รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คงพัฒน์ พงศ์ไพบูลย์ และไพเราะ ทิพย์ทัศน์. 2523. ลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อของกากน้ำตาล. รายงานผลการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 5: 256 - 267.

คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. เอทานอลและไบโอดีเซล:พลังงานทดแทน. 5-20.

จตุพร เหมสุวรรณ์. 2531. การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารจากกะปิ ถั่วเหลืองและยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิราภรณ์ พันธุ์ชัย. 2540. การอบแห้งยีสต์ขนมปังเพื่อผลิตยีสต์ผง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชื่นจิตต์ พฤฒิภากร. 2528. การผลิตสารสกัดจากยีสต์ที่ได้จากโรงงานเบียร์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ซอราฮูดีน มามะ มลฤทัย บรรทม และภูวนารถ แสนยินดี. 2546. การผลิตเบต้ากลูแคนด้วยวิธีการสกัดด้วยเบสและกรดร่วมกับการใช้เทคนิค French Press. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ธวิช อินทรพันธุ์. 2548. จุลชีววิทยาทางอาหารเบื้องต้น. ภาควิชาอาหารและโภชนาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ. 11-13.

ธัญญารัตน์ ตรีวงศ์ และหทัยรัตน์ พระเดชกิ่ง. 2547. การสกัดเบต้ากลูแคนด้วยน้ำร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ธีรนุช โสตภิโภคา. 2539. น้ำเสียสู่ธรรมชาติ การผลิตเอทิลแอลกอฮอล์เพื่อสนองความต้องการผู้บริโภค. ใน เอกสารการประชุมวิชาการของสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. หน้า 12-19.

ธีรวุฒิ ฤทธิ์เดชา. 2544. การเลียนแบบกลิ่นรสเนื้อโดยใช้ยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสวิรัติ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2523. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลและอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรัชญา ธัญญาวดี. 2521. ปุ๋ยหมักและการใช้ประโยชน์เพื่อปรับปรุงบำรุงดิน. ชุมทางเกษตร. 30: 527-543.

วรรณกร เลื่องชัยเชวง. 2546. การเร่งให้เกิดการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ขนมปัง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิวัฒน์ หวังเจริญ. 2535. การผลิตยีสต์ออโตไลเสทเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไวพจน์ บุญเจริญ สิทธิโชค ธงเงิน และไพบูลย์ ป้องความดี. 2002. วิธีการผลิตกลูแคนจาก brewer's yeast โดยให้มีไกลโคเจนปนเปื้อนในปริมาณต่ำ และมีความสามารถเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon)*. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สกุณณี กุณฑียะ. 2525. การเลี้ยงจุลินทรีย์ในน้ำกากส่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2541. โครงการการผลิต CM-GLUCAN จากของเหลือทิ้งโรงงานสุราระดับห้องปฏิบัติการ. 7-21

สุจินต์ พนาปวุฒิกุล. 2537. การใช้น้ำกากส่าจากโรงงานสุราในการผลิตไบโอแก๊สและทำปุ๋ยอินทรีย์. จุลสารสภาวะแวดล้อม 3(2): 1-4.

สุพจน์ บุญแรง ประศาสตร์ ฟูตระกูล วีระสิทธิ์ กัลยากฤต และจรัญ เจตนะจิตร. 2541. การปรับสภาพที่เหมาะสมด้วยวิธีทางเคมีชีวภาพและกายภาพสำหรับการย่อยสลายยีสต์ขนมปังเพื่อผลิตยีสต์สกัด. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ 32: 441-451.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. 2532. เอกสารประกอบการสอนวิชา Preservation of microbial. สาขาวิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. 2549. ยีสต์คุณประโยชน์ในอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: งานส่งเสริมภาพลักษณ์องค์กร.

สำนักงานควบคุมการผลิตสุรา ฝ่ายเทคนิคและการผลิต กลุ่มบริษัทสุราทิพย์. 2540. การหมักส่า การวิเคราะห์และเทคนิคทางด้านจุลินทรีย์. กรุงเทพมหานคร: กรมสรรพสามิต.

อรพิน ภูมิภมร. 2526. จุลินทรีย์ในเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอาหารหมักพื้นเมือง. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Ames. J. M. and Mac Leoad, G. 1985. Volatile components of a yeast extract composition. Journal of Food Science 50: 125-131.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Vol. 2. Washington,D.C.: Association of Official Analytical Chemists.

Asenjo, J.A. and Andrews, B.A. 1990. Enzymatic cell lysis for product release, In Asenjo, J.A. (ed.), Separation Process in Biotechnology. New York: Marcell Dekker Inc.

Burkus, Z. And Temelli, F. 2000. Stabilization of emulsions and foams using barley betaglucan. Food Research International 33: 27-33.

Cameron, D.R., Cooper, D.G., and Neufeld, R.J. 1988. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Applied and Environmental Microbiology 54(6): 1420-1425.

Campbell, B. and Duffus, J.H. 1988. Yeast: A Practical Approach. 3rd ed., Department of Brewing and Biological Science,Heriot-Watt University,Edinburgh EH1 1HX., UK.

Cardini, G. and Zotti, A. 1976. Using thermal shock followed by autolysis. US Patent 3,934,039.

Chang, S.K.C. 1994. Protein Analysis. In Nielsen, S.S, (ed.), Introduction to The Chemical Analysis of Food, pp. 207-219. London: Johns and Barlett.

Chao, K.C., Mc Carthy E.W.F., and McConaphy G.A. 1980. Yeast autolysis process. US Patent 19,4,218,481.

Cochran, W.G. and Cox, G.M. 1957. Experimental Designs. New York: John Willey & Sons.

Dallies, N., Francois, J., and Paquet, V. 1998. A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 14: 1297–1306.

Daniel, R.A. 1973. Yeast. 4th ed. London: Maclaren & Sons, Ltd.

Di Luzio, N.R. and Williams, D.L. 1978. Protective effect of glucan against systemic *Staphylococcus aureus* septicemia in normal leukemic mice. Infection and Imunity 804-810.

Di Luzio, N.R., Williams, D.L., and McNamee, R.B. 1979. Comparative tumor-inhabitory and antibacterial activity of soluble and particulate glucan. Cancer 24: 773-779.

Donzis, B.A. 1993. Method for revitalizing skin by applying topically water insoluble glucan. US Patent 5,223,491.

Donzis, B.A. 1997. Substantially purified beta (1,3) finely ground yeast cell wall glucan composition with dermatological and nutritional uses. US Patent 5,702,719.

Dziezak, J.D. 1987. Yeast and yeast derivatives: Applications. Food Technology 41(2): 122-124.

Francisco, V.A, Flor, J.V.,and Gloria, M. 1997. Purification and comparison of β-1,3-glucan binding protein from White Shrimp (*Penaeus monodon*). Biochemistry and Molecular Biology 116: 453-458.

Freimund, S., Sauter, M., Kappli, O., and Dutler, H. 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3-beta-D-glucan of hign purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Carbohydrate Polymer 54: 159-171.

Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180: 147-165.

Gomez, C., Navarro, A., Manzanres, P., Horta, A., and Carbonell, J.V. 1997. Physical and structural properties of barley 1-3/1-4-β-D–glucan. Part II. Viscosity chain stiffness and macromolecular dimensions. Carbohydrate Polymer 32:17-22.

Hill, F.F. 1981. Process for the production of a yeast autolysis. US Patent 4,264,628.

Hough, J.S. and Maddox, I.S. 1970. Yeast autolysis. Process Biochemistry 210: 50-52.

Hsu, K.H., Hoseney, R.C., and Seib, P.A. 1979. Frozen dough. I. Factors affecting stability of yeasts doughs. Cereal Chemistry 56: 419.

Hunter, J.B. and Asenjo, J.A. 1988. A structured mechanistic model of the kinetic lysis and disruption of yeast cells. Biotechnology and Bioengineering 31: 929-943.

Hunter, K.W., Gault, Jr, R.A., and Berner, M.D. 2002. Preparation of micropaticulate beta-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for uses in immune potentiation. Applied Microbiology 35: 267-271.

Hussein, H.S. and Brasel, J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology 167: 101-134.

Jamas, S., Easson, D.D., and Ostroff, G.R. 1996. Use of aqueous soluble glucan preparations to stimulate platelet production. US Patent 5,532,223.

Jamas, S., Rha, C., and Sinskey, A. J. 1991. Glucan compositions and process for preparation there of. US Patent 5,028,703.

Jazwinski, S.M. 1990. Preparation of extraction from yeast, In Deutscher , A.H.(ed.), Method in Enzymology, pp. 154-174. London: Academic Press.

Jigami, Y. and Odani, T. 1999. Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. Biochimica et Biophysica Acta 1426: 335-345.

Kapteyn, J.C., Van Den Ende H., and Klis, F.M. 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1426: 373-383.

Kelly, M. 1983. Yeast extract, In Godfrey, T. and Reichelt, J. (eds.), The Application of Enzyme in Industry, pp. 457-465. London: Academic Press.

Keppler, D. and Decker, K. 1984. Method of enzymatic analysis, In Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. and GrasBl, M. (eds.), Metabolites1 6: 11-18.

Khor, E. and Lim, L.Y. 2003. Implantable applications of chitin and chitosan. Biomaterials 24: 2339-2349.

Kleining, A.R. and Middelberg, P.J. 1997. On the mechanism of microbial cell disruption in high-pressure homogenization. Chemical Enginerring Science 53: 891-898.

Klis, F.M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews 26: 239-256.

Knorr, D., Shetty, K.J., Hood, L.F., and Kinsella. J.E. 1979. An enzymatic method for yeast autolysis. Journal of Food Science 44: 1362-1365.

Kochert, A.G. 1978. Carbohydrate determination by the phenol-sulphuric acid method, In Hellebust, J.A. and Craigie, J.S. (eds.), Handbook of Phycological Methods-Phycological and Biochemical Methods, pp. 95-97. Cambridge: Cambridge University Press.

Kollar, R., Petrakora, E., Ashwell, G.,and Robbin, P.W. 1995. Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and β-1,3-glucan. Biological Chemistry 270: 1170-1178.

Kollar, R., Sturdik, E.,and Sajbidor, J. 1992. Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. Food Biotechnology 6(3): 225-237.

Lin, M.J.Y. and Humbert, E.S. 1974. Certain functional properties sunflower meal products. Journal of Food Science 39: 368-370.

Liu, X.Y., Wang, Q., Cui, S.W., and Liu, H.Z. 2006. A new isolation method of β-D-glucan from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Food Hydrocolliods [online]. Available from: www. sciencedirect.com [2006, March 27]

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randali, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biology Chemistry 193: 265-275.

Magnelli, P., Cipollo, J.F., and Abijon, C. 2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and beta-1,6-glucan fine structure. Analytical Biochemistry 301: 136-150.

Maltz, M.A. 1981. Protein Food Supplements Recents Advances. New Jersey: Noyes Data Corporation.

Manners, D.J. and Massos, A.J. 1973. The structure of a β-1,3-D-glucan from yeast cell wall. Biochemistry 135: 19-30.

Muller, A., Raptis, J., Rice, P.J., Kalbfleisch, J.H., Stout, R.D., Ensley, H.E., Browder, W.,and Williams, D.L. 2000. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1 ⟶ 3)-β-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. Glycobiology 10: 339–346.

Nagodawithana, T.W. 1994a. Flavor enhancers : Their probable mode of action. Food Technology 4: 79-85.

Nagodawithana, T.W. 1994b. Savory flavor. In Gabelman, A. (ed.), Bioprocess Production of Flavor Fragrance and Color Ingredients, pp. 135-168. New York: John Wiley & Sons Inc.

Nagodawithana, T.W. 1995. Yeast extracts. In Savory Flavor, pp. 239-251. USA: Esteekay Associates, Inc.

Niumthanorm, A. 1997. Production of yeast extracts from spent brewer's yeast. Master's Thesis, Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University.

Ohno, N., Furukawa, M., Miura, N.N., Adachi, Y., Motoi, M., and Yadomae, T. 2001. Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of Agaricus blazei. Biological & Pharmaceutical Bulletin 24: 820–828.

Orlean, P. 1999. Biogenesis of yeast wall and surface component. In : the molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In Nakai,K. and Horton, P. (eds.), Cell Cycle and Biology, pp. 229-362. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Otero, A.M., Del Vasallo, C.M., Vedecia, O., Fernandez, V., and Betacourt, D. 1996. A Processing for complete fractionation of baker's yeast. Chemical Technology & Biotechnology 67: 67-71.

Peppler, H.J. 1970. Production of yeasts and yeast product. In Peppler, A.J. and Perlman, D.(eds.), Microbial Technology. (Microbial process), pp.157-185. New York: Academic Press.

Pyke, M. 1985. Brewer's yeast. In Cook, A. (ed.), The Chemistry and Biology of Yeast, pp. 535-586. New York: Academic Press.

Reed, G. and Peppler, J.H. 1973. Yeast derived products. In Reed, G. and Peppler J. H. (ed.), Yeast Technology, pp. 335-367. New York: Academic Press.

Reed, G. and Nagodawithana, T.W. 1991. Yeast Technology. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasaveta, P. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus S11*). Aquaculture 191: 271-288.

Roach, D. and Gehrke, C.W. 1970. The hydrolysis of protein. Food Technology 52: 393-404.

Ross, G.D., Vetvicka, V., Yan, J., Xia, Y., and Vetvickova, J. 1999. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. Immunopharmacology 42: 61-74.

Sandula, J., Kogan, G., Kacurakova, M., and Machova, E. 1999. Microbial beta-1,3-D-glucan their preparation, physio-chemical characterization and immunomodulatory activtity. Carbohydrate Polymer 38: 247-253.

Santos, M., Jimenez, J.J., Bartolome, C., Gomez-Corloves, M.J., and Nozal, D. 2003. Variability of brewer's spent grain within a brewery. Food Chemistry 80: 17-21.

Schulze, U., Larsen, M.E., and Villadsen, J. 1995. Determination of intracellular trehalose and glycogen in *Saccharomyces cerevisiae*. Analytical Biochemistry 228: 143 -149.

Smiles, A., Kakuda, Y., and Mac Donald, B.E. 1989. Effect of degumming reagents on the composition and emulsifysing properties of canola, soybean and sunflower acetone insolubles. Chemistry 66: 348-352.

Sosulski, F.W. 1962. The centrifuge method for determining flour absorption is hard red spring wheats. Cereal Chemistry 39: 344-35

Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. 1995. Aeration and agitation. In: Principles of Fermentation Technology. 2nd (ed.), pp. 243-275. Oxford: Butterworth-Heinemann.

Suphanthalika, M., Khunrae, P., Thannardkit, P. and Verduyn, C. 2002. Preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. Microbiology & Biotechnology 18: 527-539.

Synowiecki, J. and Nadia Ali, A.K. 2003. Production, properties and some new applications of chitin and its derivatives. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 43: 145-171.

Temeli, F.1997. Extraction and functional properties of barley β-glucan as affected by temperature and pH. Journal of Food Science 62: 1194–1197,1201.

Temeli, F. and Burkus, Z. 2000. Stabilization of emulsions and foams using barley β-glucan. Food Research International 33: 27–33.

Thammakiti, S., Suphantharika, M., Phaesuwan, T., and Verduyn, C. 2002. Preparation of spent brewer's yeast β-glucan for potential applications in the food industry. Food Science and Technology 39: 21-29.

Thitipraphunkul, K., Uttapap, D., Piyachomkwan, K., and Takeda, Y. 2003. A comparative study of edible canna (*Canna edulis*) starch from different cultivars. Part II. Molecular structure of amylose and amylopectin. Carbohydrate Polymer 54: 489-498.

Wang, Y., Yao, S., and Wu, T. 2003. Combination of induced autolysis and sodium hypochlorite oxidation for the production of *Saccharomyces cerevisiae* (1⟶ 3)-β-D-glucan. Microbiology & Biotechnology 19: 947–952.

Williams, D.L., and Lunzig, R. Di. 1980. Glucan-induced modification of marine viral hepatitis. Science 208(4): 67-69.

Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., and Jamnong, P. 2005. β-glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. Food Hydrocolloids 1-11.

Zulli, F. and Suter, F. 1998. Improving skin function with CM-glucan, a biological response modifier from yeast. Cosmetic Science 20: 79-86.

Zulli, F., Suter, F., Biltz, H., Nissen, H.P. and Birman, M. 1996. Carboxymethyllated Beta-(1-3)-glucan. Cosmetic & Toiletries 111: 91-92, 95-98.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์

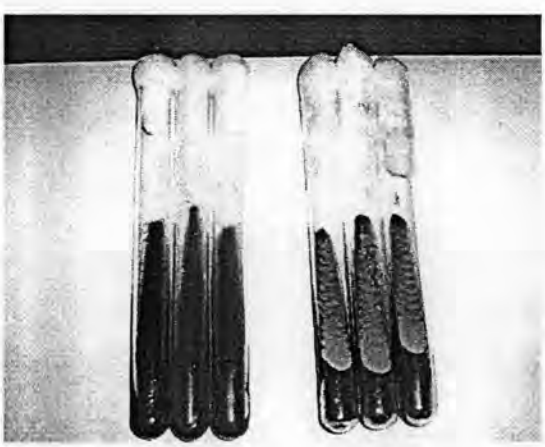
ก.1 การหมักแอลกอฮอล์โดยใช้กากน้ำตาล (Molasses) เป็นวัตถุดิบ

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (starter) หรือ yeast propagation

เขี่ยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* (SC90) ที่อยู่ในหลอดทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นเอียงผสมกากน้ำตาล (slant culture) มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นเอียงผสมกากน้ำตาล บ่มเชื้อยีสต์ในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25-30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเขี่ยโคโลนีของยีสต์ลงในอาหารแบบเหลวผสมกากน้ำตาลที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเขย่าขวดวันละ 1-2 ครั้ง และถ่ายเชื้อยีสต์ลงในอาหารแบบเหลวผสมกากน้ำตาลที่อยู่ในขวดทรงกลมก้นแบน (Ballon flask flat bottom) ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยจุกสำลี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเขย่าขวดวันละ 1-2 ครั้งเช่นกัน เมื่อกล้าเชื้อมีจำนวนมากกว่า 100 ล้านเซลล์ต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตร จะใช้เป็นกล้าเชื้อตั้งต้นสำหรับการหมักแอลกอฮอล์ จากนั้นจึงทำการถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักแอลกอฮอล์ขนาด 100 ลิตร และบ่มทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง

1.1.1 อาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (SC90)

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นเอียงผสมกากน้ำตาล (Agar slant)</u> หลอดบรรจุวุ้นอาหาร ซึ่งวางเอียงไว้เมื่อวุ้นแข็งตัวแล้วผิวหน้าของอาหารแข็งจะเอียงลาดทำมุมกับหลอด



(a) (b)

รูปที่ ก1 อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์แบบวุ้นเอียงผสมกากน้ำตาล

(a) อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เปล่า (b) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ SC. 90

ตารางที่ ก1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์แบบวุ้นเอียงผสมกากน้ำตาล

ส่วนประกอบ	%(w/w)
กากน้ำตาล (reducing sugar ประมาณ 50-55 %)	14
น้ำตาลปี๊บ	10
Agar powder	1-3
Peptone	0.1
$(NH_4)_2SO_4$	0.1
$MgSO_4.7H_2O$	0.007
KH_2PO_4	0.02

ตารางที่ ก2 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์แบบเหลวผสมกากน้ำตาล

ส่วนประกอบ	%(w/w)
กากน้ำตาล (reducing sugar ประมาณ 50-55 %)	14
น้ำตาลปี๊บ	10
$(NH_4)_2SO_4$	0.1
$MgSO_4.7H_2O$	0.007
KH_2PO_4	0.02

1.1.2 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและการหมักสา yeast fermentation

1.1.2.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด (ดังตารางที่ ก2) เทลงในบีกเกอร์ขนาด 1,500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนจนละลายหมดแล้วเทลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 flasks ปิดด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave sterilization

1.1.2.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อใน Ballon flask flat bottom ขนาด 2,000 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด (ดังตารางที่ ก2) เทลงในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1,500 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนจนละลายหมดแล้วเทลงใน Ballon flask flat bottom ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร จำนวน 3 flasks ปิดด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธี autoclave sterilization

1.1.2.3 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดถังหมัก 100 ลิตร

ถังหมักขนาด 100 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อโดยการอบถังด้วยไอน้ำร้อนประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมกากน้ำตาลเจือจางกับน้ำให้มีความหวานภายหลังผสมเสร็จประมาณ 15 % (Total invert sugar) เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 % เมื่ออุณหภูมิในถังลดลงประมาณ 30 °C ทำการถ่ายเชื้อจาก Ballon flask flat bottom จำนวน 3 flasks ลงในถังขนาด 100 ลิตรหมักทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 35 °C ในช่วง 10 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 30-35 °C โดยเปิดน้ำหล่อเย็นรอบถังหมัก เมื่อยีสต์มีจำนวนในระดับ 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร แอลกอฮอล์สูงถึง 4 % และมี pH สูงกว่า 4.0 การหมักแอลกอฮอล์ก็จะสมบูรณ์ไม่เกิดปัญหา หลังจากน้ำหมักแอลกอฮอล์มีอายุครบ 48 ชั่วโมงจะทำการแยกเซลล์ยีสต์มาใช้ในงานวิจัย

เขี่ยเชื้อยีสต์ (SC 90) จากหลอดอาหารแข็งวุ้นเอียงผสมกากน้ำตาลมาเลี้ยงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกากน้ำตาล (Agar slant) บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ถ่ายเชื้อจากหลอด (Agar slant) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวผสมกากน้ำตาล ใน Erlenmeryer flask บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ถ่ายเชื้อจาก Erlenmeryer flask ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวผสมกากน้ำตาล ใน Ballon flask flat bottom บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ถ่ายเชื้อจาก Ballon flask flat bottom ลงในถังหมักขนาด 100 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

รูปที่ ก2 สรุปขั้นตอนการหมักแอลกอฮอล์เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ตามวิธีของ A.O.A.C (1995)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้อบลมร้อน(Hot air oven, รุ่น 600 บริษัท Memmert จำกัด, U.S.A)
2. ถ้วยอะลูมิเนียม
3. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (รุ่น AB204 บริษัท Mettler Toledo (Thailand) Ltd.,)
4. desiccator

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 2–3 กรัมลงในถ้วยอะลูมิเนียม (อบในตู้ลมร้อนอุณหภูมิ 100 – 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นใน desicator และชั่งน้ำหนักถ้วยเปล่าไว้)
2. นำตัวอย่างที่ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมไปอบในตู้อบลมร้อน อุณหภูมิ 100 –105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ และทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator
3. จากนั้นชั่งน้ำหนักถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมตัวอย่าง แล้วลบด้วยน้ำหนักถ้วยเปล่า จะได้น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ
4. คำนวณปริมาณความชื้นโดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{[\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ(กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)}]}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)}} \times 100$$

ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดตามวิธีของ A.O.A.C. (1995)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ชุดวิเคราะห์โปรตีน (ประกอบด้วย digeston unit รุ่น K-424, distillaton unit รุ่น B-324, บริษัท BUCHI, Switzerland)
2. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AB204 จากบริษัท Mettler Toledo (Thailand)Ltd.,)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (A.R. grade)
2. สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก (A.R. grade) ความเข้มข้น 0.1 N
3. สารละลายบอริก (A.R. grade) ความเข้มข้น 4%

4. selenium reagent mixture (A.R. grade)

5. สารละลาย 50 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ (A.R. grade)

6. สารละลายอินดิเคเตอร์ เตรียมโดยผสมสารละลาย methyl blue 0.2% ในแอลกอฮอล์ แล้วกรอง 25 มิลลิลิตร กับสารละลาย methyl red 0.2% ในแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 1 – 2 กรัม ลงในหลอดย่อยโปรตีน

2. เติม selenium reagent mixture ซึ่งใช้เป็นสารเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ประมาณ 5 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร

3. นำตัวอย่างไปย่อยด้วยเครื่อง BUCHI digestion unit โดยใช้ความร้อน เบอร์ 9 และปิดฝาด้านบนที่ต่อเข้ากับเครื่องดูดไอกรด (scrubber) ย่อยตัวอย่างจนส่วนผสมในหลอดย่อยกลายเป็นสีเขียวใส และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. นำมากลั่นโดยเติม 50 % Sodium hydroxide และรองรับสารที่กลั่นด้วยสารละลาย 4% boric acid หยดสารละลายเมทิลเรด-โบรโมครีซอลกรีนเป็นอินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยดในระหว่างการกลั่นจะเกิดแอมโมเนียขึ้น และจะถูกจับไว้ด้วยสารละลาย 4% boric acid จะได้สารละลายสีเขียว

7. ล้างส่วนปลายของ condenser ด้วยน้ำกลั่นใส่ลงในฟลาสก์ที่รองรับสิ่งที่กลั่นได้

8. นำสารละลายที่กลั่นได้ในฟลาสก์ทั้งหมดมาไตเตรตด้วยสารละลายไฮดรอคลอริคมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1N จนถึงจุดยุติ (end point) เป็นสีม่วงแดง

9. ทำตัวอย่างควบคุม (control) โดยเตรียมเหมือนกับข้อ 2 และวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับตัวอย่าง

10. คำนวณหาปริมาณโปรตีนดังนี้

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \frac{(Va - Vb) \times N \times 1.4 \times CF}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)} \times 10}$$

เมื่อ Va คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Vb คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท blank (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรท มีหน่วยเป็น Normal

CF คือ Conversion Factor สำหรับเปลี่ยนไนโตรเจนให้เป็นโปรตีน (ในการทดลองใช้ 6.25)

ข.3 การวิเคราะห์ปริมาณถ้าตามวิธี A.O.A.C. (1995)

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. เตาเผา (Muffle finance) (รุ่น 201 จากบริษัท Carbolite, U.K.)
2. crucible
3. hot plate
4. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AB204 จากบริษัท Mettler Toledo (Thailand)Ltd.,)
5. desiccator

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักแน่นอน 3-5 กรัม ใส่ใน crucible ที่เผาและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. นำตัวอย่างไปเผาโดยใช้ hot plate ในตู้ดูดควัน จนกระทั่งตัวอย่างหมดควัน
3. นำตัวอย่างไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้เถ้าสีขาว
4. ทิ้งไว้ให้เย็นใน desiccator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. ชั่งน้ำหนักเถ้าที่ได้และคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (กรัม) x 100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

ข.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ตามวิธีของ A.O.A.C (1995)

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. ชุดสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus)
2. thimble
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (รุ่น 600 บริษัท Mermmert, U.S.A)
4. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (บริษัท Mettler Toledo (Thailand)Ltd.,)
5. disiccator

<u>สารเคมี</u>

1. petroleum ether b.p. 40 – 60^0 C (A.R. grade)

<u>วิธีการวิเคราะห์</u>

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 – 3 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 และนำไปใส่ thimble ใน extraction tube ของเครื่อง Soxhlet apparatus

2. เติม petroleum ether ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

3. นำไป reflux บน heating mantle สกัดไขมันเป็นเวลา 3 – 4 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นก่อนนำขวดก้นกลมออก

4. ระเหย petroleum ether ออกจากส่วนไขมันที่สกัดได้ แล้วอบขวดสกัดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่

5. ทิ้งไว้ให้เย็นใน disiccator ชั่งน้ำหนักไขมันที่สกัดได้ แล้วคำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = \frac{\text{ปริมาณไขมันที่สกัดได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

ข.5 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล – ซัลฟูริค (Kochert, 1978)

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. Spectrophotometer
2. Vortex mixer
3. Water bath

<u>สารเคมี</u>

1. กรดซัลฟูริคเข้มข้น (95.5% H_2SO_4 ความถ่วงจำเพาะ 1.84)
2. ฟีนอล 5% โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งน้ำกลั่น 95 กรัม และฟีนอล 5 กรัม ละลายให้เข้ากัน
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (D – glucose)

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

1. นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 2-3 นาที
2. เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที
3. เขย่าและนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นอุณหภูมิ 25 – 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. วัดค่าการการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ค่าแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)

ข.6 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีลาวรี (Lowry **และคณะ**, 1951)

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. Spectrophotometer
2. Vortex mixer

สารเคมี

1. สารละลาย A : 2% Na_2CO_3 ใน 0.1 N. NaOH
2. สารละลาย B : 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ ใน 1% potassium tartrate
3. สารละลาย C : alkaline copper solution จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย B 5 มิลลิลิตร (สารละลาย C ควรใช้ภายใน 24 ชั่วโมง)
4. Folin – Ciocalteau reagent เจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1 : 1
5. สารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย C 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
3. เติมสารละลาย Folin – Ciocalteau reagent เจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เกิดสีชัดเจน
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เทียบกับ blank นำมาหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงโปรตีนกับกราฟมาตราฐาน โดยใช้ BSA ความเข้มข้นระหว่าง 0 – 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่าแบลงค์ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง)

ข.7 การวัดค่าการสูญเสียของยีสต์จากการล้าง (Niumthanorm, 1997)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของยีสต์ก่อนเตรียมเป็น yeast slurry เพื่อทำการล้าง
2. ชั่งน้ำหนักของยีสต์หลังผ่านการล้างและเหวี่ยงแยก

$$\% \text{ การสูญเสียยีสต์} = \frac{w1 - w2}{w1} \times 100$$

เมื่อ

w1 = น้ำหนักยีสต์ก่อนล้าง

w2 = น้ำหนักยีสต์หลักผ่านการล้าง

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

ค.1 การตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตด้วยวิธี Methylene blue technique

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างยีสต์ที่ต้องการนับจำนวนเซลล์ มาทำการเจือจางกับน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยยีสต์ 5 มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายเมทธิลลีนบลู เข้มข้น 0.02% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที หยดสารละลายดังกล่าวลงบนฮีมาไซโตมิเตอร์ (Heamacytometer) นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะไม่ติดสีน้ำเงิน ส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะเกิดสีน้ำเงิน คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่นับได้

วิธีการคำนวณจำนวนเซลล์

จำนวนเซลล์/มิลลิลิตร = จำนวนเซลล์เฉลี่ยในช่องเล็ก $\times 5 \times 10^4$ เซลล์/มิลลิลิตร

หรือหากมีการเจือจาง

จำนวนเซลล์/มิลลิลิตร = จำนวนเซลล์เฉลี่ยในช่องเล็ก $\times 5 \times 10^4$/Dilution factor เซลล์/มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายเมทธิลลีนบลูเข้มข้น 0.02 % (w/v)

1. ชั่งเมทธิลลีนบลู 0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
2. และเติมโซเดียมซิเตรทไดไฮเดรต 2 กรัม ลงไปในสารละลายดังกล่าว คนให้เข้ากัน และกรองเอาตะกอนออก จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารสกัดเบต้ากลูแคน

โดยวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ในรูปของน้ำตาลกลูโคส) และปริมาณเบต้ากลูแคนโดยใช้กรดและด่างร่วมกับการใช้เอนไซม์ โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (Yeast Beta-Glucan Assay Kit; K-YBGL ; Megazyme, Ireland) **รายละเอียดที่มากับ** test kit

<u>สารเคมีที่ต้องเตรียม</u>:

1. Sodium acetate buffer (200 mM, pH 5.0)

1.1 ปิเปต glacial acetic acid 11.6 mL (1.05 g/mL) ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด1,000 mL และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 900 mL

1.2 ปรับ pH เท่ากับ 5.0 โดยใช้ 4 M sodium hydroxide (16 g/100 mL) และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1,000 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C

2. Sodium acetate buffer (1.2 M, pH 3.8)

2.1 ตวง glacial acetic acid 69.6 mL (1.05 g/mL) ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 mL และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 mL

2.2 ปรับ pH เท่ากับ 3.8 โดยใช้ 4 M sodium hydroxide และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1,000 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C

3. Potassium hydroxide (2 M)

3.1 ชั่ง KOH 112 g ใส่ลงในน้ำกลั่น 800 mL และใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย

3.2 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 1,000 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C

4. Hydrochloric acid (37% v/v; ~ 10 M)

<u>เอนไซม์และสารเคมีที่มากับ Test kit</u> :

ขวดที่ 1	exo-1,3-ß-Glucanase (100 U/mL) และ ß-Glucosidase (20 U/mL)	
ขวดที่ 2	Amyloglucosidase (1630 U/mL) และ invertase (500 U/mL)	
ขวดที่ 3	Glucose reagent buffer (concentrate; 50 mL)	
ขวดที่ 4	Glucose determination reagent.	
	Reagent concentration after dissolution in buffer:	
	Glucose oxidase	> 12,000 U/litre
	Peroxidase	> 650 U/litre
	4-Aminoantipyrine	0.4 mM

ขวดที่ 5 D-glucose standard solution (5 mL, 1.00 mg/mL)

ขวดที่ 6 Control yeast ß-glucan preparation

การเตรียมตัวทำละลายและเอนไซม์

1. เติม 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ปริมาตร 8 mL ลงในขวดที่ 1 ได้ปริมาตรรวม 10 mL และแบ่งใส่ในหลอด polypropylene เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เมื่อนำมาใช้งานหรือในระหว่างใช้งานให้วางหลอดที่ใส่เอนไซม์นี้ในภาชนะที่บรรจุน้ำแข็ง
2. เอนไซม์และสารเคมีในขวดที่ 2, 5 และ 6 สามารถใช้งานได้ทันที
3. เจือจางบัฟเฟอร์ในขวดที่ 3 ในน้ำกลั่น 1,000 mL
4. เทสารในขวดที่ 4 ลงในบัฟเฟอร์ที่เจือจางแล้วในข้อ 3 จะได้ GOPOD reagent จากนั้นจึงแบ่งใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และใช้ให้หมดภายใน 2-3 เดือน

การวัดปริมาณ 1,3 : 1,6 –ß-D-glucan ในยีสต์และเห็ด

A. การวัดปริมาณกลูแคนทั้งหมด (แอลฟากลูแคนและเบต้ากลูแคน) และน้ำตาลกลูโคสในโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสอิสระ

a. การละลายและการย่อยบางส่วนของกลูแคนทั้งหมด (แอลฟากลูแคนและเบต้ากลูแคน)และน้ำตาลกลูโคสในโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสอิสระ

วิธีทำ

1. บดตัวอย่างยีสต์หรือเห็ด โดยใช้ Retsch centrifugal mill หรือเครื่องบดชนิดอื่นที่ใกล้เคียงกัน และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 mm
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 100 mg (บันทึกน้ำหนักจริงที่ถูกต้อง) ใส่ลงในหลอดทดลอง ปิดฝาหลอดและเคาะข้างหลอดให้ตัวอย่างทั้งหมดตกอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง
3. เติม hydrochloric acid (37 % v/v) 1.5 mL ลงในแต่ละหลอด ปิดฝาหลอดและเขย่าทันทีด้วย vortex mixer และนำไปวางในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 45 นาที (เขย่าด้วย vortex mixer ทุกๆ 15 นาที)
4. เติมน้ำกลั่น 10 mL ลงในแต่ละหลอด ปิดฝาหลอดและเขย่าด้วย vortex mixer
5. นำไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 2 ชั่วโมง โดยก่อนต้มให้คลายเกลียวฝาหลอด และหลังจากต้มผ่านไป 5 นาที ให้ปิดฝาหลอดให้แน่น
6. ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 25 °C จากนั้นเติม 2N KOH 10 mL เขย่าให้เข้ากันทันที และนำไปเทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 mL โดยใช้ 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ล้างตัวอย่างที่ติดอยู่กับหลอดทดลองและปรับปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับขวดไปมา

7. กรองตะกอนออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman GF/A หรือเหวี่ยงแยกด้วย centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1500xg นาน 10 นาที

b. <u>การวัดปริมาณกลูแคนทั้งหมด</u>

1. ปิเปตสารละลายใส จากข้อ 7 ที่ผ่านการกรองหรือ centrifuge ปริมาตร 0.1 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมเอนไซม์ผสมระหว่าง exo-1,3-ß-glucanase (20 U/mL) และ ß-glucosidase (4 U/mL) ที่อยู่ใน 200 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) (ขวดที่ 1) ลงในแต่ละหลอด เขย่าทันที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 60 นาที

3. เติมเอนไซม์ glucose oxidase/peroxidase mixture (GOPOD) ลงในแต่ละหลอด เขย่าทันที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 20 นาที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 510 nm โดยเทียบกับ reagent blank

B. <u>การวัดแอลฟากลูแคน (phytoglycogen และ starch) น้ำตาลกลูโคสในซูโครสและน้ำตาลกลูโคสอิสระ</u>

<u>การละลาย การย่อยและการวัดแอลฟากลูแคน น้ำตาลกลูโคสในซูโครสและน้ำตาลกลูโคสอิสระ</u>

<u>วิธีทำ</u>

1. บดตัวอย่างยีสต์หรือเห็ดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 0.5 mm ชั่งตัวอย่าง 100 mg (บันทึกน้ำหนักจริงที่ถูกต้อง) ใส่ลงในหลอดทดลอง ปิดฝาหลอด และเคาะข้างหลอดให้ตัวอย่างทั้งหมดตกอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง และนำไปตั้งในกล่องพลาสติกที่ใส่น้ำแข็ง

2. นำ magnetic stirrer bar ใส่ลงในแต่ละหลอด และนำไปตั้งบน magnetic stirrer เติม 2 M KOH 2 mL กวนประมาณ 20 นาที

3. เติม 1.2 M sodium acetate buffer (pH 3.8) 8 mL ลงในแต่ละหลอด จากนั้นเติมเอนไซม์ amyloglucosidase (1630 U/mL)และ invertase (500 U/mL) (ขวดที่ 2) ปริมาตร 0.2 mL ทันที (กวนตลอดเวลา) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 30 นาที

4. เหวี่ยงแยกตะกอนออก ด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1500xg นาน 10 นาที (ไม่ต้องเจือจาง) ได้ส่วนสารละลายใส

5. ปิเปตส่วนสารละลายใส 0.1 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง และเติม GOPOD 0.3 mL ลงในแต่ละหลอด และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 20 นาที

6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 510 nm โดยเทียบกับ reagent blank

7. คำนวณปริมาณกลูแคนทั้งหมดและแอลฟากลูแคน จากสูตรการคำนวณปริมาณเบต้ากลูแคน

CALCULATIONS:

Yeast

$$\text{Total Glucan (\% w/w)} = \Delta E \times F \times \frac{100}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162.}{180}$$

$$= \Delta E \times F/W \times 90.$$

Mushroom

$$\text{Total Glucan (\% w/w)} = \Delta E \times F \times \frac{100}{0.2} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162.}{180}$$

$$= \Delta E \times F/W \times 45.$$

$$\alpha\text{-Glucan (\% w/w)} = \Delta E \times F \times \underset{\text{(or 103)}}{1000} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162.}{180}$$

$$= \Delta E \times F/W \times 90 \text{ (final volume 100 ml).}$$
$$= \Delta E \times F/W \times 9.27 \text{ (final volume 10.3 ml).}$$

$$\beta\text{-Glucan} = \text{Total Glucan} - \alpha\text{-Glucan}$$

where:

ΔE = reaction absorbance – blank absorbance;

F = a factor to convert of absorbance to μg of glucose
= 100 (μg glucose)/the GOPOD absorbance for 100 μg Glc;

100/0.1 = volume correction factor; for total glucan (yeast), (0.1 ml out of 100 ml was analysed);

100/0.2 = volume correction factor; for total glucan (mushroom), (0.2 ml out of 100 ml was analysed);

103 = volume correction factor; for α-glucan (0.1 ml out of 10.3 ml was analysed);

or

1000 = volume correction factor; for α-glucan (0.1 ml out of 100 ml was analysed);

1/1000 = conversion from μg to milligrams;

100/W = conversion back to 100 mg of sample (i.e. as %);

W = weight of sample analysed;

162/180 = a factor to convert from free glucose, as determined, to anhydroglucose, as occurs in β-glucan.

รูปที่ ง1 สูตรแสดงการคำนวณปริมาณเบต้ากลูแคนในยีสต์และเห็ด

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณเบต้ากลูแคน

YEAST GLUCAN DETERMINATION

A.Determination of Total Glucan + free sugars

Sample	Weight (mg)	Moisture Content (%)	Final Volume (ml.)	Absorbance values (510 nm)	Average Absorbance (510 nm)	Total Glucan + free sugars (% w/w)	
						"as is' basis	'dw' basis
1 0.1 %,3 hr	99.3	3	100	0.724 / 0.734 / 0.713	0.724	63.64	65.61
2 0.1 %,4 hr	100.9	3	100	0.745 / 0.748 / 0.746	0.746	64.54	66.54

Glucose Standard (100 µg/$\alpha\Delta E_{510\,nm}$) = 1.020 / 1.021 / 1.021 / 1.023. Average = 1.021 F = 96.99

Total Glucan + free sugars (% w/w) = $\Delta E \times F \times V / 0.1 \times 100 / W \times 1 / 1000 \times 162 / 180 = \Delta E \times F \times V / W \times 0.9$

Total Glucan + free sugars % ('dw' basis): = Total Glucan + free sugars % (as is) x $\frac{100}{100 - \text{moisture content (\%)}}$

YEAST GLUCAN DETERMINATION

B.Determination of α- Glucan + free sugars (KOH/AMG + Invertase procedure)

Sample	Weight (mg)	Moisture Content (%)	Final Volume (ml.)	Absorbance values (510 nm)	Average Absorbance (510 nm)	α - Glucan + free sugars (% w/w)	
						"as is' basis	'dw' basis
1 0.1 %, 3 hr	102.1	3	-	0.051 / 0.051 / 0.049	0.050	0.42	0.43
2 0.1 %, 4hr	100.4	3	-	0.050 / 0.054 / 0.055	0.053	0.46	0.47

Glucose Standard (100 µg / $\Delta E_{510\,nm}$) = 1.069 / 1.070 / 1.067 / 1.074. Average = 1.070; F = 93.46

α - Glucan + free sugars (% w/w) = $\Delta E \times 10.3 / 0.1 \times 1 / 1000 \times 100 / w \times 162 / 180 = \Delta E \times F/W \times 9.27$ (for undiluted solutions)

$\Delta E \times F \times 1000 / 0.1 \times 1 / 1000 \times 100 / w \times 162 / 180 = \Delta E \times F/W \times 90$ (for dilutions to 100mls)

$$\alpha\text{ - Glucan, (\% 'dw' basis) : = } \alpha\text{ - Glucan (\%,'as is ') x } \frac{100}{100 - \text{moisture content (\%)}}$$

YEAST GLUCAN DETERMINATION

C. Determination of β - Glucan

Sample	% (w/w, ' as is')		
	Total Glucan + free sugars	α - Glucan + free sugars	β – Glucan
1. 0.1 %, 3 hr	63.64	0.42	63.19
2. 0.1 %, 4 hr	64.54	0.46	64.09

Note: β -Glucan = (Total Glucan + free sugars) – (α - Glucan + free sugars)

ภาคผนวก จ

ผลของภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์

ตารางที่ จ.1 จำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเองเมื่อใช้อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (hr.)	จำนวนเซลล์ที่เกิดการย่อยสลายตัวเอง (x 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร)
45	12	1.65 ± 0.12^{f}
	24	2.15 ± 0.11^{e}
	48	4.14 ± 0.11^{a}
50	12	2.90 ± 0.11^{d}
	24	4.17 ± 0.11^{a}
	48	4.35 ± 0.11^{a}
60	12	3.04 ± 0.12^{d}
	24	3.47 ± 0.11^{c}
	48	3.73 ± 0.10^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ

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

ตารางที่ จ.2 ปริมาณโปรตีนในออโตไลเสทหลังการย่อยสลายผนังเซลล์แต่ละภาวะ

อุณหภูมิ (°C)	ระยะเวลา (hr.)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
45	12	3.83 ± 0.04^{e}
	24	5.25 ± 0.09^{d}
	48	7.86 ± 0.15^{a}
50	12	6.17 ± 0.99^{c}
	24	8.52 ± 0.09^{a}
	48	8.10 ± 0.25^{a}
60	12	6.45 ± 0.23^{bc}
	24	6.63 ± 0.13^{bc}
	48	7.09 ± 0.44^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ

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

ผลของภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์

ตารางที่ จ.3 ปริมาณโปรตีนในผนังเซลล์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง ผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน และผ่านการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Savinase®

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)	ระยะเวลา (hr.)	ปริมาณโปรตีน (% w/w)
0.1	3	7.13 ± 0.07^{c}
	4	6.23 ± 0.01^{ed}
	5	6.31 ± 0.01^{d}
0.3	3	7.04 ± 0.05^{c}
	4	6.18 ± 0.03^{e}
	5	6.30 ± 0.01^{d}
0.5	3	7.59 ± 0.10^{a}
	4	7.48 ± 0.10^{b}
	5	7.42 ± 0.04^{b}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ

a,b,c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ตารางที่ จ.4 ปริมาณโปรตีนในผนังเซลล์ที่ได้จากการย่อยสลายตัวเอง ผ่านการสกัดโปรตีนส่วนที่ละลายน้ำด้วยน้ำร้อน และผ่านการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase®

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)	ระยะเวลา (hr.)	ปริมาณโปรตีน (% w/w)
0.1	3	12.66 ± 0.13^{a}
	4	12.47 ± 0.01^{b}
	5	12.21 ± 0.17^{c}
0.3	3	11.88 ± 0.04^{d}
	4	11.28 ± 0.01^{e}
	5	8.81 ± 0.01^{f}
0.5	3	11.85 ± 0.02^{d}
	4	8.81 ± 0.02^{f}
	5	8.81 ± 0.03^{f}

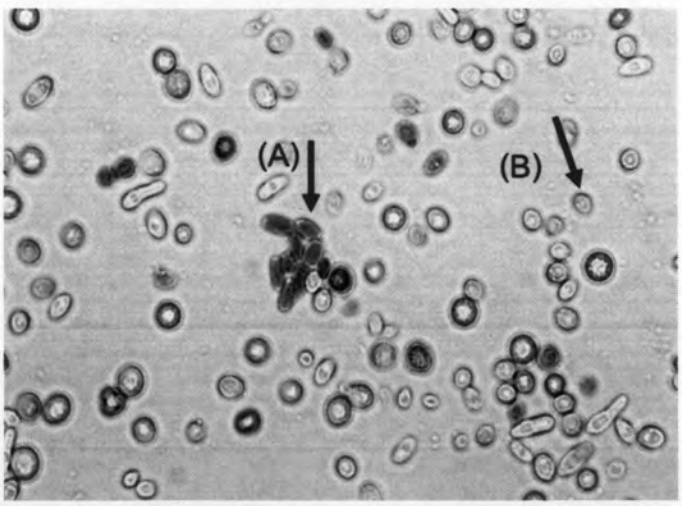
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ

a,b,c,... ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

ภาคผนวก ฉ

ภาพแสดงลักษณะของเซลล์ยีสต์ และสารสกัดเบต้ากลูแคน

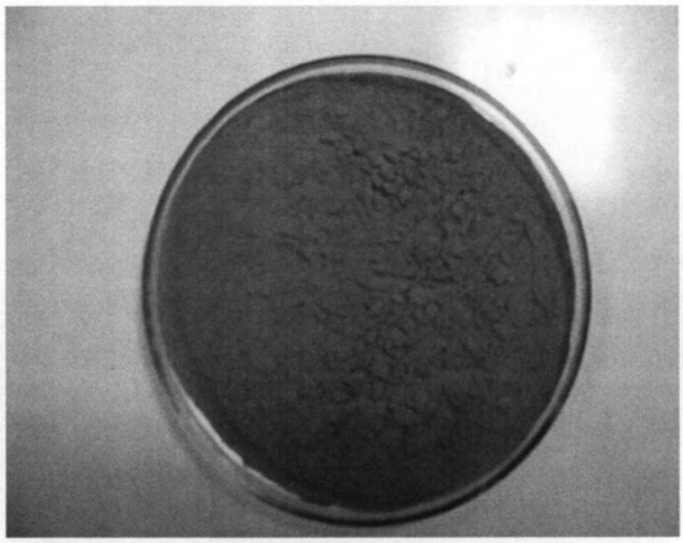
รูปที่ ฉ1 เซลล์ยีสต์ที่เกิดการย่อยสลายผนังเซลล์ เมื่อย้อมสีด้วย Methylene blue และใช้ Phase contrast microscope กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ ฉ2 ลักษณะการติดสีของเซลล์ยีสต์เมื่อย้อมด้วย Methylene blue เมื่อใช้ light microscope กำลังขยาย 40 เท่า

(A) เซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงินของ Methylene blue

(B) เซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีน้ำเงินของ Methylene blue



รูปที่ ฉ3 สารสกัดเบต้ากลูแคนที่ได้จาก *Sacharomyces cerevisiae* (SC90)

ภาคผนวก ช

รายละเอียดของเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

Savinase®

Description

Savinase is a protease used in laundry and automatic dishwasher detergent formulations to remove protein-based stains, e.g. grass, blood, mucus, faeces and various foods such as egg and gravy. These substances are almost insoluble and tend to adhere to he surface of textiles and other surfaces. Savinase hydrolyzes protein in stains into peptides which are readily dissolved or dispersed in the washing liquor.

Savinase is a serine-type protease characterized by excellent performance at elevated pH.

Savinase is produced by submerged fermentation of a genetically modified *Bacillus* microorganism.

Activity

The activity is determined relative to an enzyme standard under the following conditions:

Substrate:	Dimethyl Casein (DMC)
Temperature: PH:	50^0C (122^0F) 8.3

Novozymes uses an automated kinetic assay procedure for measuring the activity of Savinase products. See the Analytical Method for further information. A manual procedure for determination of proteolytic activity in enzyme preparations and detergents exists

Solubility

Savinase is readily soluble in detergent solutions at all levels of concentration, temperature and pH which may occur in normal usage.

Activity

Figures ๆ1 and ๆ2 show the activity of Savinase at various temperatures and pH values. Savinase is active throughout the pH range of interest for most detergent applications. It should be emphasized that the activity curves refer to conditions specifically employed in laboratory trials. For substrates other than denatured haemoglobin, deviations from these curves are to be expected.

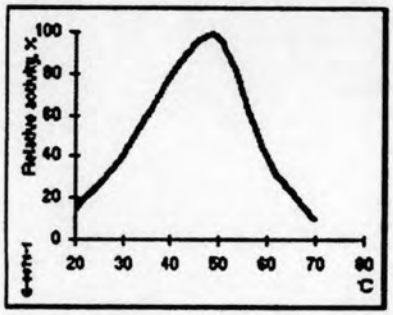


Fig.ๆ1. Activity of Savinase at different temperature
Enzyme concentration:0.3 KNPU/litre , pH: 10.1,
Reaction time : 10 min.

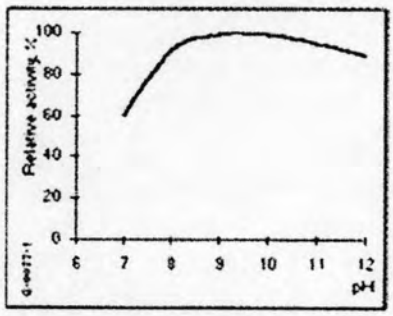


Fig.ๆ2. Activity of Savinase at different pH values.
Enzyme concentration:0.3 KNPU/litre , Temperature: 25 °C
Reaction time : 10 min.

Stability

Figures ๆ3 and ๆ4 show the stability of Savinase at various temperatures and pH values. The stability studies have been carried out in dilute buffer systems with enzyme concentrations corresponding to a normal washing liquor.

Proteins and peptides in laundry stains tend to enhance the stability of the enzyme. This effect is not included in the data.

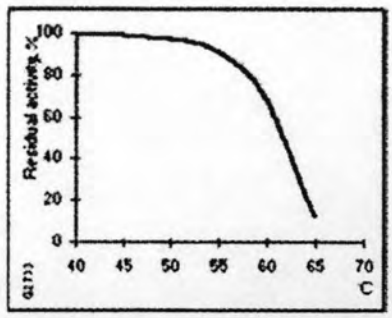


Fig. 13 Residual activity of Savinase after 10 min. at different temperature. Enzyme concentration: 0.6 KNPU/litre.

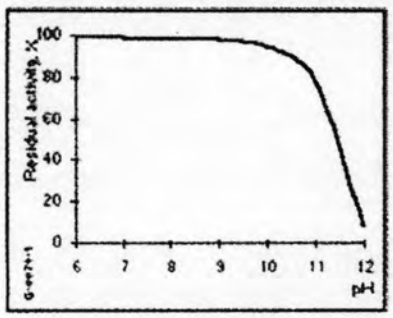


Fig. 14 Residual activity of Savinase after 24 hours at different pH values.. Enzyme concentration: 0.6 KNPU/litre, Temperature 25 °C

Storage

Enzymes gradually lose activity over time depending on storage temperature and humidity. Cool and dry conditions are recommended. When stored in closed containers at 25°C (77°F), the enzyme preparations will maintain their declared activity for at least 3 months. At lower temperatures the storage stability is increased. Extended storage and/or adverse conditions, including higher temperatures or high humidity, may lead to a higher dosage requirement.

The enzyme preparations should not be left in direct sunlight for extended periods. Liquid preparations should not be frozen.

Alcalase® Food Grade

Description

Alcalase is a proteolytic enzyme produced by submerged fermentation of a selected strain of *Bacillus licheniformis*. The main enzyme component, Subtilisin A (=Subtilisin Carlsberg), is an endoproteinase extensively described in the literature, Table 1 summarizes some of the biochemical properties of the proteinase in Alcalase. The optimal conditions for Alcalase are temperatures between 55°C (131°F) and 70° C (158° F), depending on the type of substrate, and pH values between 6.5 and 8.5.

Table 1 Summarizes some of the biochemical properties of the proteinase in Alcalase®

	Alcalase
	Subtilisin Carlsberg
Type of action	Endopeptidase
Nature of catalytic site	Serine
Inhibition by:	
DFP & PMSF1)	+
EDTA2) & phosphate	0
Bonds attacked in the oxidezed B-chain of insulin 3)	4-5,9-10,11-12,15-16,26-27
Molecular weight (approx.)	27,300
1):DEP=Di-isopropyl fluorophosphates, PMSF=Phenylmethylsuphonylfluoride	
2):EDTA=Ethylenediamine tetra-acetic acid	
NH2-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-CySO3H-Gly-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-	
1 5 10 15	
Tyr-Leu-Val-CySO3H-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala	
17 20 25 30	
(from Johansen,J.T. et al., C.R. Trav.Lab. Carlsberg 36, 365-384, 1968)	

Biochemical properties of Alcalase

Activity

Alcalase Food Grade is standardized in Anson Units per g (AU/g).

Alcalase 2.4 L.....Declared activity:2.4 AU/g

The proteolytic activity is determined according to an analytical standard using the DMC method.

Application

Alcalase Food Grade is a highly efficient bacterial protease developed for the hydrolysis of all kinds of proteins. More detailed recommendations with respect to the various applications are given in separate leaflets, which are available on request.

Activity

By analyzing Alcalase at various pH values using modified Anson/haemoglobin method, its optimum activity has been found to be at a pH of between 6.5 and 8.5 Similarly, under analytical conditions Alcalase has its temperature optimum around 60^0C (140^0F)

Inactivation

Alcalase can be inactivated in 30 minutes at 50^0C (122^0F) of higher when the pH is 4, and in 10 minutes at 85^0C (185^0F) of higher when the pH is 8. However, the inactivation is very much dependent on the substrate (substrate concentration, pH, etc,). Thus, the documentation for efficient elimination of Alcalase must be based on actual analysis for the detection of residual activity.

Storage

Enzymes gradually lose activity over time depending on storage temperature. Cool conditions are recommended. When stored at 5^0C (41^0F), the product will maintain its declared activity for at least 1 year. When stored at 25^0C (77^0F), the product will maintain its declared activity for at least 3 months. Extended storage and/or adverse conditions, including higher temperatures, may lead to a higher dosage requirement.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรัญญา พรเจริญ เกิดวันอังคารที่ 24 มกราคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เข้ารับการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น และตอนปลายที่โรงเรียนจอมสุรางค์อุปถัมภ์ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา และสอบเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรีในสาขาวิชาวิทยาศาสตร์อนามัยสิ่งแวดล้อม คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สำเร็จการศึกษาและเข้ารับพระราชทานปริญญาบัตรในปีการศึกษา 2543 หลังจากนั้นสอบเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547