1$  = volume correction factor ของกลูแคนทั้งหมด เนื่องจากนำสารละลาย ตัวอย่างมาวิเคราะห์เพียง 0.1 mL จากปริมาตรของสารละลายทั้งหมด จำนวน 100 mL

Volume correction factor ของ  $\alpha$ -glucan มี 2 แบบคือ

$103$  = volume correction factor ของ  $\alpha$ -glucan (เนื่องจากนำสารละลาย ตัวอย่างจำนวน 0.1 mL จากปริมาตรของสารละลายทั้งหมด 10.3 mL มาใช้ในการวิเคราะห์)

$1000$  = volume correction factor ของ  $\alpha$ -glucan (เนื่องจากนำสารละลาย ตัวอย่างจำนวน 0.1 mL จากปริมาตรของสารละลายทั้งหมด 100 mL มาใช้ในการวิเคราะห์)

$1/1000$  = ค่าที่ใช้เปลี่ยนหน่วยน้ำหนักจาก  $\mu\text{g}$  เป็น mg

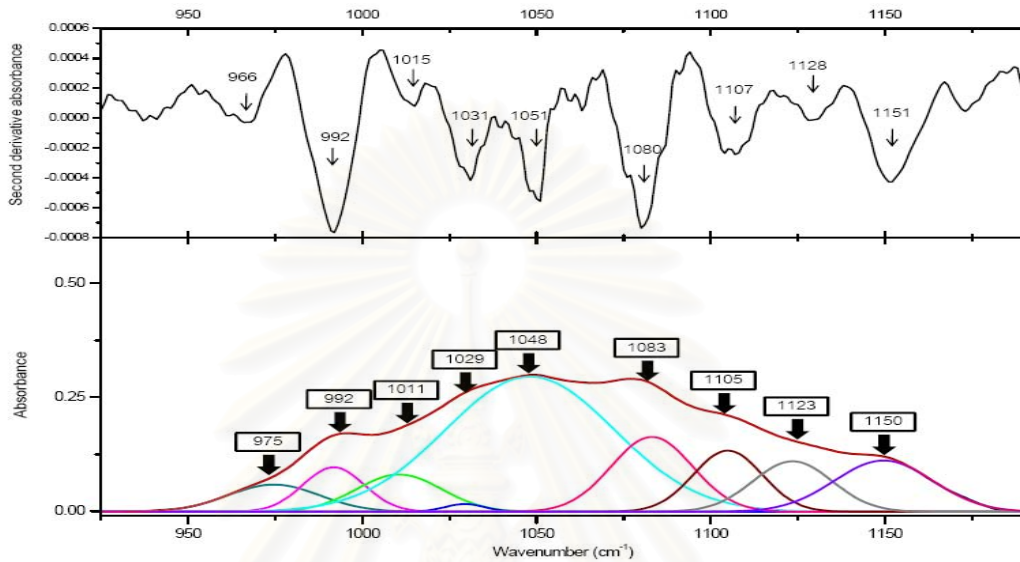
$100/W$  = ค่าที่ใช้คิดย้อนกลับไปเป็น 100 mg ของสารตัวอย่าง (เช่น % w/w)

$W$  = น้ำหนักของสารตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

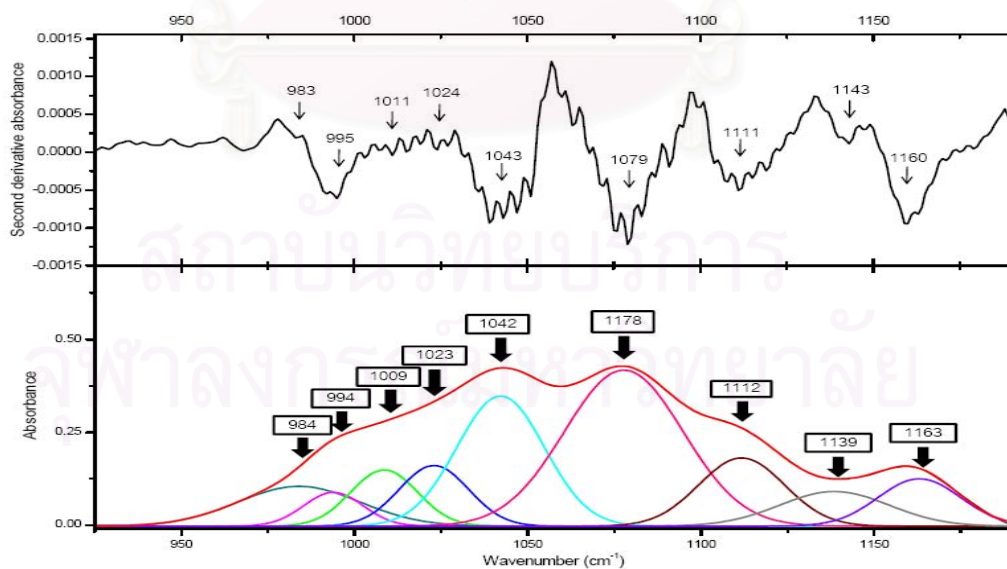
$162/180$  = ค่าที่ใช้เปลี่ยนแปลงปริมาณ free D-glucose ที่วิเคราะห์ได้ไปเป็นปริมาณ anhydroglucose ที่พบใน  $\beta$ -glucan

## ภาคผนวก ค

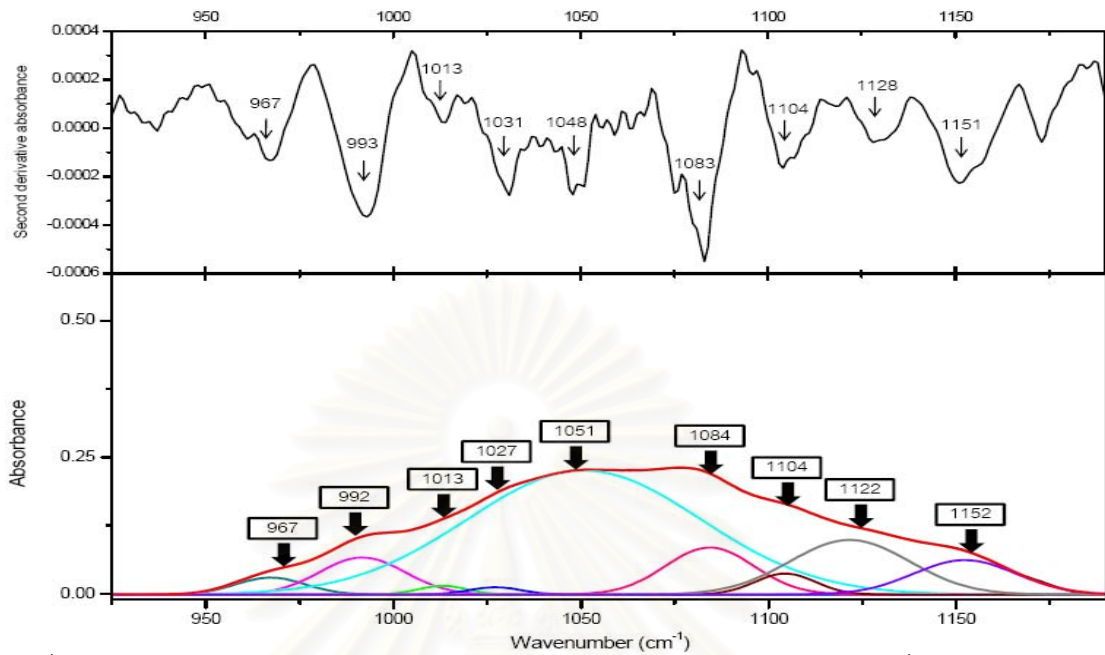
## ผลการวิเคราะห์โดยใช้ Fourier Transform Infrared Spectroscopy



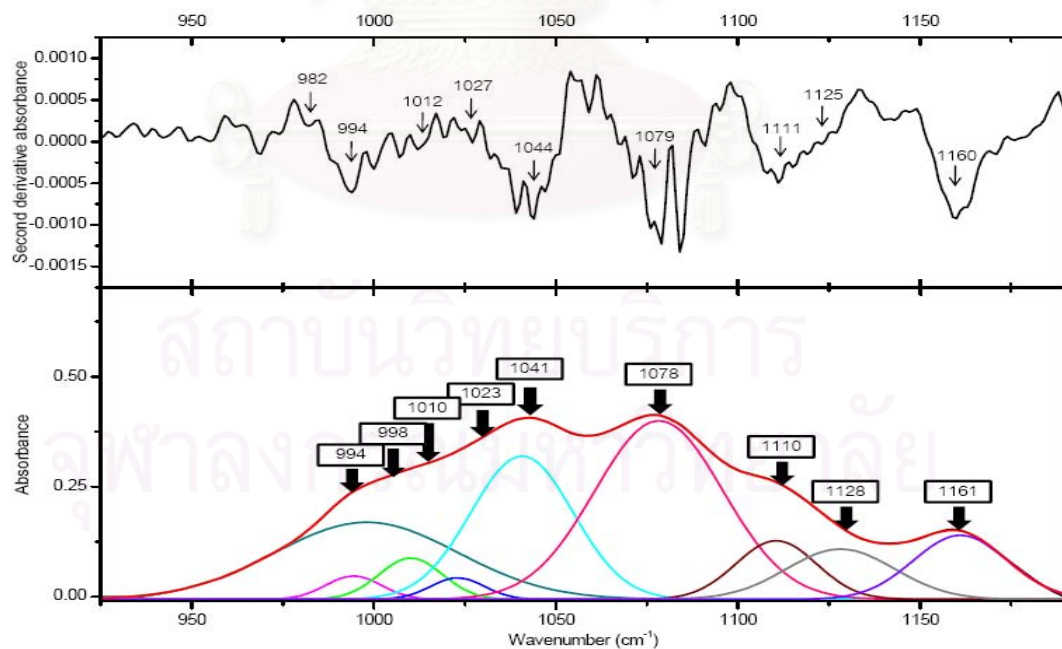
รูปที่ ค1. FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ *S. bayanus* EC1118 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



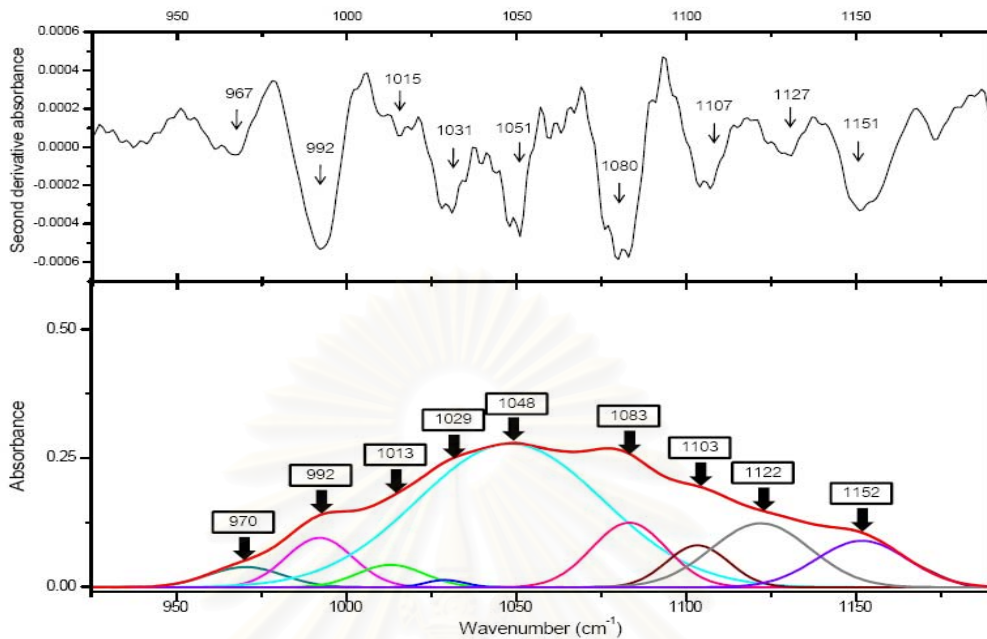
รูปที่ ค2. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดปีตากูแคนจากเซลล์ยีสต์ *S. bayanus* EC1118 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



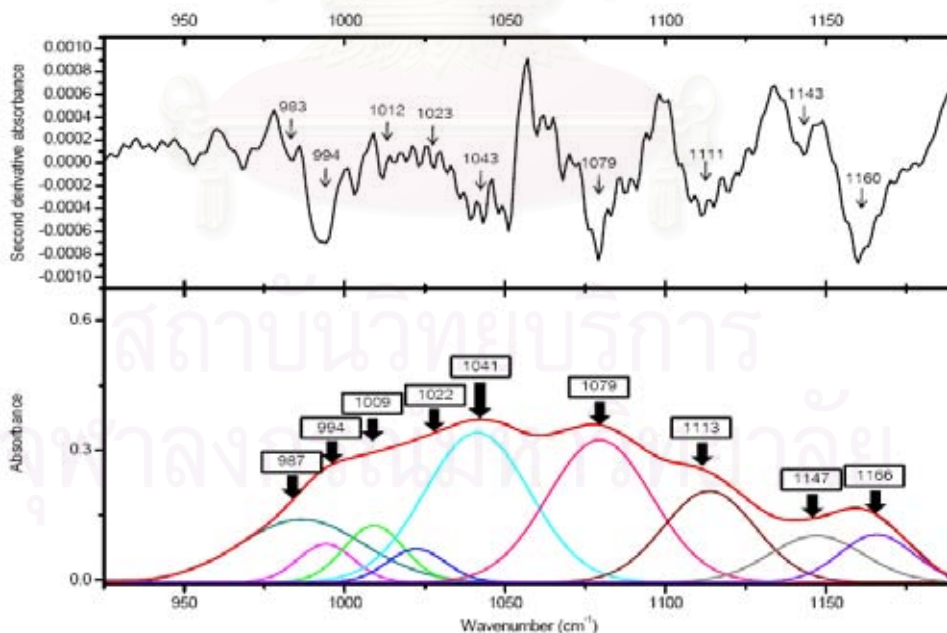
รูปที่ ค3. FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup> ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



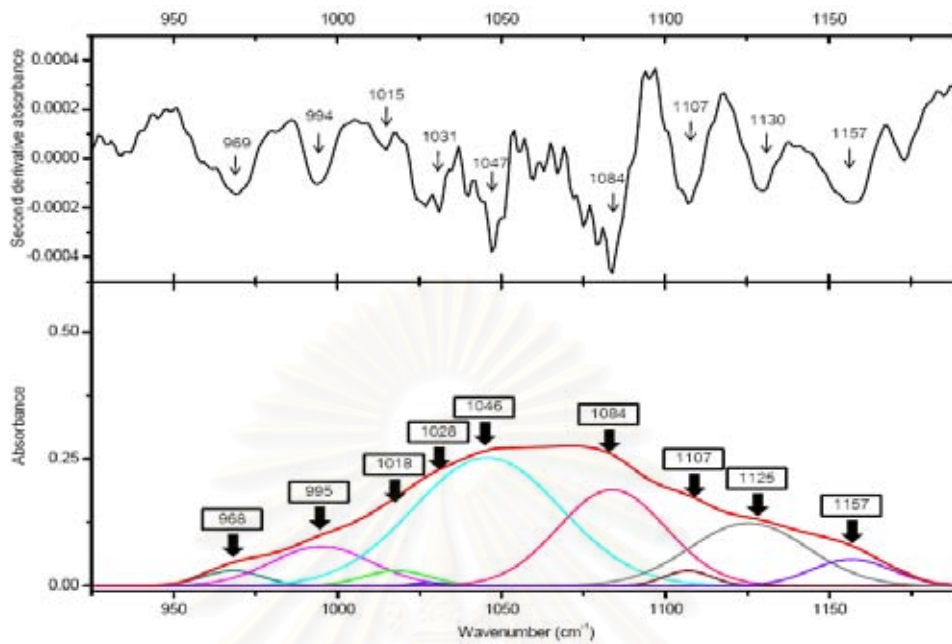
รูปที่ ค4. FTIR สเปกตรัมของสปอร์ยีสต์จากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup> ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



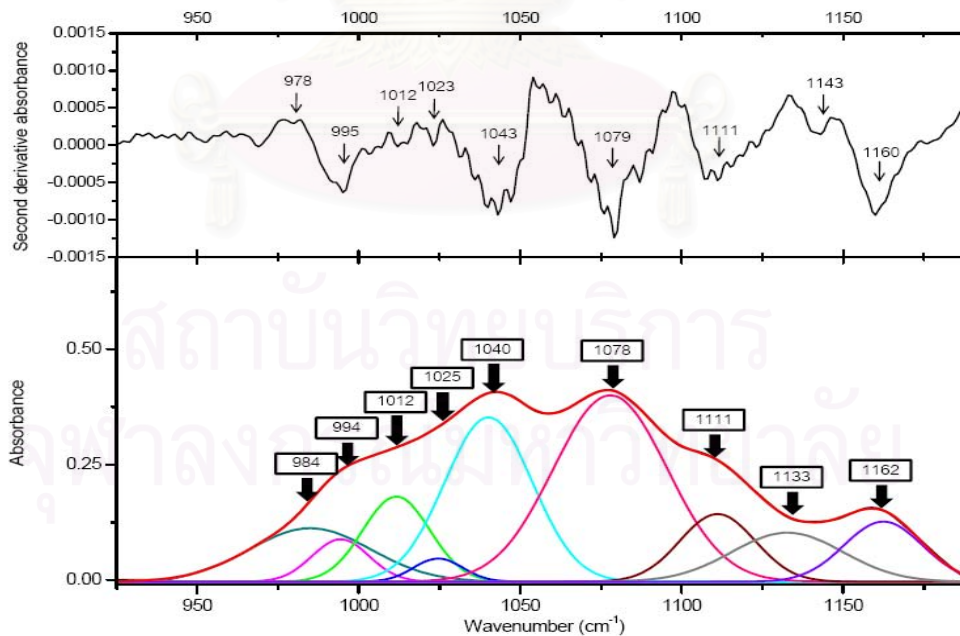
รูปที่ ๕. FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* FT1 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



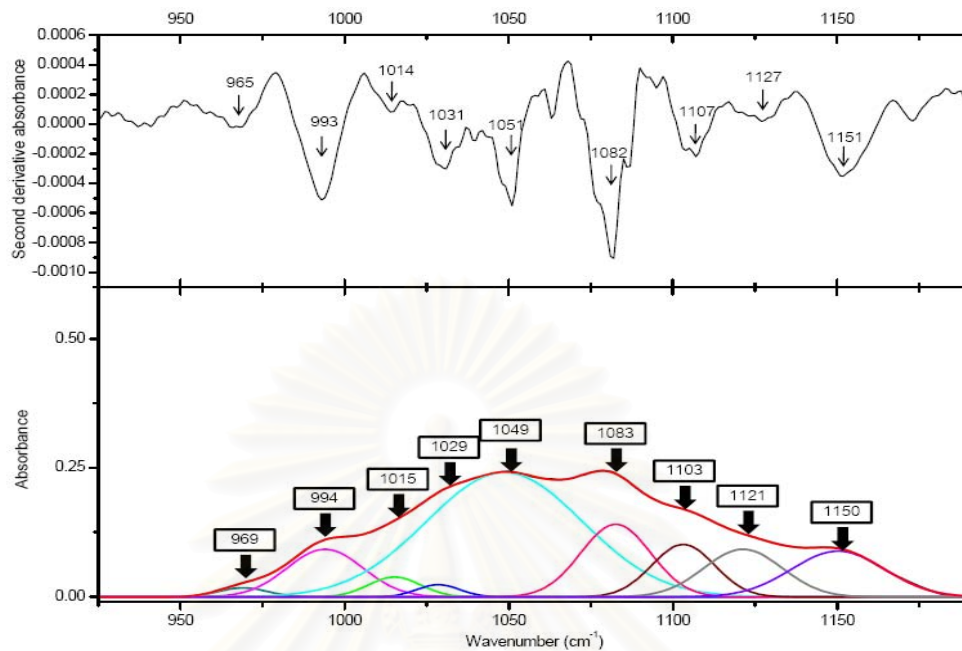
รูปที่ ๖. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดปีตากลูแคนจากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* FT1 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



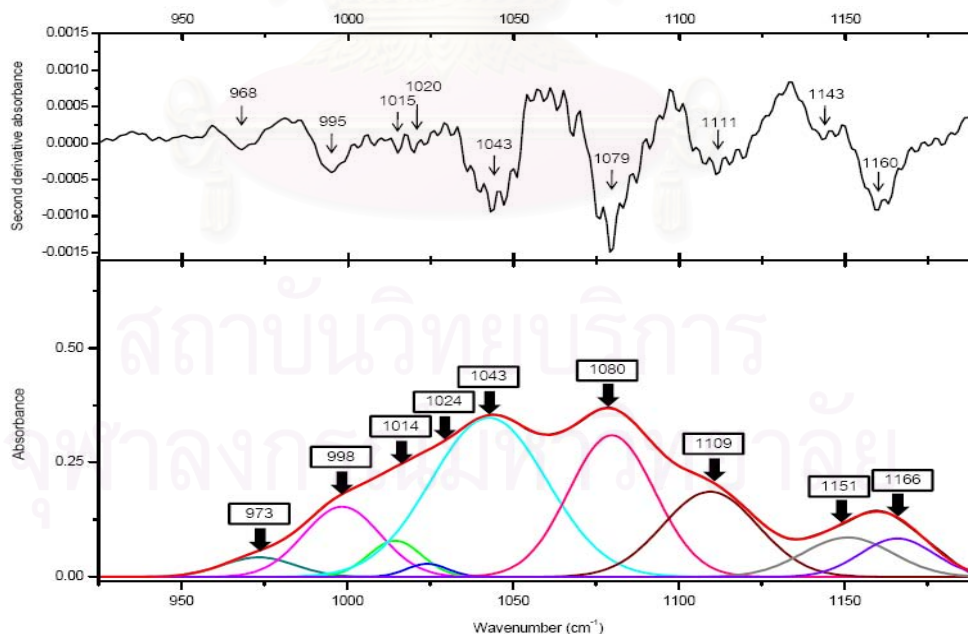
รูปที่ ๗. FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



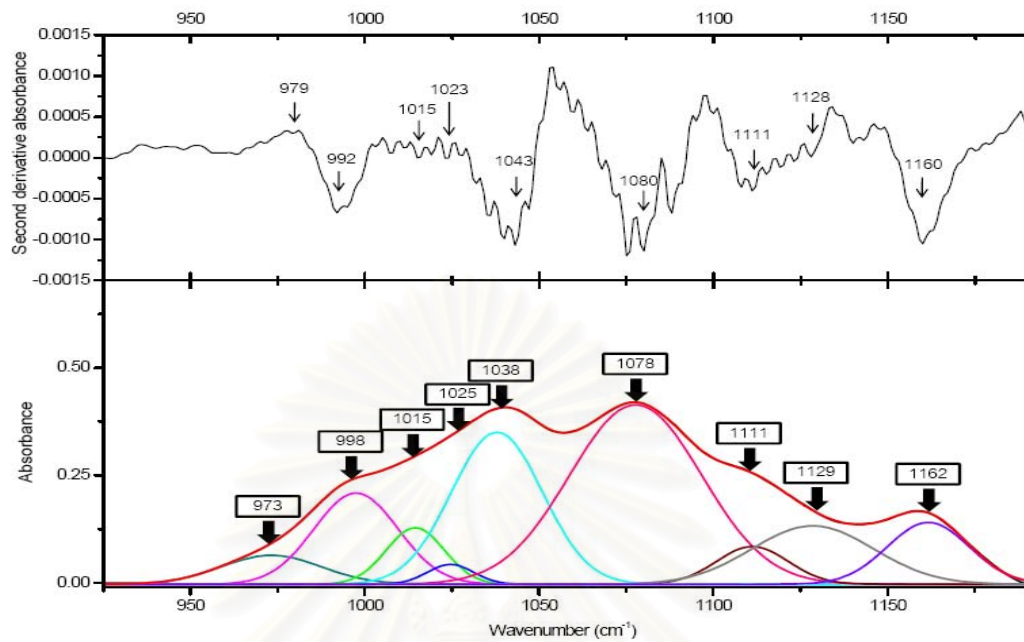
รูปที่ ๘. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดปีตากูแคนจากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



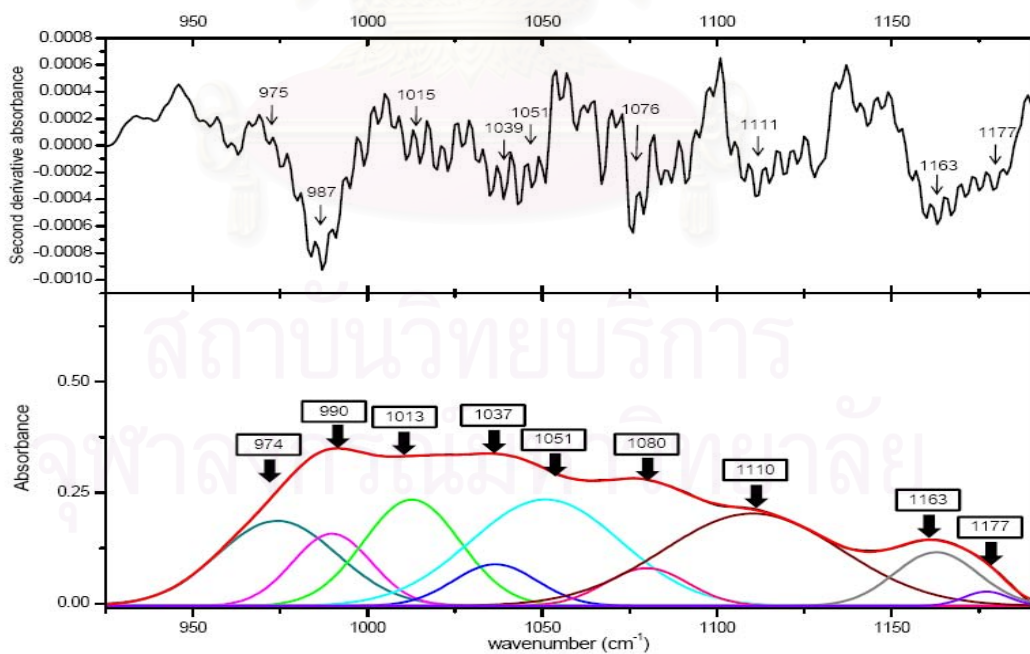
รูปที่ ๙. FTIR สเปกตรัมของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



รูปที่ ๑๐. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดปีตาจากยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5051 ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



รูปที่ ค11. FTIR สเปกตรัมของสารมาตรฐาน Laminarin ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)



รูปที่ ค12. FTIR สเปกตรัมของสารสกัดปีตากุ้งแครงทางการค้า (Innovacan®) ในช่วงเลขคลื่น 925-1190  $\text{cm}^{-1}$  ที่ผ่านการแยกสเปกตรัมย่อยแล้ว (กราฟส่วนล่าง) และ second Derivative plot ของสเปกตรัม (กราฟส่วนบน)

## ภาคผนวก ง

### การวิเคราะห์หาสมบัติเชิงหน้าที่

ภาคผนวก ง.1 การวิเคราะห์หาความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water holding capacity) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Hromádková และคณะ (2003)

#### อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich Zentrifugen รุ่น EBA21, Germany)

#### วิธีวิเคราะห์

1. ผสมสารสกัดปืตากลูแคน 100 mg (0.1 g) เข้ากับน้ำกลั่นปริมาตร 14 mL ในหลอดเซนตริฟิวจ์ (ที่ซึ่งน้ำหนักเรียบเรียบร้อยแล้ว) ตั้งทิ้งไว้ 48 hr ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับคนเข้ากันเป็นระยะๆ
2. ปั่นแยกของผสมที่ได้จากข้อ 1 ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 2000xg เป็นเวลา 25 min
3. ดูดส่วนใสออกอย่างระมัดระวัง แล้วชั่งน้ำหนักหลอดเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุกากสารสกัดปืตากลูแคนที่อุ้มน้ำ
4. คำนวณหาความสามารถในการอุ้มน้ำตามสมการที่ ง.1

$$\text{ความสามารถในการอุ้มน้ำ (g น้ำ/ g ตัวอย่างแห้ง)} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \quad (\text{ง.1})$$

โดยที่  $W_1$  คือน้ำหนักตัวอย่างแห้ง (g)

$W_2$  คือน้ำหนักตัวอย่างที่อุ้มน้ำ (g)

ภาคผนวก ง.2 การวิเคราะห์หาความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (Oil-holding capacity) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Thammakiti และคณะ (2004)

#### อุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich Zentrifugen รุ่น EBA21, Germany)



## สารเคมี

น้ำมันถั่วเหลือง ตราอรุณ (บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย)

## วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งสารสกัดปีตากูแคน 0.1 g ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 mL
2. เติมน้ำมันถั่วเหลือง 1.0 mL ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ แล้วใช้แท่งแก้วคนประมาณ 1 min ให้สารสกัดปีตากูแคนแขวนลอยในน้ำมัน และตั้งทิ้งไว้ 30 min
3. ปั่นแยกของผสมที่ได้จากข้อ 1 ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 1610xg เป็นเวลา 25 min
4. ดูดส่วนใสออกอย่างระมัดระวัง แล้วชั่งน้ำหนักหลอดเซนตริฟิวจ์ที่บรรจุจากสารสกัดปีตากูแคนที่อุ้มน้ำมัน
5. คำนวณหาความสามารถในการอุ้มน้ำมันตามสมการที่ ง.2

$$\text{ความสามารถในการอุ้มน้ำมัน (g น้ำมัน/ g ตัวอย่างแห้ง)} = \frac{W_2 - W_1}{W_1} \quad (\text{ง.2})$$

โดยที่  $W_1$  คือน้ำหนักตัวอย่างแห้ง (g)

$W_2$  คือน้ำหนักตัวอย่างที่อุ้มน้ำมัน (g)

ภาคผนวก ง.3 การวิเคราะห์หาความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (Emulsion Stabilizing capacity) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Thammakiti และคณะ (2004)

## อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Hettich Zentrifugen รุ่น EBA21, Germany)
2. เครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Ystral รุ่น D-79282, Germany)

## สารเคมี

1. น้ำมันถั่วเหลือง ตราอรุณ (บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย)
2. Whey protein isolate (WPI, มีโปรตีน 95%, บริษัท สปอร์ตเทค ประเทศไทย จำกัด, ประเทศไทย)

### วิธีวิเคราะห์

1. ผสมสารสกัดปีตากลูแคน 0.5 g เข้ากับน้ำกลั่นปริมาตร 20 mL ตั้งทิ้งไว้ 24 hr ที่อุณหภูมิห้อง
2. เติมโปรตีนเวย์ 0.5 g และโฮโมจีไนส์โดยใช้หัวโฮโมจีไนส์ขนาด 10 G ด้วยความเร็วในการปั่นสูงสุด (หมายเลข 6) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 s
3. เติมน้ำมันถั่วเหลืองจำนวน 30 mL ลงไปช้าๆ ขณะโฮโมจีไนส์ โดยใช้หัวโฮโมจีไนส์ขนาด 10 MG ด้วยความเร็วในการปั่นสูงสุด (หมายเลข 6) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 s จนเกิดเป็นอิมัลชัน
4. เติมน้ำที่ได้อิมัลชันลงในหลอดเซนตริฟิวซ์ชนิด conical graduated centrifuge tube อ่านปริมาตรของชั้นอิมัลชันจากขีดบอกระดับปริมาตรบนหลอดเซนตริฟิวซ์
5. นำอิมัลชันไปปั่นเหวี่ยงที่ 1300xg นาน 5 min
6. อ่านปริมาตรของชั้นอิมัลชันภายหลังการปั่นเหวี่ยง
7. คำนวณหาค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชันตามสมการที่ ง.3

$$\text{ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (\%)} = \frac{V_2 \times 100}{V_1} \quad (\text{ง.3})$$

โดยที่  $V_1$  คือปริมาตรของอิมัลชันก่อนปั่นเหวี่ยง (mL)

$V_2$  คือปริมาตรของชั้นอิมัลชันหลังปั่นเหวี่ยง (mL)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก จ

### การวิเคราะห์พฤติกรรมการไหล

#### ภาคผนวก จ.1 การวิเคราะห์พฤติกรรมการไหล (Rheological properties) ตามวิธีที่ ดัดแปลงจาก Hromádková และคณะ (2003)

##### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง rheometer (Bohlin Instruments, model C-VOR, UK)
2. เครื่อง ultrasonic cleaner (Fisher Scientific, model ultrasonik, USA)
3. เครื่อง stirrer (Sterogass, model steromag, Italy)
4. ตะแกรง 70 mesh (Retsch, Germany)

##### วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมตัวอย่างสารแขวนลอยบีดากลูแคนโดยผสมผงสารสกัดบีดากลูแคนที่ร่อนผ่านตะแกรง 70 mesh แล้วเข้ากับน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10% ตั้งทิ้งไว้ 2 hr ที่อุณหภูมิห้อง นำไป sonicate เป็นเวลา 1 hr เพื่อลดขนาดอนุภาค แล้วจึงทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 hr
2. นำตัวอย่างประมาณ 3 mL ที่เตรียมได้มาวิเคราะห์พฤติกรรมการไหลด้วยเครื่อง rheometer ที่อุณหภูมิ 25 °C โดยใช้หัววัดแบบ parallel plate ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 40 mm ช่องว่างระหว่างหัววัดกับจานใส่ตัวอย่างสำหรับวัดเท่ากับ 2000  $\mu\text{m}$  แปรอัตราเฉือน (shear rate) ระหว่าง 2-138  $\text{s}^{-1}$  ใช้เวลาในการวัดทั้งหมด (shearing time) 16 min สำหรับแต่ละรอบของการเพิ่มและลดอัตราเฉือน (shear cycle)
3. นำข้อมูลทั้งหมดที่ได้มาผ่านกระบวนการทางคณิตศาสตร์ เพื่อลดความแปรปรวนของค่าความเค้นเฉือน (shear stress) โดยวิธี Adjacent averaging<sup>1</sup> ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป นำข้อมูลความเค้นเฉือนที่ปรับค่าแล้วในช่วงการลดอัตราเฉือนจาก 138 เป็น 2  $\text{s}^{-1}$  มา

<sup>1</sup> Adjacent averaging – เป็นวิธีที่ลดความแปรปรวนของข้อมูลโดยหาค่าเฉลี่ยในแต่ละจุดของชุดข้อมูลโดยใช้ข้อมูลโดยรอบจุดๆ นั้น และนำค่าเฉลี่ยของแต่ละจุดที่หาได้มาแทนค่าข้อมูลเดิม

วิเคราะห์พฤติกรรมการไหลด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ Herschel-Bulkley model ตามสมการที่ จ.1

Herschel-Bulkley model:  $\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$  (จ.1)

โดยที่  $\tau_0$  คือ yield stress (Pa)

$\tau$  คือความเค้นเฉือน (shear stress) (Pa)

$\dot{\gamma}$  คืออัตราเฉือน (shear rate) ( $s^{-1}$ )

n คือ flow behavior index

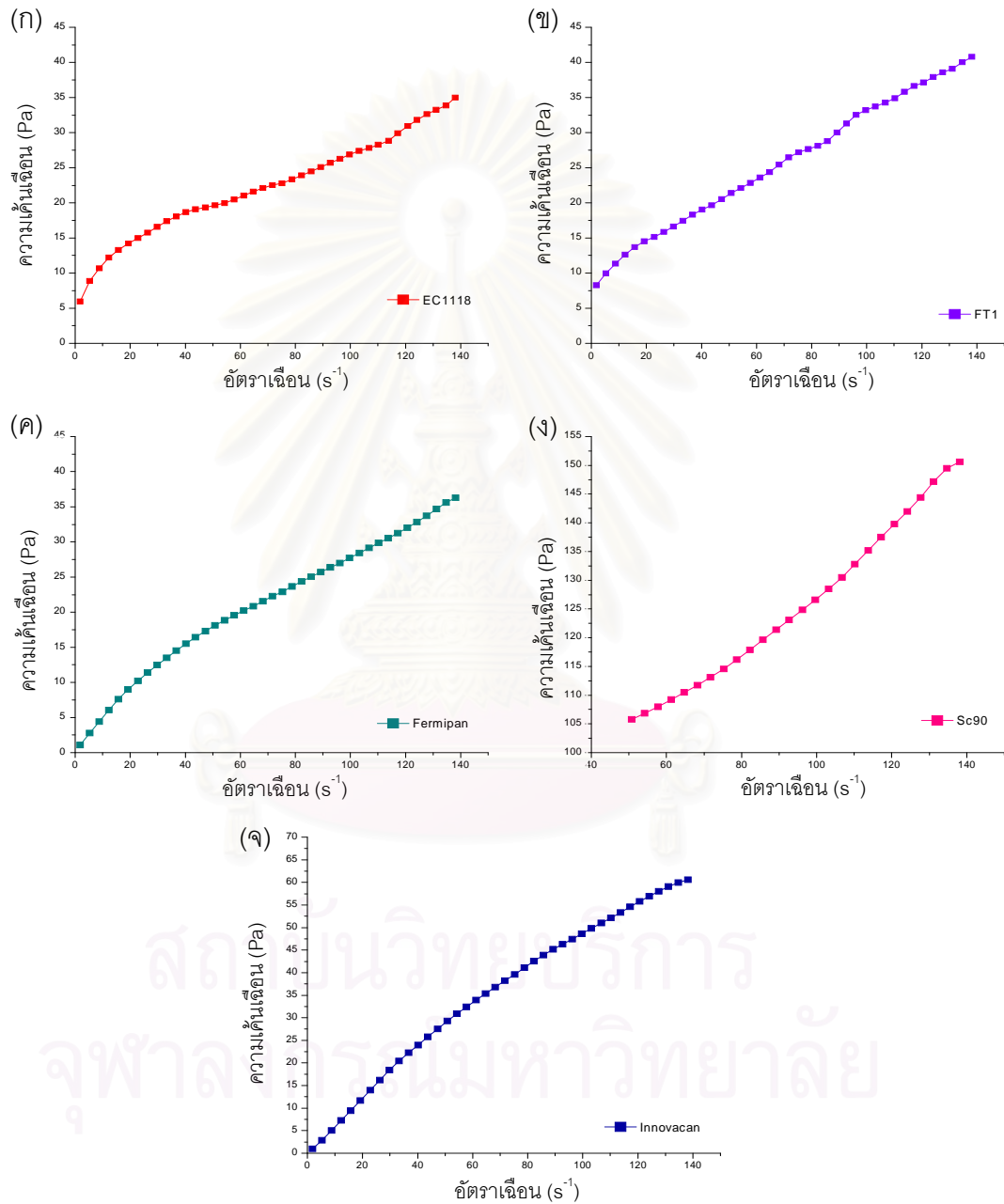
K คือ consistency index ( $Pa \cdot s^n$ )



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก จ

## ผลการวิเคราะห์พฤติกรรมการไหล



รูปที่ จ1. ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเฉือนและความเค้นเฉือนของสารแขวนลอยปีตากูแคน ความเข้มข้น 10% จากยีสต์ (ก) *S. bayanus* EC1118; (ข) *S. cerevisiae* FT1; (ค) *S. cerevisiae* Fermipan<sup>®</sup>; (ง) *S. cerevisiae* Sc90; (จ) สารสกัดทางการค้า (Innovacan<sup>®</sup>)

**ภาคผนวก ข**  
**การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

ตารางที่ ข.1 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของความชื้น โปรตีน ไขมัน และไขมันของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์

แหล่งความแปรปรวน	df	MS			
		ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	ไขมัน
สายพันธุ์ของยีสต์	4	13.619*	51.500*	1.268*	0.330*
Error	5	0.017	0.256	0.002	0.000

หมายเหตุ: \* หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ข.2 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของคาร์โบไฮเดรตและบีตาไกลูแคนของเซลล์ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์

แหล่งความแปรปรวน	df	MS	
		คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	บีตาไกลูแคน
สายพันธุ์ของยีสต์	4	91.299*	40.021*
Error	10	0.492	0.304

หมายเหตุ: \* หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ข.3 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของโปรตีน ไขมัน และไขมันของสารสกัดบีตาไกลูแคน จากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า

แหล่งความแปรปรวน	df	MS		
		โปรตีน	ไขมัน	ไขมัน
สายพันธุ์ของยีสต์	5	12.055*	0.598*	2.611*
Error	6	0.001	0.000	0.003

หมายเหตุ: \* หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ข.4 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของคาร์โบไฮเดรตและปีตากลูแคนของสารสกัด  
ปีตากลูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า

แหล่งความแปรปรวน	df	MS	
		คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	ปีตากลูแคน
สายพันธุ์ของยีสต์	5	655.240*	116.423*
Error	12	0.686	1.565

หมายเหตุ: \* หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ข.5 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของความสามารถในการขู่มน้ำ และขู่มน้ำมันที่ได้  
จากสารสกัดปีตากลูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์และสารสกัดทางการค้า

แหล่งความแปรปรวน	df	MS	
		ความสามารถใน การขู่มน้ำ	ความสามารถใน การขู่มน้ำมัน
สายพันธุ์ของยีสต์	5	9.998*	5.305*
Error	12	0.071	0.016

หมายเหตุ: \* หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน  
ของเวย์โปรตีน สารสกัดปีตากลูแคนจากยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ และสารสกัดทางการค้า

แหล่งความแปรปรวน	df	MS
		ความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของอิมัลชัน
สายพันธุ์ของยีสต์	6	26.920*
Error	7	0.233

หมายเหตุ: \* หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ )

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววีรญา จันทร์ไพแสง เกิดวันที่ 24 ตุลาคม 2525 ที่จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2548



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย